



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de doctorat es sciences en médecine vétérinaire

N° de Série :95/DS/2022

N° d'Ordre :04/Vétét/2022

Option: **Épidémiologie**

Spécialité:

Étude de l'intérêt de l'usage des huiles essentielles de *Lamiacées* (*Mentha, Origanum et Thymus*) durant le tarissement dans la maîtrise des mammites staphylococciques des vaches laitières

Présentée par

Hamlaoui Mohamed Walid

Soutenue le : 12/11/2022

Membres du jury :

BERERHI El Hacene	Président	Professeur	Université des frères Mentouri- Constantine
BEROUAL Katiba	Examinatrice	M. C. A	Université des frères Mentouri- Constantine
BOUGHERARA Hithem	Examinateur	M. C. A	Université des frères Mentouri- Constantine
MESSAÏ Ahmed	Examinateur	Professeur	Université Mohamed Khider- Biskra
KSOURI Samir	Examinateur	M. C. A	Université 8 Mai 1945- Guelma
HADEF Ahmed	Directeur de thèse	M. C. A	Université Chadli Bendjedid- El Tarf

Année universitaire : 2022-2023

Remerciements

A DIEU le tout puissant, le très miséricordieux qui m'a accordé santé et courage pour accomplir ce travail

A monsieur **BERERHI El Hacene** professeur de l'institut vétérinaire de Constantine qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse, hommages respectueux

A monsieur **HADEF Ahmed** Maitre de conférences 'A' du département des sciences vétérinaires de l'université Chadli Bendjedid El-Tarf, qui m'a fait l'honneur d'encadrer mon travail. Qu'il a toujours été présent à mes côtés par ses précieux conseils, par sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse, son soutien son sourire, son grand ajout qu'il a apporté au travail et son aide précieuse.... qu'il trouve ici l'expression de mon respect et de ma reconnaissance

A madame **BEROUAL Katiba** Maitre de conférences 'A' de l'institut vétérinaire de Constantine qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travailsincères remerciements

A monsieur **BOUGHERARA Hithem**, Maitre de conférences 'A' de l'institut vétérinaire de Constantine qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail..... Sincères remerciements

A monsieur **MESSAÏ Ahmed**, professeur de l'université Mohamed Khider de Biskra qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail..... sincères remerciements

A monsieur **KSOURI Samir**, Maitre de conférences 'A' de l'université 8 Mai 1945 de Guelma qui nous a fait l'honneur d'examiner ce travail..... Sincères remerciements

Au professeur **HADEF Youcef**, de l'université Badji Mokhtar de Annaba, qui nous a accueillis dans son laboratoire et qui a mis à notre disposition tous le matériel

nécessaire et disponible, et pour son aide dans l'identification de la composition chimique des huiles essentielles et ses conseils pertinents... sincères remerciements

Au Docteur **MEKLATI Fawzi Rostane**, du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico - Chimiques (CRAPC) de Tipaza, pour les analyses réalisées, pour son aimable collaboration, les corrections ajoutées et les remarques pertinentes...Sincères remerciements

Au Docteur **LAKEHEL Samia**, du laboratoire de la faculté de médecine de l'université d'Annaba, pour son aide précieuse et pour l'identification du matériel végétal utilisé provenant de Sétif et de Guelma... Sincères remerciements

Au Docteur **BOUTABIA Lamia**, Maître de Conférences 'A' spécialiste en botanique à l'université Chadli Bendjedid- El Tarf pour l'identification des espèces de lamiacées étudiées collectées au niveau de la région de Constantine

Je dois adresser également mes remerciements à tous le personnel de la ferme pilote de Constantine et particulièrement le Docteur vétérinaire **Fakhreddine** pour l'accueil et toutes les facilités accordées... Sincères remerciements

Pour ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail notamment mes collaborateurs, les docteurs **SI MOHAND Nouredine**, **ALLEG Meriem**, **GHOUILA Bouchra**, **BITAL Imane**, **Mme HADEF Samira** ... Sincères remerciements.

Dédicaces

A mes parents, pour leur admirable éducation, leur soutien constant et surtout leur affection. Même si je ne vous l'ai pas assez dit : Merci infiniment

A mon frère et ma sœur, pour tous les moments passés ensemble, Merci infiniment

A ma femme, pour tous les encouragements, pour toute l'inquiétude, Merci infiniment

A toute ma famille, chacun par son nom...Merci infiniment

Table des matières

Résumé.....	I
Abstract	II
الملخص	III
Liste des abréviations	IV
Liste des tableaux	VI
Liste des figures.....	VII
Introduction	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
CHAPITRE I : Gestion du tarissement chez la vache laitière	3
1. Importance de la période de tarissement	3
1.1. Lactation continue jusqu'au vêlage	4
2. Arrêt de la traite.....	4
2.1. Arrêt brutal	5
2.2. Arrêt progressif.....	5
3. Changements physiologiques au tarissement	5
3.1. Changement endocrinien durant le tarissement en rapport avec la gestation.....	5
3.1.1. Progestérone	6
3.1.2. Œstrogènes	6
3.1.3. Prolactine.....	6
3.1.4. Facteurs de croissance	7
3.1.5. Hormone de croissance (GH)	7
3.2. Glande mammaire	8
3.2.1. Phase initiale d'involution.....	8
3.2.2. Phase dite intermédiaire	10
3.2.3. Phase terminale (colostrogénèse)	10
4. Conduite du tarissement	11
4.1. Conduite alimentaire	11
CHAPITRE II : Les mammites staphylococciques et leur impact durant le tarissement	13
1. Définition.....	13
1.1. Mammites subcliniques	13
1.2. Mammites cliniques	13
2. Etiologie des mammites	14
2.1. Pathogènes majeurs	14

2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).....	14
2.1.2. <i>Streptococcus uberis</i> (<i>Str. uberis</i>)	15
2.1.3. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (<i>Str. dysgalactiae</i>).....	16
2.1.4. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	16
2.2. Pathogènes mineurs	16
3. Mammites staphylococciques.....	17
3.1. Impact sanitaire des staphylocoques	17
3.2. Impact des Staphylocoques dorés sur la santé humaine	17
3.3. Impact sur la santé publique vétérinaire lié au lait mammitieux	18
3.4. Répercussion du lait mammitieux staphylococcique sur la santé humaine	18
3.4.1. Toxi-infections alimentaires staphylococciques.....	19
3.4.2. Source d'émergence des bactéries résistantes	20
4. Mammites du tarissement.....	21
4.1. Traitement des mammites au tarissement.....	22
4.1.1. Traitement systématique ou général (Blanket Dry Cow Therapy ou BDCT)	23
4.1.2. Traitement sélectif (Selective Dry Cow Therapy ou SDCT).....	23
CHAPITRE III : Utilisation de l'aromathérapie dans le traitement des mammites de la lactation et de tarissement.....	25
1. Introduction à l'aromathérapie	25
2. Définition des huiles essentielles.....	25
3. Importance des huiles essentielles.....	26
3.1. Importance médicale	26
3.1.1. Action antibactérienne.....	26
3.1.2. Action anti-inflammatoire	26
3.1.3. Action antifongique	27
3.2. Importance économique	27
4. Composition chimique des huiles essentielles	28
4.1. Terpènes	29
4.2. Terpénoïdes	29
4.2.1. Thymol	30
4.2.2. Carvacrol	31
4.3. Notion de chémotype.....	31
5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	31
5.1. Méthodes conventionnelles ou classiques	32
5.1.1. Hydrodistillation.....	32
5.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau	33

5.1.3. Expression à froid.....	34
5.2 Méthodes non conventionnelles ou innovantes.....	34
6. Aromathérapie des mammites bovines.....	35
6.1. Aromatogramme.....	35
6.2. Voies d'administration des huiles essentielles	36
7. Effet des huiles essentielles sur la flore du lait.....	37
7.1. Effet sur la flore normale.....	37
7.2. Effet sur la flore pathogène et d'altération	38
7.3. Résidus des huiles essentielles dans le lait	38
CHAPITRE IV : Activités des huiles essentielles de Lamiacées sur les staphylocoques et les	
pathogènes majeurs responsables de mammites.....	
1. Activité des huiles essentielles d' <i>Origanum</i>	40
1.1. Historique et origine	40
1.2. Caractéristiques botaniques	40
1.2.1. Classification	40
1.2.2. Description morphologique	41
1.3. Répartition géographique	42
1.3.1. Dans le monde	42
1.3.2. En Algérie.....	44
1.4. Principales utilisations de l'origan	44
1.4.1. Usages alimentaires	44
1.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle.....	45
1.5. Activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Origanum</i>	45
2. Activité des huiles essentielles de <i>Thymus</i>	45
2.1. Historique et origine.....	45
2.2. Caractéristiques botaniques	46
2.2.1. Classification	46
2.2.2. Description morphologique	46
2.3. Répartition géographique	47
2.3.1. Dans le monde	47
2.3.2. En Algérie.....	48
2.4. Principales utilisations du thym.....	48
2.4.1. Usage alimentaire	48
2.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle.....	48
2.5. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym	49
3. Activité des huiles essentielles de <i>Mentha</i>	49

3.1. Historique et origine	49
3.2.1. Classification	50
3.2.2. Description morphologique	50
3.3. Répartition géographique	51
3.3.1. Dans le monde	51
3.3.2. En Algérie.....	51
3.4. Principales utilisations de la menthe pouliot	52
3.4.1. Utilisation alimentaire	52
3.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle.....	52
3.5. Activité antibactérienne des huiles essentielles de Menthe.....	52
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	54
CHAPITRE I : Utilisation des antibiotiques et de l’aromathérapie dans la gestion des mammites au tarissement dans le nord Algérien	54
1. Introduction	54
2. Matériel et méthodes	54
2.1. Le questionnaire	54
2.2. Thèmes abordés par le questionnaire	55
2.3. Population cible.....	55
2.4. Taux de participation.....	55
2.5. Localisation des participants	55
2.6. Analyse statistique.....	56
3. Résultats et discussion.....	57
3.1. Gestion de la période sèche	57
3.1.1. Taille du troupeau.....	57
3.1.2. Arrêt progressif et brutal de la traite au tarissement.....	57
3.2. Réactions des éleveurs pour le contrôle des mammites	59
3.2.1. Demande par les éleveurs d’un antibiotique intra-mammaire pour les vaches tarées (automédication).....	59
3.2.2. Traitement des vaches tarées.....	61
3.2.3. Début de l'antibiothérapie au tarissement.....	63
3.2.4. Antibiothérapie intra-mammaire et parentérale des vaches au tarissement.....	63
3.3. Fréquence des molécules et des familles d'antibiotiques utilisées comme untraitement intra-mammaire (IMM) des vaches tarées	64
3.4. Fréquence des molécules et familles d'antibiotiques utilisées comme un traitement par la voie parentérale chez la vache tarée.....	67
3.5. Pratiques de traitement des mammites	69
3.6. Efficacité du traitement au tarissement	71

3.7. Apparition des mammites après le traitement	71
3.8. Réalisation d'analyses bactériologiques	71
3.9. Facteurs liés à la survenue et à la récurrence des mammites chez les vaches tarées infusées par des antibiotiques intra-mammaires (ATB IMM).....	72
3.10. Alternatives aux antibiotiques pour le traitement des vaches tarées	81
3.10.1. Utilisation des obturateurs des trayons.....	81
3.10.2. Utilisation des plantes et des huiles essentielles dans le traitement des mammites	81
4. Conclusion.....	83
CHAPITRE II : Efficacité <i>in vitro</i> des huiles essentielles de lamiacées (<i>Thymus</i>, <i>Mentha</i> et <i>Origanum</i>) sur des souches cliniques de staphylocoques isolées de lait cru mammitique de vaches laitières	
1. Introduction	85
2. Matériel et méthodes	86
2.1. Matériel Végétal.....	86
2.2. Matériel Biologique.....	88
2.2.1. Souches de référence	89
2.2.2. Souches cliniques (isolées du lait cru).....	89
2.2.3. Identification et caractérisation des souches cliniques isolées	89
2.2.3.1. Prélèvement du lait et préparation des échantillons	89
2.2.3.2. Isolement des bactéries et aspect macroscopique des colonies	90
2.2.3.3. Aspect microscopique après coloration de Gram	90
2.2.3.4. Test de catalase.....	91
2.2.3.5. Test de coagulase libre	91
2.2.3.6. Tests biochimiques (galerie API STAPH).....	91
2.2.3.7. Test par Maldi-tof.....	92
2.2.3.8. Sensibilité aux antibiotiques.....	93
2.2.3.8.1. Préparation du milieu de culture.....	94
2.2.3.8.2. Préparation de l'inoculum et ensemencement bactérien	94
2.2.3.8.3. Lecture et interprétation des résultats.....	95
2.2.4. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne des HE	95
2.3. Caractérisation des huiles essentielles étudiées.....	96
2.3.1. Extraction des huiles essentielles	96
2.3.1.1. Dispositif d'extraction	96
2.3.1.2. Procédé d'extraction.....	97
2.3.1.3. Détermination du rendement d'extraction.....	98
2.3.2. Caractérisation chimique des huiles essentielles étudiées par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse (CPG-MS ou GC/MS)	98

3. Résultats et discussion.....	100
3.1. Rendement en huile essentielle des plantes étudiées.....	100
3.1.1. Rendement en HE d' <i>Origanum floribundum</i>	100
3.1.2. Rendement en HE d' <i>Origanum vulgare</i>	101
3.1.3. Rendement en HE de <i>Thymus munbyanus</i>	102
3.1.4. Rendement en HE de <i>Mentha pulegium</i>	103
3.2. Composition chimique des HE analysées par CPG-SM.....	104
3.2.1. Huile essentielle d' <i>Origanum floribundum</i>	104
3.2.2. Huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i>	105
3.2.3. Huile essentielle de <i>Thymus munbyanus</i>	107
3.2.4. Composition chimique de <i>Mentha pulegium</i>	110
3.3. Distribution géographique des souches identifiées	110
3.3.1. Distribution géographique des souches identifiées par API- Staph et MALDI-TOF.....	110
3.4. Sensibilité des souches de staphylocoques (cliniques et de référence) vis-à-vis des antibiotiques testés.....	112
3.4.1. Effets des antibiotiques sur les souches de staphylocoques étudiées	112
3.4.2. Profil global de sensibilité des souches de staphylocoques isolées.....	113
3.4.2.1. Activité des bêta-lactamines.....	114
3.4.2.1.1. Amoxicilline	114
3.4.2.1.2. Pénicilline.....	115
3.4.2.1.3. Céfalexine.....	115
3.4.2.1.4. Activité de la Streptomycine (famille des aminosides).....	116
3.4.2.1.5. Activité de la Spiramycine (famille des macrolides).....	116
3.4.2.1.6. Activité de la Gentamicine (famille des aminoglycosides).....	117
3.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne des HE	117
3.5.1. Huile essentielle d' <i>Origanum floribundum</i>	117
3.5.2. Huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i>	118
3.5.3. Huile essentielle de <i>Thymus munbyanus</i>	119
3.5.4. Huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	119
3.6. Comparaison entre les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et antibiotiques contre les souches de <i>Staphylococcus</i>	121
3.7. Concentrations minimales inhibitrices	122
3.7.1. Huile essentielle d' <i>Origanum floribundum</i>	123
3.7.2. Huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i>	123
3.7.3. Huile essentielle de <i>Thymus munbyanus</i>	124
3.7.4. Huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	124

4. Conclusion.....	125
CHAPITRE III : Essai <i>in vivo</i> des huiles essentielles d' <i>Origanum</i> dans le traitement des mammites chez la vache laitière	
1. Introduction	127
2. Matériel et méthodes	127
2.1. Origine de l'huile essentielle	127
2.2. Caractérisation de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> utilisée dans l'essai clinique.....	127
2.3. Efficacité <i>in vitro</i> de plusieurs dilutions d'huiles essentielles d'origan sur des souches témoins de référence	128
2.4. Essai <i>in vivo</i> de l'huile essentielle d'Origan	129
2.4.1. Zone d'étude.....	129
2.4.2. Animaux	129
2.4.3. Dose de l'huile essentielle	130
2.4.4. Échantillonnage	130
2.5. Analyse du lait cru.....	131
2.5.1. Test du CMT (California Mastitis Test).....	131
2.5.2. Analyses microbiologiques :	131
2.6. Analyse statistique :.....	131
3. Résultats et discussion.....	132
3.1. Caractérisation de l'huile essentielle d'Origan.....	132
3.2. Effet <i>in vitro</i> de l'huile essentielle d'origan sur des souches témoins de référence.....	132
3.3. Qualité microbiologique des échantillons du lait cru	136
3.4. Effet <i>in vivo</i> de l'huile essentielle d'origan sur le nombre de bactéries mésophiles aérobies totales (BMAT)	138
3.5. Effet <i>in vivo</i> de l'huile essentielle d'origan sur le nombre de staphylocoques à coagulase positive (SCP).....	139
3.6. Effet de l'huile essentielle d'origan sur le rapport du nombre de SCP par les BMAT.....	140
4. Conclusion.....	141
Conclusion générale	142
Recommandations	143
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144
Annexes.....	170
Publications	182

Résumé

La période de tarissement est connue pour son adéquation au contrôle antimicrobien des infections intramammaires (IIMs) staphylococciques. Le présent travail vise l'étude prospective de l'utilisation des huiles essentielles (aromathérapie) au moment du tarissement pour le contrôle des mammites staphylococciques dans les conditions d'élevages laitiers algériens. Cette étude repose premièrement sur le recueil des informations sur l'utilisation actuelle des antibiotiques, de la phytothérapie et de l'aromathérapie durant le tarissement via une enquête par questionnaire. Ensuite, une évaluation *in vitro* de l'efficacité de certaines huiles essentielles de lamiacées (Thym, Origan, Menthe) sur des souches de staphylocoques isolées du lait de vaches souffrant de mammites récurrentes a été réalisée afin de sélectionner la ou les huiles essentielles à tester pour leurs activités antimicrobiennes *in vivo*. Notre enquête a permis d'identifier le non-respect des pratiques zootechniques conseillées pendant la période sèche comme un facteur de risque d'un mauvais état sanitaire de la mamelle et de la non-efficacité de l'antibiothérapie au tarissement (DCT). Cette dernière est fréquemment pratiquée et de manière sélective dans 86,49% des cas quel que soit l'état de santé du pis. En outre, une automédication ainsi qu'une utilisation anarchique et sélective de certaines molécules, principalement des β -lactamines avec la céfalexine comme la plus perfusée en intramammaire (40,54%), ont été relevées. À l'issue de cette enquête, des perspectives intéressantes sur la possibilité d'utiliser la phytothérapie et l'aromathérapie comme approches complémentaires ou palliatives pour contrôler la mammite et réduire l'utilisation d'antibiotiques ont été confirmées. L'étude des activités antibactériennes, *in vitro* et *in vivo*, de trois huiles essentielles issues de trois plantes de la famille des Lamiacées (*Mentha*, *Origanum* et *Thymus*) sur les bactéries responsables de mammites a montré leurs effets très significatifs sur les différentes souches de *Staphylococcus aureus*. Le diamètre d'inhibition le plus élevé a été obtenu pour l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* (41,07 mm) et la concentration minimale inhibitrice (CMI) la plus basse a été enregistrée pour l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* (0,01%). L'application de cette huile *in vivo* sur les mamelles des vaches présentant des mammites subcliniques a montré une diminution significative ($P < 0,001$) du nombre des bactéries mésophiles aérobies totales (BMAT) et une diminution non significative ($P > 0,05$) des staphylocoques à coagulase positive (SCP). L'utilisation des huiles essentielles semble être une approche prometteuse pour que les acteurs de la filière lait algérienne s'inscrivent dans le concept de « One Health ».

Mots Clés : Huiles essentielles, Lamiacées, Mammites, *Staphylococcus*, Tarissement, Vache

Abstract

The dry period is known for its suitability for antimicrobial control of staphylococcal intramammary infections (IIMs). The present work aims to prospectively study the use of essential oils (aromatherapy) at the drying off for the control of staphylococcal mastitis in the conditions of Algerian dairy farms. This study is based on the collection of information regarding the current use of antibiotics, phytotherapy, and aromatherapy during the dry period via a questionnaire survey. Then, an *in vitro* evaluation of the efficacy of some essential oils of Lamiaceae (Thyme, Oregano, Mint) on *Staphylococcus* strains isolated from the milk of cows suffering from recurrent mastitis was carried out to select the essential oil(s) to be tested for their *in vivo* antimicrobial activities. Our survey identified noncompliance with recommended zootechnical practices during the dry period as a risk factor for poor udder health and non-effectiveness of antibiotic therapy at drying off (DCT). The latter is a common practice and is selective in 86.49% of cases, regardless of the health status of the udder. In addition, self-medication, anarchic and selective use of some molecules, mainly β -lactams with cefalexin as the most infused intramammary antibiotic (40.54%), were noted. This survey confirmed interesting perspectives on the possibility of using phytotherapy and aromatherapy as complementary or palliative approaches to control mastitis and reduce antibiotic use. The study of the antibacterial activities, *in vitro* and *in vivo*, of three essential oils from three plants of the Lamiaceae family (*Mentha*, *Origanum* and *Thymus*) against bacteria causing mastitis has shown their very significant effects on different strains of *Staphylococcus aureus*. The highest inhibition diameter was obtained with the essential oil of *Thymus munbyanus* (41.07 mm). The lowest minimum inhibitory concentration (MIC) was recorded with the essential oil of *Origanum vulgare* (0.01%). The application of this oil *in vivo* on udders of cows with subclinical mastitis showed a significant ($P < 0.001$) decrease in total aerobic mesophilic bacteria (TAMB) and a non-significant ($P > 0.05$) decrease in coagulase-positive staphylococci (CPS). The use of essential oils seems to be a promising option for the actors of the Algerian dairy sector to join the "One Health" concept.

Keywords: Essential oils, Lamiaceae, drying off, Mastitis, *Staphylococcus*, Cow.

المُلخَص

تُعرف فترة التجفيف التي تتوقف فيها البقرة عن اعطاء الحليب بمدى ملاءمتها للسيطرة على إصابة الضرع بالمكورات العنقودية (IIMS) بواسطة مضادات الميكروبات. يهدف العمل الحالي إلى دراسة الآفاق المستقبلية لاستخدام الزيوت الأساسية (العلاج بالروائح) في فترة التجفيف لمكافحة التهاب الضرع العنقودي في ظروف مزارع إنتاج الحليب الجزائرية. اعتمدت هذه الدراسة في المقام الأول على جمع المعلومات حول الاستخدام الحالي لأنواع مختلفة من مضادات الميكروبات (المضادات الحيوية، العلاج النباتي والعلاج العطري) خلال فترة التجفيف من خلال مسح استبيان. بعد ذلك ، تم إجراء تقييم في المختبر لفعالية بعض الزيوت الأساسية للنباتات الشفوية (المردقوش ، الزعتر ، النعناع) على سلالات المكورات العنقودية المأخوذة من عينات حليب الأبقار التي تعاني من التهاب الضرع المتكرر من أجل اختيار الزيت أو الزيوت الأساسية المراد اختبار أنشطتها المضادة للميكروبات عند الكائن الحي. حدد المسح الذي أجريه عدم امتثال مربي الأبقار لأساسيات تربية الحيوانات التي ينصح بها خلال فترة التجفيف كعامل خطر لتدهور صحة الضرع وللعلاج غير الفعال بالمضادات الحيوية في هذه الفترة (DCT). تتم ممارسة هذا الأخير بشكل متكرر و انتقائي في 86.49% من الحالات بغض النظر عن الحالة الصحية للضرع. بالإضافة إلى ذلك ، لوحظ استخدام العلاج الذاتي والفوضوي والانتقائي لبعض الجزيئات ، بشكل رئيسي البيتا لاكتامين (β -lactams) حيث كان سيفالوكسين أكثر المضادات الحيوية استعمالاً داخل الضرع (40.54%). على ضوء هذا التحقيق، تم تأكيد وجهات نظر مثيرة للاهتمام حول إمكانية استخدام طب الأعشاب والعلاج العطري كنهج تكميلي أو ملطف للسيطرة على التهاب الضرع وتقليل استخدام المضادات الحيوية. أظهرت دراسة الأنشطة المضادة للبكتيريا ، في المختبر وفي الجسم الحي ، لثلاثة زيوت أساسية من ثلاثة نباتات من العائلة الشفوية (المردقوش ، الزعتر ، النعناع) ضد البكتيريا المسببة لالتهاب الضرع، تأثيرها الكبير جداً على سلالات مختلفة من المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus*. تم الحصول على أعلى قطر تثبيط للزيت العطري من المردقوش *Thymus munbyanus* بقطر 41.07 مم وأدنى تركيز مثبط (MIC) تم تسجيله للزيت العطري للزعتر (*Origanum vulgare* 0.01%). أظهر تطبيق هذا الأخير في الجسم الحي على الأبقار المصابة بالتهاب الضرع تحت السريري انخفاضاً محسوساً ($P < 0.001$) في عدد البكتيريا الهوائية الوسطية الكلية (BMAT) وانخفاض غير محسوس ($P > 0.05$) في المكورات العنقودية موجبة التخثر (SCP). يبدو أن استخدام الزيوت العطرية نهج واعد للفاعلين في قطاع إنتاج الحليب الجزائري للانخراط في مفهوم "الصحة الواحدة". "الصحة الواحدة".

الكلمات المفتاحية: زيوت عطرية، الفصيلة الشفوية، تجفيف، التهاب الضرع، المكورات العنقودية، بقرة

Liste des abréviations

ACH : Analyse en Cluster Hiérarchique

ACM : Analyse des Correspondances Multiples

AFNOR : Association Française de Normalisation

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

ATP : Adénosine Triphosphate

BMAT : Bactéries Mésophiles Aérobie Totales

CCS : Concentration des Cellules Somatiques

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMT : California Mastitis Test

COV : Composés Organiques Volatils

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse

DCT: Dry Cow Therapy (Antibiothérapie au tarissement)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

g : Gramme

HCCA : alpha-cyano-4-hydroxycinnamique ou α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid

HE : Huile Essentielle

HV : Huile végétale

IIM : Infection Intra-mammaire

IL-1 β : Interleukine 1 bêta

IMM: Intra-Mammaire

Kg: Kilogramme

LMR : Limite maximale de résidus

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

mL : Millilitre

MSI : Matière sèche ingérée

NF-kB: Nuclear Factor-kappa B

PDI : Protéines digestibles dans l'intestin

MRSA : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline

MSSA : Staphylococcus aureus sensible à la méthicilline

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

SCP : Staphylocoques à Coagulase Positive

UFC : Unité Formant Colonie

UFL : Unité fourrage lait

Liste des tableaux

Tableau 1. Recommandations nutritionnelles des vaches durant le tarissement (Christophe, 2018)...	12
Tableau 2. Caractéristiques nécessaires à la croissance et la toxinogénèse de <i>S. aureus</i> (Anses, 2011).	20
Tableau 3. Régions de distribution des sous-espèces d' <i>O. vulgare</i> dans le monde (Alekseeva <i>et al.</i> , 2020).....	43
Tableau 4. Répartition géographique des espèces d'origan en Algérie (Mahfouf, 2018)	44
Tableau 5. Caractéristiques de la gestion de la période sèche dans les troupeaux couverts par l'enquête dans le nord de l'Algérie	59
Tableau 6. Approches adoptées par les éleveurs pour lutter contre la mammite dans la zone étudiée .	61
Tableau 7. Caractéristiques du traitement au tarissement dans les troupeaux couverts par l'enquête dans le nord de l'Algérie.	70
Tableau 8. Efficacité du traitement au tarissement sur la survenue et la récurrence des mammites pendant les périodes du tarissement et du post-partum	72
Tableau 9. Contributions des variables aux mesures de discrimination	73
Tableau 10. Comparaison des catégories de variables pertinentes au sein des clusters dans les deux dimensions.....	80
Tableau 11. Opportunité d'appliquer une alternative aux antibiotiques dans les troupeaux du nord algérien	83
Tableau 12. Rendements en huiles essentielles des différentes plantes étudiées	100
Tableau 13. Quelques rendements en HE d' <i>O. floribundum</i> de différentes régions algériennes	101
Tableau 14. Rendements en HE d' <i>O. vulgare</i> dans quelques pays du monde	102
Tableau 15. Rendements en HE de <i>Thymus munbyanus</i> en Algérie et au Maroc	103
Tableau 16. Rendements en HE de <i>Mentha pulegium</i> en Algérie et dans certaines régions du monde	104
Tableau 17. Composition de l'huile essentielle d' <i>Origanum floribundum</i>	105
Tableau 18. Composition de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> (Constantine)	107
Tableau 19. Composition de l'huile essentielle de <i>Thymus munbyanus</i> (Constantine).....	109
Tableau 20. Distribution géographiques des souches cliniques isolées et identifiées par galerie biochimique (API Staph) et par MALDITOF-MS	111
Tableau 21. Effet des antibiotiques sur les souches du genre <i>Staphylococcus</i> (Cliniques et ATCC) .	113
Tableau 22. Profil de sensibilité des souches de staphylocoques isolées	114
Tableau 23. Effet des huiles essentielles de lamiacées sur les souches du genre <i>Staphylococcus</i> (Cliniques et ATCC)	121
Tableau 24. Comparaison entre les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et antibiotiques contre les souches de <i>Staphylococcus</i>	122
Tableau 25. Composition chimique de l'huile essentielle d'origan testée.	134
Tableau 26. Effet inhibiteur de l'huile essentielle d'origan sur les souches témoins de référence à plusieurs dilutions.....	135
Tableau 27. Prévalence des niveaux de numération des bactéries dans les échantillons de lait cru avant et après l'application de l'huile essentielle d'origan.....	137
Tableau 28. Prévalence des niveaux de numération des bactéries dans les échantillons de lait cru avant et après l'application de l'huile essentielle d'origan.....	140

Liste des figures

Figure 1. Période du tarissement dans le cycle de production des vaches laitières (Lehmann, 2016). ...	4
Figure 2. contrôle endocrinien de la mammogénèse (Jammes et Djiane, 1988).	8
Figure 3. Durée de la phase intermédiaire d’involution mammaire par rapport à la durée du tarissement (Sérieys, 2015).	10
Figure 4. Evolution du nombre de cellules mammaires durant le cycle de production de la vache laitière (Serieys, 2007).	11
Figure 5. <i>Staphylococcus aureus</i> identifié au microscope électronique (Aldujaily <i>et al.</i> , 2019).	15
Figure 6. Transmission des bactéries résistantes aux antibiotiques de l’animal à l’homme (Mano, 2016).	21
Figure 7. Périodes à risque pour le développement de nouvelles IIM (Bradley et Green, 2004).	22
Figure 8. Extraction de l’huile essentielle par hydrodistillation (Mahfud <i>et al.</i> , 2017).	33
Figure 9. Extraction d’huile essentielle par entrainement à la vapeur d’eau (Patience <i>et al.</i> , 2018).	34
Figure 10. Différentes actions des HE sur la croissance bactérienne (Aromabio, 2022).	36
Figure 11. Dessin d’ <i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> d’après Ietswaart (Ietswaart, 1980).	42
Figure 12. Zone de distribution du genre <i>Origanum</i> dans le monde (Figueredo, 2007).	43
Figure 13. <i>Thymus vulgaris</i> (David, 2019).	47
Figure 14. <i>Mentha pulegium</i> L. (Sutour, 2010).	51
Figure 15. Localisation géographique des répondants au nord-est algérien.	56
Figure 16. Critères de sélection pour le traitement des vaches au tarissement.	62
Figure 17. Molécules d'antibiotiques intra-mammaires utilisées pour le traitement de la vache tarie ..	65
Figure 18. Familles d'antibiotiques intra-mammaires utilisées pour le tarissement des vaches taries.	66
Figure 19. Molécules d'antibiotiques utilisées par voie parentérale pour le traitement des mammites des vaches taries	68
Figure 20. Familles des antibiotiques parentéraux utilisés pour le traitement des mammites au tarissement.	69
Figure 21. Graphique des mesures de discrimination à l'aide de l'analyse des correspondances multiples (ACM).	75
Figure 22. Contribution des modalités de questions dans les mesures de discrimination à l'aide d'une solution d'Analyse des Correspondances Multiples bidimensionnelle.	76
Figure 23. Scores des groupes d'objets étiquetés par les répondants à l'aide de la méthode ACH.	78
Figure 24. Dendrogramme de classement utilisant le lien moyen entre groupes des répondants.	79
Figure 25. Plantes de Thym (1), de Menthe (2) et d’Origan de (3 et 4) récoltées au niveau de la région de Constantine (Originale, 2021).	87
Figure 26. Localisation des régions (encerclées en noir) d’échantillonnage du lait (Constantine, El Tarf, et Souk-Ahras) et de collecte d’ <i>Origanum vulgare</i> (Constantine et Sétif), d’ <i>Origanum floribundum</i> (Guelma), de <i>Thymus munbyanus</i> (Constantine), de <i>Mentha pulegium</i> (Constantine et El Tarf) dans les groupes de végétation forestière de l’Algérie (FAO, 2012).	88
Figure 27. Dissout de la gélose Chapman et préparation des milieux de culture (Originale, 2021).	90
Figure 28. Préparation des suspensions bactériennes et inoculation de la galerie API (Originale, 2021)	92
Figure 29. MALDI-TOF MICROFLEX LT de BRUKER utilisé pour le test Maldi-tof (Originale, 2021).	93
Figure 30. Préparation des inoculums à partir des différentes souches bactériennes (Originale, 2021).	95
Figure 31. Application des disques, imprégnation de l’HE et lecture des résultats (Originale, 2021)..	96

Figure 32. Hydrodistillateur de type Clevenger (Originale, 2021).....	97
Figure 33. Pesée et extraction des HE par hydrodistillation (Originale, 2021).....	98
Figure 34. Analyse de l'huile essentielle par CPG-SM (Originale, 2021).	99
Figure 35. Distribution géographique des souches de Staphylocoques (aureus et non aureus).	112
Figure 36. Concentration minimale inhibitrice de la croissance de Staphylococcus aureus des différentes huiles essentielles des lamiacées	123
Figure 37. Localisation de la zone d'étude dans la wilaya de Constantine (Commune d'El Khroub).129	
Figure 38. Application de l'HE d'origan par massage cutané mammaire (Originale, 2021).	130
Figure 39. CPG-SM et pics des différents composés de l'huile essentielle d'origan.....	133

Introduction

Le lait de vache est considéré parmi les denrées alimentaires les plus consommées par toutes les populations du monde (Cobirka *et al.*, 2020). L'Algérie est un importateur majeur de la poudre du lait et des dérivés laitiers avec une facture globale estimée à 1,40 milliard de Dollar en 2018 (Meklati *et al.*, 2020). Afin de pallier ce problème d'importation, l'augmentation de la production laitière nationale par le développement de l'élevage laitier local est actuellement devenue une priorité. La santé du pis des vaches laitières est essentielle pour assurer une production maximale de lait, du fait que l'atteinte du pis (mammites principalement) affecte le bien-être des vaches et entraîne une diminution de la qualité et de la quantité du lait produit (Hovinen et Pyörälä, 2011).

La mammite reste l'une des trois maladies majeures des élevages laitiers, avant les troubles de reproduction et les boiteries, et qui affectent la rentabilité de ces élevages dans le monde entier (Angoujard, 2015; O'Rourke, 2009). Plus de 137 organismes différents ont été identifiés comme étant des agents responsables de la mammite bovine, y compris bactéries, virus, mycoplasmes, levures et algues (Crispie *et al.*, 2004), et le contrôle de cette pathologie passe par l'utilisation des antibiotiques, en lactation et en période de tarissement, cependant le traitement pendant la période de lactation est non rentable et coûteux pour l'éleveur à cause du lait jeté durant la période de traitement.

Le tarissement est la période optimale pour le traitement des infections intra-mammaires, le traitement au tarissement consiste en une infusion d'antibiotiques et/ou de produits de scellement (obturateurs) des trayons dans les quartiers du pis de la vache le jour du tarissement dans le but de prévenir et de traiter les infections pendant la période de tarissement (Pattamanont *et al.*, 2020). Cependant la forte utilisation des antibiotiques notamment dans un but préventif est actuellement très contestée à cause d'énormes problèmes, d'antibiorésistance et de résidus des antibiotiques dans le lait et d'autres denrées alimentaires, qu'elle engendre.

Ainsi, dans ce sens, nous avons visé à prospecter l'utilisation de certaines huiles essentielles extraites de quelques plantes aromatiques de la famille des Lamiacées, à savoir, *Mentha*, *Origanum* et *Thymus*, comme produits naturels (considérés sans risques) dans la lutte contre les mammites staphylococciques de tarissement chez les vaches laitières.

Notre projet s'est axé sur une investigation épidémiologique et des essais de laboratoire et clinique. Dans un premier temps, une enquête, destinée aux vétérinaires praticiens du nord algérien, a été effectuée, dont l'objectif est de mettre en évidence la situation réelle de la

gestion de la période du tarissement par les éleveurs des exploitations suivies par les vétérinaires enquêtés, et ainsi déceler les principales molécules d'antibiotiques fréquemment utilisées pour le traitement des mammites au tarissement comme éventuel facteur de risque d'antibiorésistance et la possibilité d'utilisation d'autres moyens de lutte contre les mammites tels que les huiles essentielles.

La deuxième partie de notre travail a été consacrée au travail du laboratoire, premièrement par l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes qui ont fait l'objet de notre étude, et par la suite, l'étude des effets *in vitro* (aromatogramme) de ces huiles essentielles sur des souches cliniques du genre *Staphylococcus* responsables des mammites.

La dernière partie de notre étude a été dédiée à la réalisation des tests *in vivo*, par l'application de l'huile essentielle d'*Origanum*, par massage cutané, sur le pis des vaches ayant des mammites subcliniques et qui ont répondu positivement au test de CMT.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Gestion du tarissement chez la vache laitière

1. Importance de la période de tarissement

Du point de vue physiologique, la femelle a besoin d'une phase de repos pour la reconstitution de ses réserves et pour faire face aux besoins de la gestation qui sont de plus en plus importants grâce à une alimentation optimale et aux progrès génétiques (Bernier-Dodier *et al.*, 2011). La durée optimale recommandée du tarissement est de 40 à 60 jours (Odensten, 2006). Cependant, la durée de la période tarie peut varier avec certains facteurs, tels que la parité, l'intervalle de vêlage et le niveau de production laitière (Grummer et Rastani, 2004). Une augmentation de la durée du tarissement peut augmenter le coût de production (alimentation, frais vétérinaires, mains d'œuvre...), et provoquer une diminution de la production laitière pendant la lactation suivante (Useni *et al.*, 2014).

Le tarissement est une période importante dans le cycle de production des vaches laitières car il constitue pour le pis des vaches une période de régénération cellulaire avec un renouvellement de l'épithélium alvéolaire entre les deux lactations et une réparation des tissus mammaires (Rajala-Schultz *et al.*, 2018; Steeneveld *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2021), ainsi il constitue une période de repos pour la vache avant la naissance du veau suivant (Trajkovska *et al.*, 2021). Il permet aussi une involution de la glande mammaire et une production laitière maximale pendant la lactation suivante (Pezeshki *et al.*, 2007).

Une période de tarissement de moins de 40 jours entraîne une réduction de la production laitière au cours de la lactation suivante (Odensten, 2006; Bernier-Dodier *et al.*, 2011), ceci est dû à des glandes mammaires moins développées à cause d'une période de tarissement insuffisante (O'Hara, 2019), ainsi qu'à un temps insuffisant pour reconstituer les réserves corporelles avec réduction de la régénération de l'épithélium mammaire et des événements endocriniens incomplets autour du vêlage (Useni *et al.*, 2014).

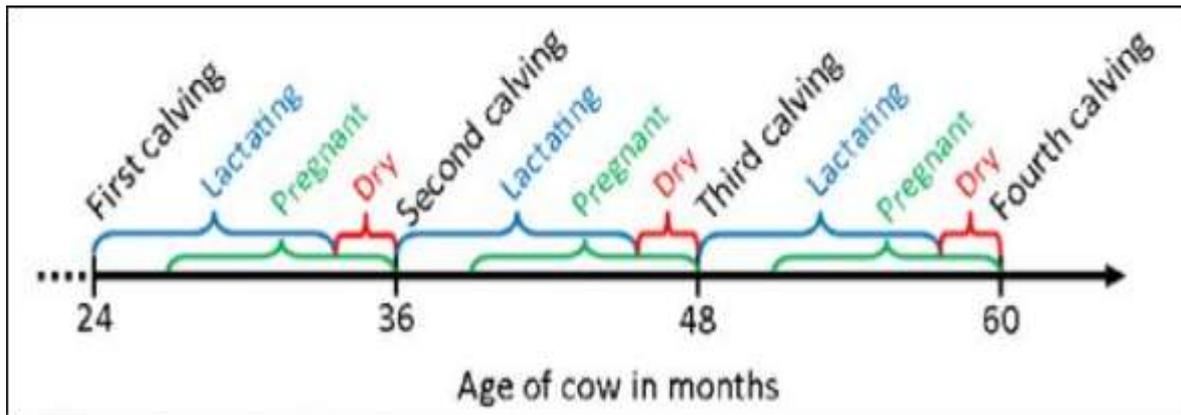


Figure 1. Période du tarissement dans le cycle de production des vaches laitières (Lehmann, 2016).

1.1. Lactation continue jusqu'au vêlage

Le conseil de tarir les vaches laitières 6 à 8 semaines avant le vêlage remonte au 19^{ème} siècle et permet de maximiser la production laitière pendant la lactation suivante (van Knegsel *et al.*, 2014). Raccourcir ou omettre la période de tarissement améliore le bilan énergétique et le statut métabolique des vaches laitières en début de lactation (Kok *et al.*, 2019; Odensten, 2006). Cependant elle diminue la production laitière durant la prochaine lactation où une omission totale du tarissement (lactation continue) diminue la production du lait après la lactation de 20 à 40% (Andersen *et al.*, 2005). Également, après une période d'amélioration en début de lactation, les vaches qui n'ont pas une période de tarissement ont tendance à s'engraisser et peuvent avoir une persistance de lactation trop faible pour être traitées en continu jusqu'au début de la lactation suivante (Kok *et al.*, 2019). Aussi, une qualité médiocre du colostrum pour les veaux a été signalé chez les vaches à lactation continue ce qui indique que la période de colostrogénèse n'est pas suffisante chez les vaches ayant un tarissement raccourcis ou supprimé (Pezeshki *et al.*, 2010).

D'autre part, la modification de la longueur de la période sèche contribue à l'augmentation de l'incidence des nouvelles infections intra-mammaires par l'accumulation du lait dans les glandes mammaires lors du tarissement précoce et tardivement par la colostrogénèse (Pezeshki *et al.*, 2010).

2. Arrêt de la traite

Selon les pays et les troupeaux, les pratiques d'arrêt du lait différent comprennent diverses méthodes telles que des changements dans la fréquence de traite et de l'alimentation, l'utilisation d'antibiotiques pour vaches tarées, l'utilisation d'obturateurs des trayons ainsi que des changements du logement des vaches (Vilar *et al.*, 2020). Selon

Larsen *et al.*, 2021, dans une étude réalisée sur 119 vaches Holstein, la production laitière a été réduite de 30% une semaine avant la date du tarissement lorsque la quantité d'alimentation ou la fréquence de traite a été réduite, et réduite de 45% lorsque la quantité d'alimentation et la fréquence de traite ont été réduites simultanément.

L'arrêt de la traite peut être effectué lentement sur quelques jours (arrêt progressif) ou brutalement sur un seul jour (arrêt brutal) (Rajala-Schultz *et al.*, 2018).

2.1. Arrêt brutal

Le tarissement brutal consiste à arrêter brusquement la traite (Pattamanont *et al.*, 2020). L'arrêt brutal de la traite se produit lorsque la traite quotidienne normale se termine à un jour donné qui est généralement déterminé par la date prévue du vêlage et durée souhaitée du tarissement (Rajala-Schultz *et al.*, 2018). La méthode d'arrêt brutal en un jour de lactation présente certains inconvénients et est considérée comme inappropriée pour les vaches laitières actuelles en raison des problèmes du bien-être et des risques d'infections intra-mammaires (Steenefeld *et al.*, 2019).

2.2. Arrêt progressif

L'arrêt progressif de la traite appelée aussi traite intermittente se produit lorsque les vaches sont sevrées de la traite sur une période de plusieurs jours ou plusieurs semaines. C'est une méthode généralement recommandée qui permet d'éviter certains effets indésirables (Rajala-Schultz *et al.*, 2018; Steenefeld *et al.*, 2019). La principale raison d'utiliser le tarissement progressif s'explique par le fait qu'une production laitière plus faible au tarissement est souvent associée à un risque moindre de mammite lors de la lactation suivante. Le tarissement progressif est obtenu par une traite progressive, une alimentation progressive ou une administration d'un inhibiteur de la prolactine (Pattamanont *et al.*, 2020).

3. Changements physiologiques au tarissement

3.1. Changement endocrinien durant le tarissement en rapport avec la gestation

Le tarissement correspond à une période pendant laquelle la vache laitière subit certaines modifications physiologiques telles que : déséquilibres hormonaux successifs, involution mammaire suivie d'une régénération du tissu mammaire, le rumen est modifié en structure et en taille, et des besoins alimentaires et un métabolisme très différents de

ceux en période de lactation (Jannot, 2015). Il s'agit d'une série complexe d'événements endocriniens conduisant à la maturation finale du placenta et du veau, les différents facteurs endocriniens reflètent différents organes et tissus d'origine à la fois maternelle et fœtale (Kindahl *et al.*, 2002), et aboutit aussi à la différenciation des cellules de la glande mammaire qui deviennent prêtes à la sécrétion du lait qui commencera aux alentours de la mise bas (Clerentin, 2014).

3.1.1. Progestérone

La progestérone est une hormone stéroïde qui est sécrétée par le corps jaune et le placenta. Sa sécrétion est cruciale pour le maintien de la gestation jusqu'au vêlage chez les bovins. La production ovarienne de la progestérone est nécessaire pendant au moins 280 jours, et sa concentration chute juste avant la mise bas (Anderson *et al.*, 1999; Jannot, 2015; Lonergan, 2015). Pendant la période sèche, la progestérone est considérée parmi les hormones qui conditionnent les phénomènes de croissance et de renouvellement du tissu sécrétoire mammaire et intervient comme un inducteur de la prolifération des cellules épithéliales mammaires et inhibent leur différenciation (Buttin, 2020). Cette inhibition de la différenciation est retirée progressivement avec l'augmentation du rapport œstrogènes/progestérone durant les dernières semaines de la gestation (Jannot, 2015).

3.1.2. Œstrogènes

La sécrétion des œstrogènes est assurée par le fœtus et le placenta et leur concentration augmente progressivement durant la gestation jusqu'à la mise bas puis elle chute brutalement à la mise bas (Clerentin, 2014). Les œstrogènes, comme la progestérone, jouent un rôle d'inducteurs de la prolifération des cellules épithéliales mammaires et inhibent leurs différenciation durant la gestation (Jannot, 2015).

3.1.3. Prolactine

La prolactine a été l'hormone la plus intensément étudiée qui est en relation avec la croissance de la glande mammaire, et est considérée comme un membre de la famille des cytokines et certaines études cliniques et *in vitro* suggèrent que la prolactine a des propriétés immunostimulatrices déclenchant des réponses immunitaires pro-inflammatoires (García-Ispuerto *et al.*, 2009). La prolactine est parmi les hormones responsables de la mammogénèse. Sa production augmente avant le vêlage et elle permet la différenciation du tissu sécrétoire, puis son taux plasmatique augmente très brutalement quelques jours avant

le vêlage, ce qui déclenche la sécrétion plus massive du lait avec un moindre passage d'immunoglobulines dans le lait (Buttin, 2020).

3.1.4. Facteurs de croissance

Lors de la gestation, les facteurs de croissance conditionnent les phénomènes de croissance et de renouvellement du tissu sécrétoire mammaire. Ces facteurs sont contrôlés par les œstrogènes fœtoplacentaires, et ils ont différentes fonctions dans la croissance de la glande mammaire avec un effet sur la croissance des cellules épithéliales et sur la synthèse de la matrice extracellulaire (Clerentin, 2014; Buttin, 2020).

3.1.5. Hormone de croissance (GH)

L'hormone de croissance est un régulateur direct de la production du lait. Elle stimule la néoglucogenèse et la dégradation du tissu adipeux conduisant à la formation du glucose et des acides gras libres qui sont ensuite utilisés pour la formation des composants du lait. Elle stimule également la production mammaire d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor One), qui est localement présent dans le tissu mammaire comme facteur de survie cellulaire et facteur anti-apoptotique et intervient dans la régulation des fonctions de croissance et de sécrétion, permettant de fournir à la mamelle plus d'unités fonctionnelles dans le temps et par conséquent améliore la persistance de la lactation (Clerentin, 2014; Hoeij, 2017). La concentration sanguine de l'hormone de croissance augmente en fin de gestation, mais sa concentration dans la glande mammaire reste faible et semble être non indispensable à sa croissance (Clerentin, 2014).

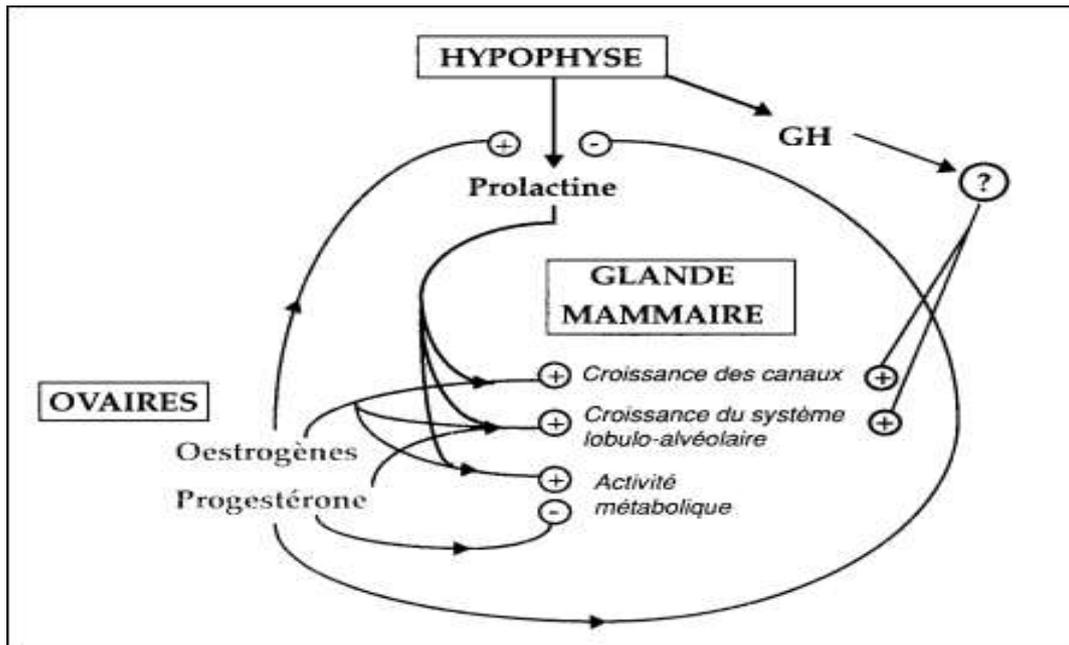


Figure 2. contrôle endocrinien de la mammogénèse (Jammes et Djiane, 1988).

3.2. Glande mammaire

La glande mammaire chez la vache subit un remodelage intensif pendant le cycle de lactation et l'escalade de ce processus est observée pendant la période sèche. Pendant le tarissement la mamelle est exposée à des transformations anatomiques et physiologiques désignées sous le nom d'involution mammaire. Il existe 3 types d'involution mammaire, l'involution graduelle qui est la régression de la lactation au cours de la progression d'une lactation normale, l'involution sénile qui se produit à la fin de la vie reproductive et l'involution active ou l'involution initiée qui se produit après l'arrêt de la traite pendant un sevrage forcé ou naturel (Clerentin, 2014; Zhao *et al.*, 2019). L'involution mammaire s'effectue en trois phases successives : une phase initiale, une phase intermédiaire et une phase terminale de l'involution ou phase de colostrogénèse (Clerentin, 2014).

3.2.1. Phase initiale d'involution

L'involution mammaire peut être définie comme le processus par lequel la glande mammaire revient à un état non lactant. Elle débute dans les 24 à 36 heures après l'arrêt de la traite (Zhao *et al.*, 2019; Buttin, 2020). Durant cette phase d'involution initiale le cytoplasme des cellules sécrétrices mammaires se désorganise, entraînant de ce fait la régression finale de la lactation (Jannot, 2015; Christophe, 2018). Le type principal de mort cellulaire responsable de l'involution mammaire est l'apoptose (Motyl *et al.*, 2007). L'involution mammaire peut être induite à n'importe quel stade de la lactation mettant fin

à l'extraction du lait (Pezeshki *et al.*, 2010). Le stimulus qui déclenche le processus d'involution mammaire chez la vache reste encore incertain, quoi que la stase du lait qui se produit après l'arrêt de la traite pourrait entraîner l'accumulation dans les glandes mammaires des facteurs qui inhibent la synthèse et la sécrétion du lait en diminuant l'activité des cellules épithéliales et le déclenchement de l'involution (Zhao *et al.*, 2019). Lors de l'involution mammaire et suite à l'arrêt de la traite, il y a une forte élimination des cellules épithéliales mammaires sénescents par apoptose (Charton, 2017). Cependant la structure alvéolaire du tissu mammaire bovin reste généralement intacte tout au long de la période sèche ce qui permet sa régénération rapide avant la mise-bas (Pezeshki *et al.*, 2010; Buttin, 2020). Certains auteurs ont émis l'hypothèse de l'effet de la réduction du nombre de traites par jour à une seule traite (monotraite) sur la perturbation du fonctionnement normal de la glande mammaire ce qui va provoquer son involution (Charton, 2017).

Après l'arrêt de la traite et dans le cadre du processus d'involution mammaire, il y a des changements dans la composition de la sécrétion de la glande mammaire avec la présence de concentrations élevées des facteurs de protection naturelle contre les agents pathogènes des mammites, tels que la lactoferrine. Cette dernière est considérée comme la première ligne de défense contre ces agents pathogènes et joue un rôle important dans l'immunologie de la glande mammaire (Newman *et al.*, 2009; Trajkovska *et al.*, 2021).

La lactoferrine est une protéine liant le fer qui est présente à des concentrations élevées dans les sécrétions des vaches tarées (Trajkovska *et al.*, 2021). En présence de bicarbonate, cette protéine a la propriété de séquestrer le fer le rendant indisponible pour les bactéries pathogènes ayant des besoins en fer notamment *E. coli* et *S. aureus* (Newman *et al.*, 2009; Jannot, 2015). De ce fait, la lactoferrine exerce une action antibactérienne importante. Cependant cette action antibactérienne ne s'exerce qu'en l'absence du citrate qui joue un rôle de compétiteur de la lactoferrine dans la séquestration du fer et le laisse disponible pour les bactéries pendant la lactation (Jannot, 2015; Buttin, 2020).

Ainsi, en début du tarissement et lors de la réduction du nombre de traites, il y a une augmentation de la concentration des cellules somatiques (CCS) avec une augmentation des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) dans le lait et l'activation du système immunitaire mammaire (Charton, 2017).

Concernant les trayons, il y a certaines modifications morphologiques et histologiques du canal du trayon durant le tarissement avec la formation d'un bouchon de kératine dans le canal du trayon qui joue un rôle important dans la sensibilité du pis aux infections intra-mammaires (IIM). Cependant il existe une grande différence entre les vaches concernant

le temps de formation de ce bouchon et son degré de fermeture (fermeture complète ou non) (Sargeant *et al.*, 2018). Ce temps est généralement plus long chez les vaches qui produisent beaucoup de lait et plus court lorsqu'un traitement antibiotique par voie locale est mis en place (Jannot, 2015).

3.2.2. Phase dite intermédiaire

Pendant la phase intermédiaire de l'involution mammaire, la mamelle ne sécrète plus de lait et est complètement involuée permettant la régénérescence du tissu mammaire ultérieurement (Heinen, 2019; Buttin, 2020). La longueur de cette phase est variable et peut être complètement absente si le vêlage a lieu 30 à 40 jours après l'arrêt de la lactation (Hanzen, 2016). Cette phase est considérée comme une période stationnaire pendant laquelle la glande mammaire est dans un état de repos (Zhao *et al.*, 2019). Au cours de cette phase, Les lactocytes forment des petits amas cellulaires et la mamelle possède une bonne résistance aux nouvelles infections bactériennes, grâce à la fermeture du canal du trayon et à l'accumulation des agents antimicrobiens (Heinen, 2019).

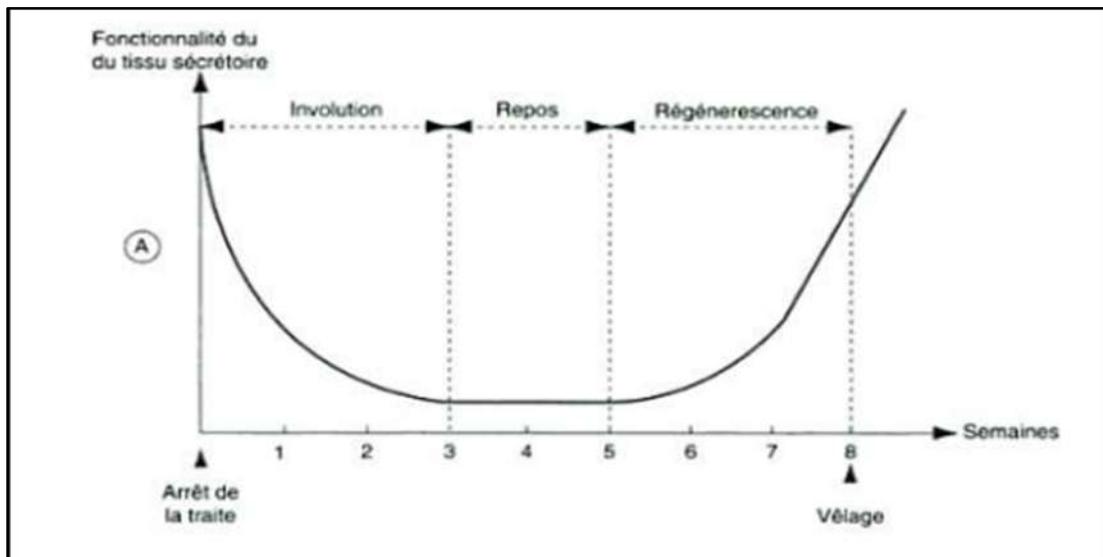


Figure 3. Durée de la phase intermédiaire d'involution mammaire par rapport à la durée du tarissement (Sérieys, 2015).

3.2.3. Phase terminale (colostrogénèse)

Pendant la phase terminale de l'involution mammaire, il y a certaines modifications hormonales qui vont déclencher la croissance exponentielle des cellules de la glande mammaire, il y a une régénérescence du tissu sécrétoire et la reprise de la sécrétion lactée qui commence avec la production du colostrum favorisée par l'action lactogénique de la

prolactine, qui est favorisée elle-même par la diminution de la concentration plasmatique en progestérone et l'augmentation de la concentration des œstrogènes (Clerentin, 2014; Christophe, 2018; Heinen, 2019). Cette phase a lieu deux à quatre semaines avant le vêlage, et sous l'effet de la distension mammaire, il y a une diminution de la longueur des trayon avec élimination du bouchon de kératine (Hanzen, 2016).

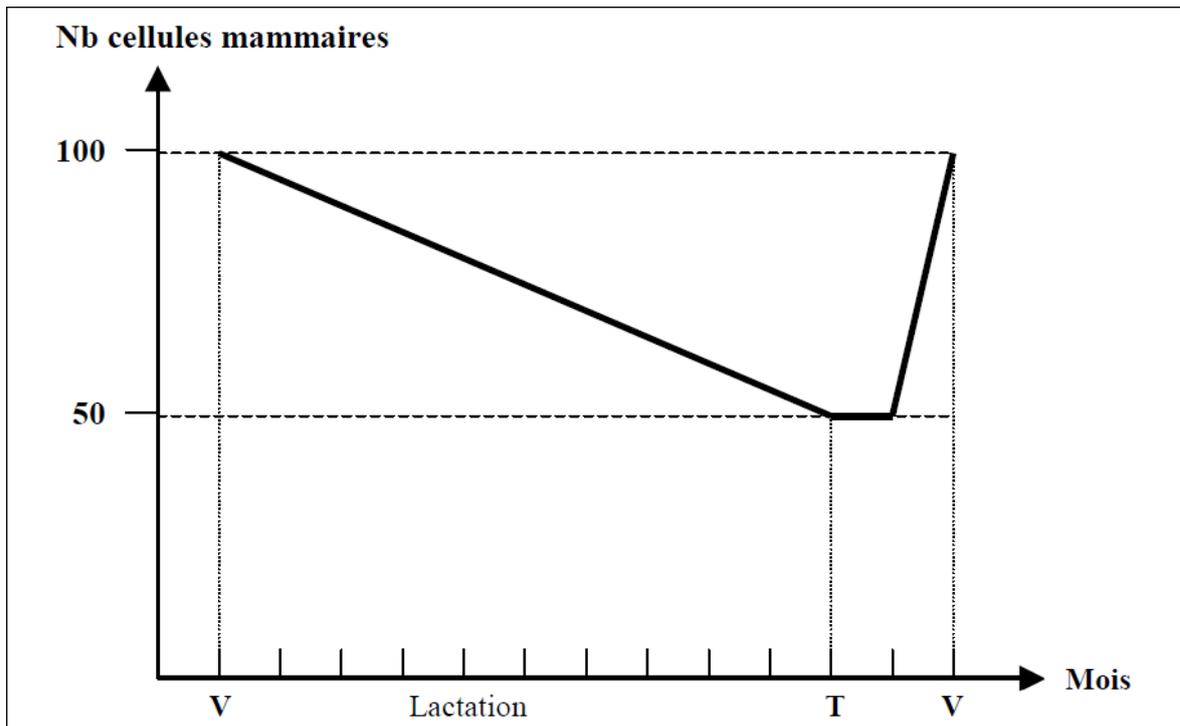


Figure 4. Évolution du nombre de cellules mammaires durant le cycle de production de la vache laitière (Serieys, 2007).

D'autres hormones interviennent également dans la régulation de la lactogénèse : il s'agit surtout des glucocorticoïdes qui sont nécessaires pour l'amplification de l'action de la prolactine au niveau des phénomènes sécrétoires mammaires, ainsi que des hormones non spécifiques de la lactation comme les hormones thyroïdiennes et l'hormone de croissance (GH) (Christophe, 2018).

4. Conduite du tarissement

4.1. Conduite alimentaire

La ration de la vache au tarissement doit permettre de couvrir les besoins physiologiques de la vache pendant cette période, à savoir les besoins d'entretien et de gestation (Heinen, 2019). Les besoins d'entretien sont généralement indépendants du stade

physiologique des vaches (Christophe, 2018). Cependant, durant la grande partie de la période sèche, les besoins des vaches sont suffisamment faibles et leur capacité d'ingestion est réduite (Clerentin, 2014).

Tableau 1. Recommandations nutritionnelles des vaches durant le tarissement (Christophe, 2018).

Poids vif (kg)	UFL	PDI (g)	MSI (kg/j)
500	4.8	345	10
550	5.2	370	13
600	5.5	395	16
650	5.8	420	19
700	6.2	445	22
750	6.5	470	25

UFL : Unité fourrage lait; PDI : Protéines digestibles dans l'intestin; MSI : Matière sèche ingérée.

CHAPITRE II : Les mammites staphylococciques et leur impact durant le tarissement

1. Définition

La mammite bovine est une inflammation des tissus de la glande mammaire en réponse à un traumatisme physique ou une infections par des micro-organismes (Cheng et Han, 2020). La mammite est actuellement la maladie la plus coûteuse en élevage laitier et reste l'un des principaux problèmes de l'industrie laitière car elle provoque des changements dans les tissus glandulaires affectant la qualité et la quantité du lait produit (Kashif *et al.*, 2016). D'un point de vue épidémiologique, les mammites peuvent être divisés en deux types selon leurs origines : mammites contagieuses et mammites environnementales (Sharun *et al.*, 2021).

Les mammites environnementales sont causés par des micro-organismes bactériens du milieu environnemental, qui sont appelés pathogènes environnementaux, par contre, les mammites contagieuses sont causées par des germes contagieux qui se propagent à partir des autres quartiers infectés (Cobirka *et al.*, 2020). *Staphylococcus aureus* est considérée comme une cause importante des infections intra-mammaires et est responsable des mammites contagieuses (Barkema *et al.*, 2006; Sharun *et al.*, 2021).

Les mammites peuvent être également classées selon leurs symptômes en : mammites cliniques et mammites subcliniques (Cobirka *et al.*, 2020).

1.1. Mammites subcliniques

La mammite subclinique est caractérisée par la présence d'un nombre élevé de cellules somatiques dans le lait dépassant le seuil normal de 150 000 à 200 000 cellules /mL sans aucune anomalie visible du lait et de la mamelle et une absence des signes généraux (Sumon *et al.*, 2020; Ruegg, 2021). La mammite subclinique est très fréquente dans les troupeaux laitiers par rapport à la mammite clinique et les vaches infectées deviennent une source d'infection pour les autres vaches saines (Ndahetuye *et al.*, 2019; Sumon *et al.*, 2020).

1.2. Mammites cliniques

La mammite clinique est caractérisée par son apparition soudaine avec la présence d'une rougeur et d'un gonflement du pis ainsi que par la présence de certaines

modifications physiques et chimiques du lait et des changements pathologiques du tissu glandulaire (Teklemariam *et al.*, 2015; Cobirka *et al.*, 2020). La mammite clinique est facilement identifiable par une décoloration du lait et la présence de grumeaux et d'un grand nombre de leucocytes dans le lait et le pis de la vache présente un gonflement et une chaleur et une douleur appréciables (Bangar *et al.*, 2015; Teklemariam *et al.*, 2015). Cependant, la mammite clinique est rare pendant la période sèche, probablement en raison des fortes concentrations de lactoferrine et de leucocytes dans la glande mammaire à ce moment, néanmoins, alors que les infections de la période sèche peuvent ne pas se présenter comme des cas cliniques pendant cette période, il existe un risque élevé que des cas subcliniques deviendront cliniques après le vêlage (Crispie *et al.*, 2004).

2. Étiologie des mammites

2.1. Pathogènes majeurs

Les pathogènes majeurs sont généralement responsables de mammites cliniques et sont représentés par les germes les plus virulents comme : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* et *Escherichia coli* (Villard, 2017).

2.1.1. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Staphylococcus aureus est une bactérie Gram positive à coagulase positive qui appartient à la famille des *Micrococcaceae*, au genre *Staphylococcus* et qui provoque une grande variété de maladies cliniques (Stark, 2013; Gherardi *et al.*, 2018; Taylor et Unakal, 2022). *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène majeur d'importance croissante en raison de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. Les bases de données génomiques du *S. aureus* ont été complétées pour 07 souches, 8325, COL, MRSA, MSSA, N315, Mu50 et MW2 (Harris *et al.*, 2002). Le plus grand réservoir de *S. aureus* est représenté par la sphère ORL humaine (en l'occurrence : les narines humaines) et en second lieu, les vaches. La prévalence de *S. aureus* isolé de la mammite bovine, est estimée entre 3% et 5 % , et compte tenu de la population mondiale de vaches laitières qui est de 1,5 milliard, 75 millions de vaches peuvent être infectées dans le monde (Gherardi *et al.*, 2018).

Staphylococcus aureus est le germe le plus isolé et le plus courant causant une mammite chez les vaches laitières primipares pendant le premier mois de lactation suivi de :

Escherichia coli , *Streptococcus dysgalactiae* et *Streptococcus uberis* (Lundberg *et al.*, 2016; Duse *et al.*, 2021). Cependant, *S. aureus* cause l'un des types les plus fréquents de mammites chroniques et l'infection causée par ce germe est généralement subclinique entraînant une élévation des numérations des cellules somatiques sans aucun changement détectable dans le lait ou le pis (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

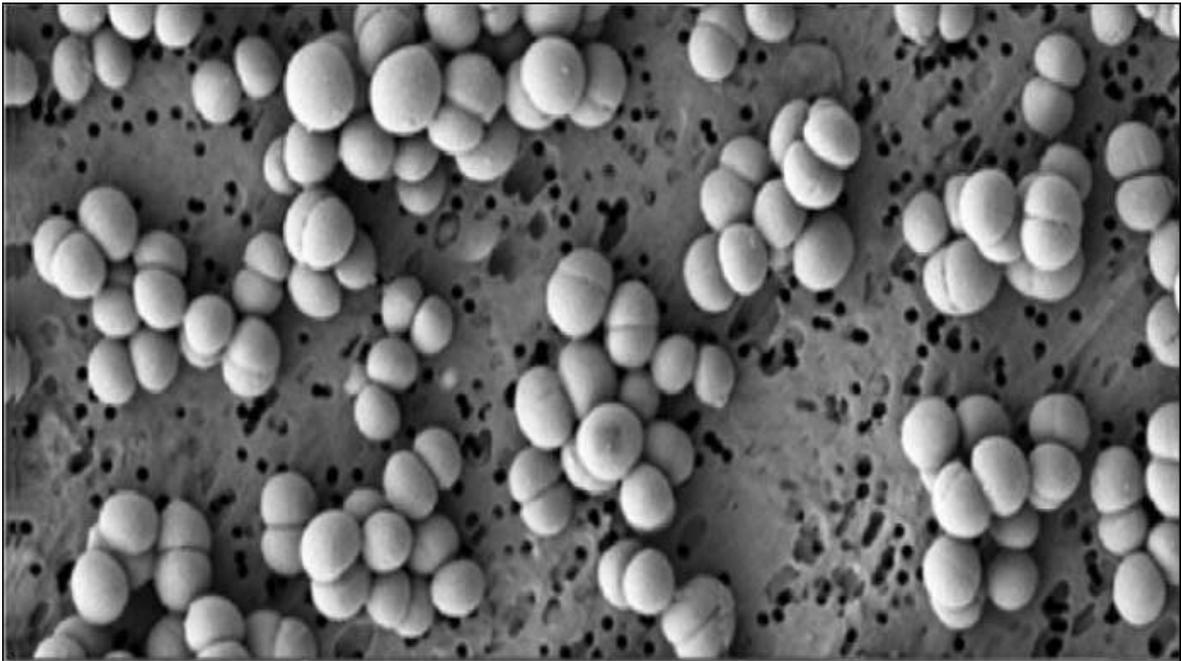


Figure 5. *Staphylococcus aureus* identifié au microscope électronique (Aldujaily *et al.*, 2019).

2.1.2. *Streptococcus uberis* (*Str. uberis*)

Streptococcus uberis est bactérie Gram positive de l'ordre des lactobacilles et de la famille des *Streptococcaceae* (Teklemariam *et al.*, 2015). Cette bactérie est une cause fréquente de mammites bovines dans de nombreux pays à travers le monde, et peut être la cause à la fois de mammites cliniques et subcliniques dont l'importance pour la santé du pis s'est améliorée ces dernières années. Elle se trouve partout chez les vaches et provoque généralement des mammites en début de lactation et en fin de tarissement. Ce germe associé à *S. aureus* et *E coli* sont considérés comme les trois agents pathogènes les plus importants de la mamelle, et leur forte prévalence dans un troupeau est parfois considérée comme une menace pour la durabilité économique du bétail (Kromker *et al.*, 2014; Teklemariam *et al.*, 2015; Gherardi *et al.*, 2018).

Les méthodes de diagnostic moléculaire ont révélé que *Str. uberis* peut être divisé en de nombreuses variétés différentes avec des propriétés épidémiologiques différentes, et certaines variétés ont été reclassées en *Streptococcus parauberis* et *Globicatella sanguinis* (Kromker *et al.*, 2014).

2.1.3. *Streptococcus dysgalactiae* (*Str. dysgalactiae*)

Streptococcus dysgalactiae est une bactérie Gram positive de la famille des *Streptococcaceae*. Elle a été considérée exclusivement comme pathogène animal et est souvent associée aux mammites cliniques et subcliniques (Alves-Barroco *et al.*, 2019). *Str. dysgalactiae* est un agent pathogène contagieux qui peut coloniser le tractus gastro-intestinal des vaches laitières. Dans les glandes mammaires, il peut survivre très longtemps en formant un biofilm et est généralement associé aux mammites subcliniques (Kabelitz *et al.*, 2021).

2.1.4. *Escherichia coli* (*E. coli*)

Escherichia coli est l'un des principaux agents pathogènes responsables de mammites cliniques chez les vaches laitières et son endotoxine thermostable dans le lait maternisé en poudre, est un facteur de risque potentiel d'infections néonatales (Porcherie *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2018).

L'infection est initiée par l'entrée de la bactérie par le canal du trayon et, après une courte période d'incubation, se caractérise par une importante réponse inflammatoire et un afflux important de neutrophiles dans le pis (Porcherie *et al.*, 2012).

2.2. Pathogènes mineurs

Les pathogènes mineurs provoquant des mammites sont considérés comme des agents moins virulents et causent moins de dommages pour le pis des vaches que les pathogènes majeurs. Ils sont représentés principalement par les Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) et par *Corynebacterium bovis* (Reyher *et al.*, 2012). Ces pathogènes sont responsables de mammites subcliniques surtout, et causent rarement des mammites cliniques (particulièrement les SCN). Cependant, une infection persistante à SCN peut entraîner une réduction de la production et de la qualité du lait, une augmentation du comptage de cellules somatiques et de graves lésions du pis (Villard, 2017; Shoaib *et al.*, 2021).

3. Mammites staphylococciques

Les mammites staphylococciques sont les mammites les plus persistantes en élevage bovin laitier, car ces germes forment des micro-abcès dans le parenchyme mammaire et sont insensibles aux antibiotiques (Noireterre, 2006). Ces bactéries sont caractérisées par leur forte contagiosité et sont à l'origine de mammites cliniques ou subcliniques qui peuvent évoluer vers des mammites chroniques (Bouchard, 2013; Villard, 2017). Dans certains cas, ils peuvent entraîner une mammite gangréneuse aiguë (surtout *S. aureus*) avec la présence de symptômes généraux tels que l'abattement, l'hyperthermie et même un état de choc (Cainaud, 2005). En effet, les nouvelles infections intra-mammaires durant la phase d'involution mammaire à la période sèche sont principalement causées par *S. aureus* (Buttin, 2020).

3.1. Impact sanitaire des staphylocoques

La bactérie *S. aureus* peut coloniser un large éventail d'animaux. Cependant, l'homme reste le principal réservoir de la contamination de la nourriture. Toutefois, malgré la présence de nombreuses espèces et sous-espèces de staphylocoques, seulement 18 espèces ont été identifiées chez l'homme. La majorité des espèces n'est retrouvée que chez l'animal (Bouchard, 2013).

Les staphylocoques sont des bactéries, ubiquitaires, commensales, zoonotiques, transmissibles de l'homme à l'animal et inversement par contact direct ou indirect. Ces germes commensaux sont présents sur la peau, le nez et les muqueuses de l'homme et des animaux en bonne santé, y compris les animaux d'élevage (Lozano *et al.*, 2016; Anses, 2017).

3.2. Impact des Staphylocoques dorés sur la santé humaine

Le staphylocoque doré (*staphylococcus aureus*) est la souche de staphylocoque la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine, et est responsable d'infections nosocomiales et communautaires (Amazian *et al.*, 2010; Brielle, 2016). Il constitue avec *E. coli* et *P. aeruginosa* les trois principaux germes responsables d'infections nosocomiales (Ballet, 2020).

En effet, *S. aureus* est un germe commensal de l'homme où 30 à 50% des humains sont des porteurs sains intermittents et 10 à 20% sont des porteurs permanents (Ballet, 2020).

Il s'agit d'un germe pyogène qui peut provoquer chez l'homme différentes infections, allant des infections cutanéomuqueuses comme les furoncles ou les panaris aux intoxications alimentaires provoquées par les souches toxigènes (Fleming, 2014).

On peut classer les infections causées par les staphylocoques dorés en deux groupes :

- Les infections suppuratives, qui dépendent de la prolifération du germe, où le staphylocoque est présent dans le site infectieux et le patient guérit de l'infection après élimination de la bactérie.
- Les infections dites toxiques, où une toxine sécrétée par le staphylocoque est responsable des symptômes.

3.3. Impact sur la santé publique vétérinaire lié au lait mammitique

Le lait cru de vaches du fait de sa composition et ses propriétés est un milieu de croissance idéal pour plusieurs micro-organismes y compris *S. aureus* : les bactéries pathogènes transmises par le lait représentent ainsi une menace importante pour la santé humaine et constituent environ 90 % de toutes les maladies liées aux produits laitiers (Berhe *et al.*, 2020). Quatre bactéries sont à rechercher obligatoirement par les laiteries dans le lait : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et les *salmonella*. Par ailleurs, la quantité de germes par millilitre de lait à 30°C ne doit pas dépasser 100 000 ufc/mL (Rattez, 2017).

S. aureus est un agent pathogène d'origine alimentaire important et provoque une grande variété de maladies chez les humains et les animaux, dont la gravité varie d'une infection cutanée bénigne à des maladies plus graves, telles que : la pneumonie et la septicémie, ainsi que l'intoxication alimentaire staphylococcique qui est l'une des maladies d'origine alimentaire les plus courantes. Ces intoxications sont le résultat de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques préformées dans les aliments par des souches entérotoxigènes de *S. aureus* (Fagundes *et al.*, 2010; Rola *et al.*, 2016).

La prévalence des infections à *Staphylococcus aureus*, communautaires ou nosocomiales, constitue un problème majeur de santé publique en raison de la virulence de ces bactéries, de leur résistance aux antibiotiques et de leur pouvoir épidémique (Marisa *et al.*, 2012).

3.4. Répercussion du lait mammitique staphylococcique sur la santé humaine

La répercussion du lait mammitique staphylococcique sur la santé humaine peut être résumée par deux impacts principaux :

- Les toxi-infections alimentaires staphylococciques
- Source d'émergence des bactéries résistantes

3.4.1. Toxi-infections alimentaires staphylococciques

Certaines souches de staphylocoques à coagulase positive sont capables de produire dans des conditions favorables (Température, pH, quantité importante de germes plus de 10^6 à 10^7 ufc/ml) des entérotoxines thermostables qui peuvent résister à des traitements thermiques comme la stérilisation et qui vont provoquer des intoxications (TIAC : Toxi-infection Alimentaire Collective) après leur ingestion (Arnal, 2003; Hennekinne, 2010; De Matos, 2013). A ce jour, plus de 20 types d'entérotoxines ont été identifiés, dont les types d'entérotoxines classiques (SEA-SEE) qui posent de sérieux problèmes de santé publique car ils conservent leurs activités biologiques et immunologiques après la pasteurisation (Jung et Lee, 2022). En outre, la présence des formes végétatives seules, sans toxine dans l'aliment, n'entraîne pas d'intoxication alimentaire (De Matos, 2013).

Le staphylocoque doré représente la deuxième cause de TIAC dans les différentes denrées alimentaires après les salmonelles, et la première cause de TIAC dans les produits laitiers, mais sa fréquence est vraisemblablement sous-estimée, et selon l'Anses (2017), sur 1300 à 1400 TIAC déclarées en France, 200 à 300 foyers sont suspectés être causés par des staphylocoques (Arnal, 2003; Anses, 2017; Rattez, 2017), c'est ainsi que, *Staphylococcus aureus* est le germe le plus souvent isolé lors des intoxications staphylococciques, et l'entérotoxine staphylococcique A (SEA) reste la plus couramment mise en évidence dans les intoxications staphylococciques (Arnal, 2003).

Tous les aliments peuvent être contaminés par *S. aureus* durant leur manipulation, et le risque pour les consommateurs est lié surtout à une exposition des aliments à des températures pendant des durées permettant la multiplication des germes et la production des toxines (Anses, 2017). La prévalence de ce germe chez les manipulateurs d'aliments est variable selon les industries et les pays (Bouchard, 2013).

Cependant, la contamination du lait par ce germe peut être due à la présence, dans le troupeau de vaches atteintes de mammites cliniques ou subcliniques dues à *S. aureus* (Hennekinne, 2010; Fleming, 2014).

Après l'ingestion d'un aliment contaminé par une entérotoxine sécrétée par certaines souches de *S. aureus* et une incubation très courte de 2 à 4 heures, l'intoxication provoque une diarrhée non fébrile, due à une sécrétion active d'eau et d'électrolytes. Cependant,

L'intensité des symptômes dépend de la quantité de toxines absorbées, et le danger est que ces entérotoxines sont thermostables, puisqu'elles résistent 50 min à 110°C. L'intoxication due à *S. aureus* est confirmée par la présence des entérotoxines staphylococciques dans les vomissures des malades ou dans l'aliment à l'origine de ces TIAC (Anses, 2017; Rattez, 2017).

Tableau 2. Caractéristiques nécessaires à la croissance et la toxinogénèse de *S. aureus*
(Anses, 2011).

Paramètres optimaux	Croissance	Toxinogénèse
Température	35-41	34-40
pH	6-7	7-8
a _w	0.99	0.99
NaCl (%)	0-4	0-4
Atmosphère	Aérobie	Aérobie

3.4.2. Source d'émergence des bactéries résistantes

La résistance aux antibiotiques peut être définie par le développement de bactéries insensibles aux antibiotiques et qui provoquent chez l'homme et l'animal des infections difficiles à traiter. Ces antibiorésistances provoquent 33 000 décès par an en Europe (Institut Pasteur, 2017). Cette résistance aux antibiotiques peut être acquise et transmise entre les souches bactériennes résistantes par différents moyens, elle est acquise surtout par mutation chromosomique et transmise par la transmission de gènes résistants aux antibiotiques d'un micro-organisme à un autre (Moroh, 2013).

La résistance bactérienne aux antibiotiques peut être la conséquence directe, d'une part, de l'utilisation abusive des antibiotiques qui sélectionne des bactéries plus résistantes, et d'autre part, de la dissémination de ces bactéries sélectionnées résistantes aux antibiotiques, par une transmission croisée dans les populations humaine et animale et par l'environnement (Jarlier, 2019). La transmission des bactéries résistantes de l'animal à l'homme se fait par contact direct ou indirectement à travers la chaîne alimentaire (Figure 6) (El Harrak, 2021).

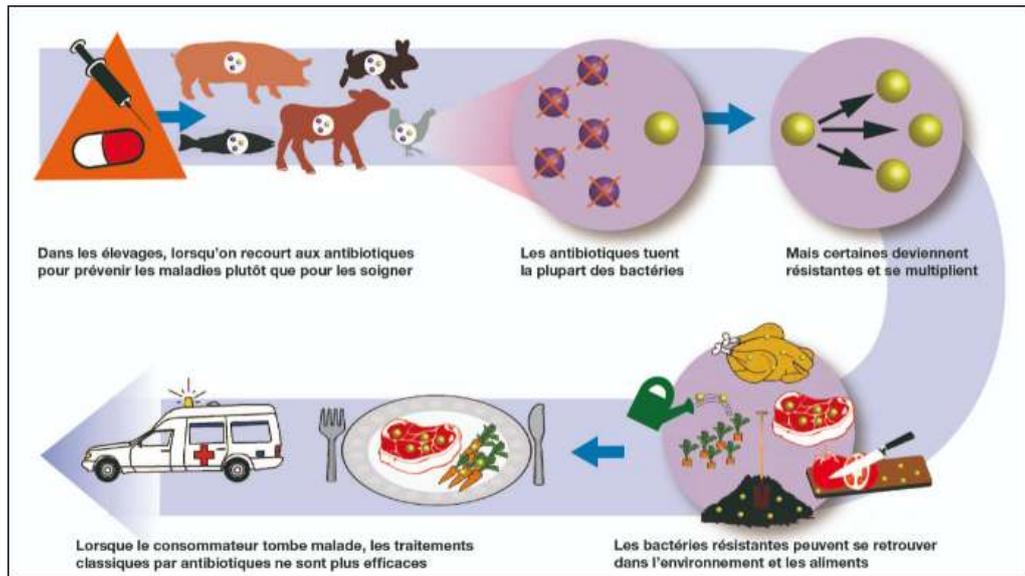


Figure 6. Transmission des bactéries résistantes aux antibiotiques de l'animal à l'homme (Mano, 2016)

En outre, *S. aureus* a développé plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques, où plus de 90% des souches de staphylocoques produisent une pénicillinase et ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (méthicilline, oxacilline) et les autres β -lactamines par la production d'une protéine (PLP2a) (Dumitrescu *et al.*, 2010). Ces dernières années, les animaux d'élevage ont été identifiés comme des réservoirs de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (Bouiller *et al.*, 2020).

4. Mammites du tarissement

Le tarissement est une période propice au développement et à l'installation des nouvelles infections intra-mammaires. Le taux des nouvelles IIM est plus élevé au tarissement que pendant la lactation où plus de 60% des nouvelles IIM apparaissent au tarissement (Jannot, 2015; Villard, 2017). Les nouvelles IIM interviennent surtout en début et en fin de la période sèche (phase d'involution mammaire et phase de colostrogénèse (Figure 7) (Heinen, 2019).

En effet, le tarissement est une période clé pour le contrôle et la prévention des infections mammaires, car plus de 50% des mammites qui apparaissent en début de lactation (durant les 100 premiers jours) sont dues à une infection contractée au tarissement (Jannot, 2015; Christophe, 2018).

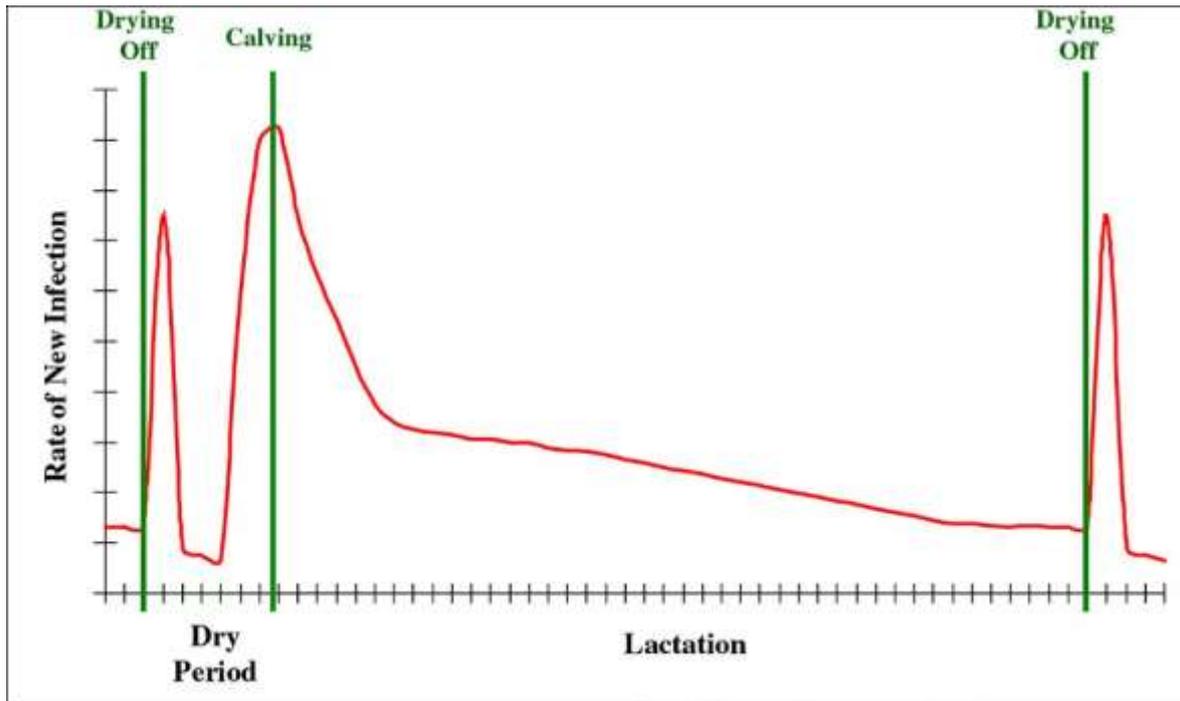


Figure 7. Périodes à risque pour le développement de nouvelles IIM (Bradley et Green, 2004).

4.1. Traitement des mammites au tarissement

La période du tarissement est le moment important pour le contrôle et le traitement des infections intra-mammaires, car c'est le moment adéquat pour réaliser des perfusions intra-mammaires d'antibiotiques pour protéger la glande mammaire et pour le traitement des infections intra-mammaires existantes (Pezeshki *et al.*, 2010). Les vaches sont sensibles aux infections bactériennes au début de la période sèche et durant les dernières semaines avant la parturition (Newman *et al.*, 2009; Vilar et Rajala-Schultz, 2020). Le traitement au tarissement présente deux principaux objectifs, il permet le traitement des infections intra-mammaires existantes et permet aussi de prévenir les nouvelles infections intra-mammaires en début de lactation en protégeant la mamelle tout au long de la période du tarissement jusqu'à la lactation suivante (Seegers *et al.*, 2006). Par ailleurs, selon certains auteurs, lorsqu'aucun traitement au tarissement n'est réalisé, 8 à 12% des quartiers seront infectés au cours du tarissement dans les troupeaux où la prévalence des mammites est moyenne (Villard, 2017). Il existe deux types du traitement antibiotique au tarissement (DCT), le traitement systématique ou général de toutes les vaches tarées quel que soit leur statut sanitaire (infectée ou non) et le traitement sélectif ou ciblé de certaines vaches tarées seulement.

4.1.1. Traitement systématique ou général (Blanket Dry Cow Therapy ou BDCT)

Le traitement antibiotique systématique au tarissement ou BDCT consiste à traiter tous les quartiers de toutes les vaches avec une infusion d'antibiotiques à longue action après la dernière traite de la lactation (Enger, 2020; Kabera *et al.*, 2021). Actuellement, cette pratique est fortement utilisée pour atténuer le risque du développement des nouvelles infections intra-mammaires (IIM) au tarissement, et a démontré son efficacité sur l'élimination de nombreuses IIM existantes pendant le tarissement et en empêchant l'incidence de nouveaux cas d'IIM au début de la période sèche (Britten *et al.*, 2021; Kabera *et al.*, 2021).

Le traitement systématique au tarissement présente certains avantages : il permet de réduire efficacement la concentration des cellules somatiques (CCS) du lait de tank. De plus, il a été démontré que l'utilisation systématique de DCT permet de presque éradiquer certains agents pathogènes dans certains pays (Britten *et al.*, 2021).

Mais actuellement, la pratique du BDCT a fait l'objet d'un examen minutieux international en raison des préoccupations croissantes pour la surconsommation d'antibiotiques, et à cet effet, les différents acteurs de la santé (scientifiques et professionnels de la santé) et les consommateurs s'inquiètent de plus en plus sur l'utilisation généralisée des antibiotiques chez les animaux producteurs d'aliments et surtout à titre préventif et sa contribution potentielle à la résistance aux antimicrobiens, tant chez les pathogènes vétérinaires qu'en médecine humaine (Britten *et al.*, 2021; Huey *et al.*, 2021), c'est pourquoi la réduction ou l'élimination de la stratégie de BDCT est devenue actuellement un enjeu majeur (Britten *et al.*, 2021).

4.1.2. Traitement sélectif (Selective Dry Cow Therapy ou SDCT)

Le traitement sélectif au tarissement ou SDCT est l'approche qui consiste à ne traiter que les quartiers infectés ou tous les quartiers d'une vache avec au moins un quartier infecté (Enger, 2020). La sélection des vaches ou des quartiers à traiter est basée sur les résultats des numérations des cellules somatiques ou CCS (Huey *et al.*, 2021). Le traitement sélectif est une stratégie de traitement des mammites au tarissement permettant la réduction de l'utilisation des antimicrobiens tout en conservant les avantages de cette thérapie qui sont la réduction du taux d'incidence des mammites durant cette période et l'abaissement de CCS du lait de tank (Britten *et al.*, 2021).

Le traitement sélectif des vaches au tarissement est souvent associé à l'utilisation des obturateurs internes des trayons et cette pratique est hautement recommandée ; Cependant l'utilisation des obturateurs pour trayons sans antibiothérapie au tarissement est très risquée notamment lorsque les conditions d'hygiène des trayons lors de la mise en place de l'obturateur sont médiocres car cela peut entraîner le développement d'une nouvelle IIM durant cette période et provoquer la mort des vaches dans les cas graves (Enger, 2020).

CHAPITRE III : Utilisation de l'aromathérapie dans le traitement des mammites de la lactation et de tarissement

1. Introduction à l'aromathérapie

L'histoire de l'utilisation des huiles essentielles comme agents médicaux ou pour la relaxation remonte à l'Antiquité en Égypte, mais ce n'est qu'au début du XXe siècle que le mot "aromathérapie" a été inventé pour la première fois par le pharmacien Français René-Maurice Gattefossé pour les soins aux huiles essentielles (Koyama et Heinbockel, 2020). L'aromathérapie fait partie des thérapies complémentaires qui utilisent des huiles essentielles qui sont des extraits naturels de plantes (fleurs, écorces, tiges, feuilles, racines ou autres parties de plantes) pour traiter plusieurs maladies et améliorer le bien-être psychologique et physique (Ali *et al.*, 2015; Halder *et al.*, 2018).

2. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE), connues aussi sous le nom : d'essences, d'huiles volatiles ou huiles éthérées, sont des liquides aromatiques et volatiles d'odeur caractéristique, rarement colorées et d'une densité généralement inférieure à celle de l'eau. Ils sont obtenus à partir de matières végétales (sèches, fraîches ou partiellement déshydratées) des différentes parties des plantes (fleurs, feuilles, tiges, fruits, noix...) (Miguel, 2010; Marouf et Tremblin, 2016; Ríos, 2016; Irshad *et al.*, 2020; Nehme *et al.*, 2021). L'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques est effectuée par différentes techniques, comme la distillation (hydrodistillation, entraînement à la vapeur d'eau), l'enfleurage, l'expression, l'extraction par solvant et l'extraction par fluide ou par un procédé mécanique pour l'épicarpe des agrumes (Skaria, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Verdeguer *et al.*, 2020). Cependant, l'hydrodistillation reste la méthode la plus préférable pour l'extraction des HE du fait de son coût et sa facilité de réalisation, et reste la méthode de choix pour la détermination de la teneur en huiles essentielles des plantes (Richter et Schellenberg, 2007; Irshad *et al.*, 2020). Néanmoins, pour la production des huiles essentielles à des fins commerciales, la distillation par entraînement à la vapeur est la méthode la plus souvent utilisée (Burt, 2004).

3. Importance des huiles essentielles

3.1. Importance médicale

3.1.1. Action antibactérienne

Du fait de l'utilisation abusive des antibiotiques et de l'apparition de souches bactériennes résistantes à ces molécules, la recherche d'autres alternatives pour traiter les maladies bactériennes est devenue actuellement une priorité. Dans ce contexte, les huiles essentielles présentent un bon potentiel en raison de leur activité prouvée contre les bactéries Gram positive et Gram négative (Reddy, 2019) ; Cependant, les bactéries Gram négative sont légèrement moins sensibles que les bactéries Gram positive aux huiles essentielles (Burt, 2004). L'efficacité antibactérienne peut varier avec les huiles essentielles et ainsi avec les bactéries : Généralement, les huiles essentielles d'origan, de thym, de la cannelle et du myrte sont les antibactériens les plus actifs et sont actifs à des concentrations inférieures à 1% (Raut et Karuppayil, 2014). Ainsi, certains composés actifs des huiles essentielles, comme : le carvacrol, le thymol, l'eugénol, le périllaldéhyde, le cinnamaldéhyde et l'acide cinnamique sont des antibactériens efficaces avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,05 – 5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ *in vitro* (Burt, 2004). La capacité antibactérienne des HE a été associée à la réduction du potentiel membranaire des bactéries, l'arrêt des pompes à protons et l'épuisement d'ATP (Jugreet *et al.*, 2020).

3.1.2. Action anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles est liée non seulement à leurs effets antioxydants, mais aussi à leurs interactions aux cascades de signalisation impliquant des cytokines et des facteurs régulateurs de transcription, et agit sur l'expression des gènes pro-inflammatoires (Miguel, 2010). Certains composés actifs des huiles essentielles, tel que le cinnamaldéhyde, exerce une action anti-inflammatoire induite par différentes voies de signalisation qui régulent les réponses anti-inflammatoires avec inhibition de la production d'interleukine (IL1- β) et de Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (de Cássia da Silveira E Sá *et al.*, 2014). Ainsi selon une étude réalisée par Pérez *et al.* (2011) sur l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles isolées de 43 plantes, le carvacrol et l'isoeugénol ont montré une activité anti-inflammatoire importante. Dans une autre étude, le linalol et l'acétate de linalyle (présents dans de nombreuses huiles essentielles) jouent un rôle essentiel dans l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles qui en possèdent (Peano *et al.*, 2002).

3.1.3. Action antifongique

Les huiles essentielles peuvent présenter l'un des produits naturels les plus prometteurs pour l'inhibition de l'activité fongique. C'est ainsi que de nombreuses huiles essentielles obtenues à partir de différentes plantes ont présenté des propriétés antifongiques importantes (Nazzaro *et al.*, 2017).

Selon Giordani *et al.* (2008), il existe une relation entre la forte activité antifongique des huiles essentielles et la teneur élevée en phénols (Thymol et carvacrol) précurseurs de p-cymène et γ -terpinène. Ainsi, le carvacrol et le thymol exercent une forte activité antifongique sur de nombreuses souches de *Candida* isolées de différents prélèvements (cutané, respiratoire, œsophagien), et le mécanisme d'action provient de l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol et la perturbation de l'intégrité de la membrane (Ahmad *et al.*, 2011). Le thymol a lui aussi été utilisé avec succès dans des études *in vitro* contre certains champignons pathogènes dont *Aspergillus* et *Candida albicans* (de Vasconcelos *et al.*, 2014).

3.2. Importance économique

L'utilisation des huiles essentielles (HE) en parfumerie, comme additifs en alimentation, en confiserie et en industrie pharmaceutique et cosmétique, est en constante augmentation (Raut et Karuppayil, 2014), et ce, malgré qu'elles soient connues pour être sensibles aux réactions de conversion et de dégradation (Turek et Stintzing, 2013). Les huiles essentielles sont reconnues généralement comme produits sûres et non nocifs, et en raison de leur origine naturelle, sont plus largement acceptés par les consommateurs que les agents synthétiques (Nazzaro *et al.*, 2017).

En agriculture, le traitement des fruits de mangue après la récolte avec les HE de *Thymus vulgaris* et de *Rosmarinus officinalis* a permis de prolonger la durée de conservation et de préserver les qualités intrinsèques des fruits (Jugreet *et al.*, 2020). Ainsi, de nombreuses HE et leurs constituants sont utilisés comme répulsifs et sont neurotoxiques pour les insectes et acariens (Isman *et al.*, 2011; Mossa, 2016).

En industrie alimentaire, les huiles essentielles sont utilisées comme additifs (en raison de leur effet antimicrobien et antioxydant) pour empêcher la détérioration en permettant de prolonger la durée de conservation des aliments tels que : le lait et les produits laitiers, la viande, les légumes et ainsi que d'autres aliments (Mihai et Popa, 2013; Pasiyas *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021). De plus, et selon les recommandations de l'US Food and Drug Administration, leurs principaux composés actifs comme : les aldéhydes, les terpènes et les phénols sont largement

utilisés en tant qu'additifs alimentaires car ils offrent une réduction significative du niveau de contamination microbienne des nutriments (Melkina *et al.*, 2021).

Cependant, l'utilisation des HE en industrie alimentaire présente certaines limitations telles que : leur faible solubilité dans l'eau, leur volatilité élevée et leur forte odeur (Fernández-López et Viuda-Martos, 2018).

En effet, en industrie cosmétique et en parfumerie, les huiles essentielles sont utilisées en raison de leurs propriétés variables et surtout de leurs odeurs agréables (Sarkic et Stappen, 2018).

4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges complexes contenant plus de 300 composés différents qui sont généralement des composés organiques volatiles de faible poids moléculaire (Jugreet *et al.*, 2020). Cependant, elles sont caractérisées par la présence de deux ou trois composants majeurs, à des concentrations assez élevées (20 à 70%) et les autres composants sont présents à l'état de traces (Bakkali *et al.*, 2008). La composition des huiles essentielles varie généralement en fonction du stade de développement des plantes, de la période de récolte, de la région géographique et aussi en fonction des organes prélevés (Guinoiseau, 2010).

Elles sont généralement composées de métabolites secondaires des plantes aromatiques ayant des structures oxygénées tels : que les alcools, les cétones, les aldéhydes et les esters (Baptista-Silva *et al.*, 2020). Les terpénoïdes représentent les principaux composants des huiles essentielles (Jankowska *et al.*, 2017). La composition détaillée des huiles essentielles est obtenue par la réalisation de la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG-SM) (Burt, 2004). Les huiles essentielles sont composées de différents groupes de composés actifs ayant une origine biosynthétique différente : le groupe des terpènes (α -pinène, limonène...), le groupe des terpénoïdes (thymol, carvacrol...), le groupe des composés aromatiques et aliphatiques ou des phénylpropanoïdes (cinnamaldéhyde, eugénol...), ainsi que d'autres composés (Bakkali *et al.*, 2008; Hyltdgaard *et al.*, 2012; Al-Maqtari *et al.*, 2021). Le caractère chimique des composés des huiles essentielles influence leur efficacité antimicrobienne et le mécanisme d'action sur l'organisme cible (Krisch *et al.*, 2011).

4.1. Terpènes

Les terpènes, connus aussi sous le nom d'isoprénoïdes, sont des substances naturelles produites par de grandes variétés de plantes. Ils possèdent différentes propriétés biologiques et sont responsables du parfum, du goût et des pigments des plantes (Paduch *et al.*, 2007; Cox-Georgian *et al.*, 2019). Il existe différents types de terpènes selon le nombre d'unités isopréniques qu'ils renferment, et parmi lesquels, on trouve : les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes, les sesterpènes et les triterpènes qui ont des propriétés différentes (Figueredo, 2007; Cox-Georgian *et al.*, 2019), mais dans les huiles essentielles, généralement seuls ceux de faible poids sont présents (Figueredo, 2007).

En effet, les terpènes sont très volatiles et leur oxydation donne un produit bactéricide qui est l'ozone (Jeune, 2011). Certains composés organiques volatils (COV) terpéniques comme le limonène et le pinène, appartenant à la classe des COV appelés monoterpènes cycliques, présentent un grand intérêt en termes d'application pratique et qui sont très répandus dans certains végétaux comme le citron et d'autres agrumes qui inhibent la croissance des souches de *Bacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ainsi que d'autres bactéries (Salehi *et al.*, 2019; Melkina *et al.*, 2021). Ainsi, l' α -pinène (présent dans plus de 40 HE) présente une activité anti-inflammatoire importante par la suppression maximale des voies inflammatoires et cataboliques induites par l'IL-1 β et aussi par une activité inhibitrice sur l'activation NF-kB qui joue un rôle essentiel dans les activités inflammatoires (Salehi *et al.*, 2019).

4.2. Terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des terpènes qui ont subis certaines modifications biochimiques via des enzymes qui ajoutent des molécules d'oxygène et déplacent ou éliminent des groupes méthyle (Hyldgaard *et al.*, 2012). Les terpénoïdes, également appelés isoprénoïdes, sont formés par des unités ramifiées répétées de carbone, semblable aux unités d'isoprène. La nomenclature des terpénoïdes dépend du nombre d'unités d'isoprène classées, de la même façon que les terpènes, en tant que : monoterpène, sesquiterpène, diterpène, triterpène, tétraterpène et polyterpène. Ils existent sous forme cyclique ou structure acyclique, qui résulte des modifications des réactions en chaîne des isoprénoïdes telles que : la réduction, l'oxydation, la cyclisation, les ruptures de cycle ou les réarrangements (Shankar *et al.*, 2019). Les terpénoïdes sont les dérivés oxygénés des terpènes, et constituent avec eux les principaux composés des huiles essentielles (de Matos *et al.*, 2019; Verdeguer *et al.*, 2020). Les

terpénoïdes peuvent être subdivisés en : alcools, esters, aldéhydes, cétones, éthers, phénols et époxydes (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Les phénols monoterpéniques, présents dans les huiles essentielles de thym surtout, sont : le thymol et le carvacrol (Nieto, 2020). Ainsi, selon de nombreuses études effectuées, les huiles essentielles les plus riches en phénols (huiles de thym, d'origan et de clou de girofle) sont celles qui présentent les plus hautes activités antibactériennes (Guinoiseau, 2010; Deschepper, 2017; David, 2019).

Le thymol et le carvacrol sont considérés comme des produits sans danger pour l'homme et présentent des propriétés antibactériennes, antifongiques et antiseptiques (Walczak *et al.*, 2021), mais sont connus surtout pour être de puissants agents antibactériens (Tzima *et al.*, 2015).

4.2.1. Thymol

Le thymol est un monoterpénoïde phénolique naturel cristallin et incolore, largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique et dans les applications de conservation des aliments. Il s'agit d'un isomère du carvacrol, et est extrait principalement de l'espèce *Thymus* et d'autres sources végétales. En effet, le thymol est biosynthétisé par l'aromatisation du γ -terpinène en p-cymène suivie de l'hydroxylation du p-cymène (Marchese *et al.*, 2016; Shankar *et al.*, 2019; Escobar *et al.*, 2020). Le thymol se trouve également dans l'huile essentielle d'origan et dans d'autres sources naturelles telles que la mandarine et l'huile de mandarine (Falcone *et al.*, 2005). D'une façon générale, le thymol est présent dans les huiles essentielles des plantes appartenant à la famille des lamiacées (Marchese *et al.*, 2016).

Le thymol présente de nombreuses activités : il est utilisé comme antioxydant, anti-inflammatoire, anesthésique local, antinociceptif, cicatrisant, antiseptique, et possède en particulier des propriétés antibactériennes et antifongiques qui ont été démontrées (Marchese *et al.*, 2016).

En effet, selon de nombreuses études réalisées sur l'effet antibactérien des huiles essentielles et de leurs constituants, le thymol a montré une activité antibactérienne importante sur de nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* (Zarrini *et al.*, 2010; García-Salinas *et al.*, 2018; Candelaria-Deñás *et al.*, 2021).

4.2.2. Carvacrol

Le carvacrol est un phénol monoterpénique, isomère du thymol, présent dans de nombreuses plantes aromatiques surtout des espèces d'*Origanum* et de *Thymus* (Suntres *et al.*, 2013). Ce monoterpène est considéré comme non toxique et est couramment utilisé comme substance aromatisante (Saghrouchni *et al.*, 2021). Le carvacrol possède des propriétés biologiques et pharmacologiques très variées avec une action antibactérienne sur différents micro-organismes, une action antioxydante, anti-inflammatoire et hépatoprotéctrice (Martins, 2020). Son effet antimicrobien est surtout lié à sa capacité à se positionner dans la membrane cellulaire du fait de son caractère hydrophobe où il augmente sa perméabilité entraînant ainsi des dommages structurels et fonctionnels de cette dernière (Ultee *et al.*, 2002; Hyldgaard *et al.*, 2012). Ce changement de la perméabilité membranaire conduit à la fuite d'ions et d'autres matériaux cellulaires conduisant ainsi à sa mort (Bhavaniramya *et al.*, 2019).

4.3. Notion de chémotype

Le chémotype correspond à la composition chimique de l'huile essentielle en métabolites secondaires (Jeune, 2011). Il permet de définir les molécules biochimiquement actives des HE et permet aussi de classer les HE selon leurs constituants chimiques (Bourachot, 2017; Cuntzmann, 2017). Une même plante peut appartenir à plusieurs chémotypes et tout cela dépendra du ou des composants dominants qu'elle contient (Jeune, 2011).

5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe différentes techniques d'extraction des huiles essentielles, parmi lesquelles on trouve : des méthodes dites conventionnelles ou classiques qui sont représentées surtout par la distillation par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation, et des méthodes dites non conventionnelles ou innovantes comme l'extraction par fluide supercritique et l'extraction assistée par ultrasons (Mnayer, 2014; El Asbahani *et al.*, 2015; Triaux, 2019). Cependant, selon la Pharmacopée européenne, l'extraction des huiles essentielles est réalisée par hydrodistillation, distillation sèche ou par procédé mécanique sans chauffage (Deschepper, 2017).

5.1. Méthodes conventionnelles ou classiques

Les méthodes classiques d'extraction des huiles essentielles sont des méthodes basées sur la distillation de l'eau par chauffage pour récupérer les HE de la matrice végétale (El Asbahani *et al.*, 2015). Parmi ces méthodes classiques, on peut citer : l'hydrodistillation, la distillation par entraînement à la vapeur d'eau, l'extraction par des solvants organiques et l'expression à froid. Ces méthodes classiques d'extraction présentent certains inconvénients, parmi lesquels : la faible efficacité d'extraction nécessitant une grande quantité de matière première et la thermolabilité des composants des huiles essentielles qui subissent des altérations chimiques liées aux hautes températures appliquées (El Asbahani *et al.*, 2015; Triaux, 2019).

5.1.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode la plus simple et la plus ancienne qui est utilisée pour l'extraction des HE (Deschepper, 2017; Triaux, 2019). Elle est aussi la méthode la plus utilisée pour l'extraction des HE à des fins commerciales (Guinoiseau, 2010). Le principe de l'hydrodistillation consiste à immerger le matériel végétal directement dans l'eau à l'intérieur de l'alambic, par la suite le mélange est porté à ébullition sous pression atmosphérique (Mnayer, 2014; El Asbahani *et al.*, 2015). La chaleur élevée va permettre l'éclatement des cellules et la libération des molécules odorantes renfermées dans ces cellules végétales (Mnayer, 2014). Un refroidissement va permettre de condenser la vapeur d'eau et l'huile essentielle constituée se sépare par la suite de l'eau à laquelle elle n'est pas miscible par gravité et elle est récupérée par extraction liquide-liquide ou par simple décantation (Jeune, 2011; Deschepper, 2017; Triaux, 2019).

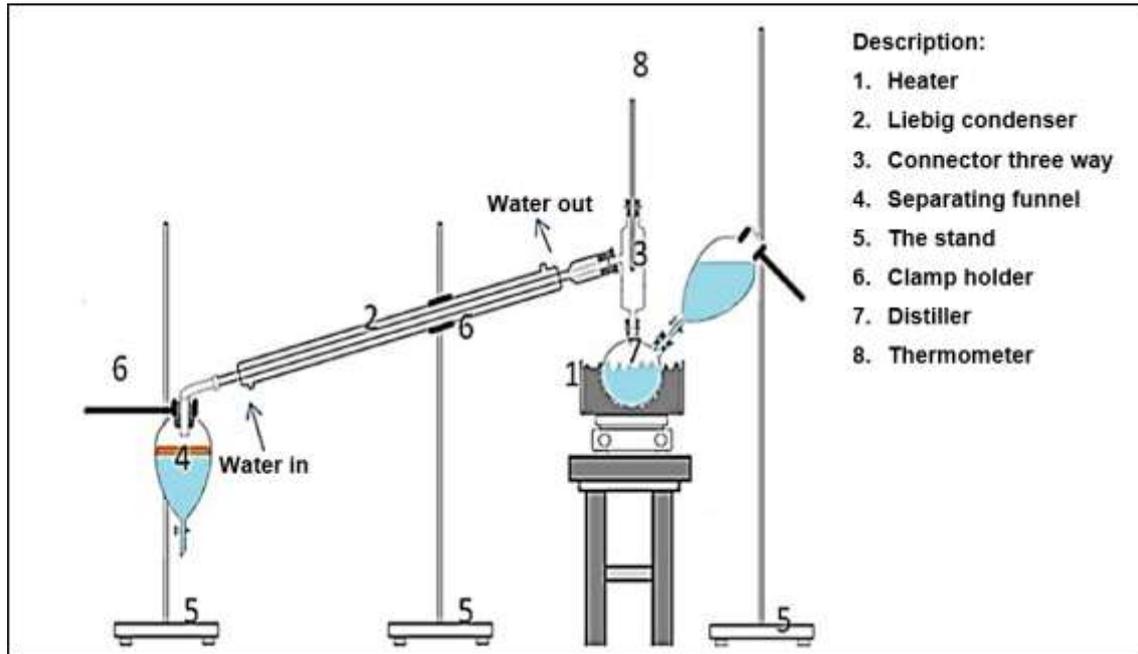


Figure 8. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation (Mahfud *et al.*, 2017).

5.1.2. Entraînement à la vapeur d'eau

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles utilisées pour l'extraction des huiles essentielles (El Asbahani *et al.*, 2015). C'est la méthode la plus employée pour l'extraction des HE des plantes (Triaux, 2019). La seule différence avec l'hydrodistillation est qu'il n'y a pas un contact direct entre le matériel végétal et l'eau (El Asbahani *et al.*, 2015). Dans cette méthode d'extraction, la matière végétale est placée dans l'alambic sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (Piochon, 2008; Mnayer, 2014). La vapeur d'eau passe dans l'alambic à travers la matière végétale, et comme pour l'hydrodistillation, elle provoque l'éclatement des cellules et la libération des molécules odorantes, qui vont être entraînées par la vapeur d'eau et condensées par refroidissement dans un condenseur (Deschepper, 2017; Triaux, 2019). L'huile essentielle non miscible à l'eau est récupérée par la suite par simple décantation ou par extraction liquide-liquide avec un solvant hydrophobe (Triaux, 2019).

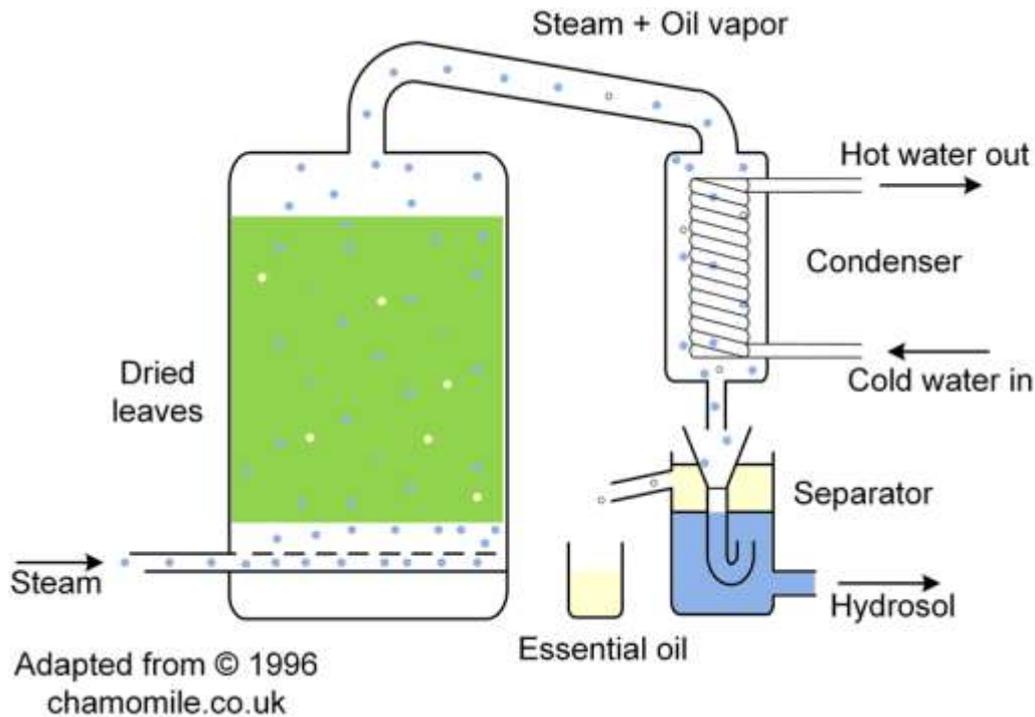


Figure 9. Extraction d'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau (Patience *et al.*, 2018).

5.1.3. Expression à froid

L'expression à froid est une méthode qui permet l'extraction des huiles essentielles de certaines plantes sans chauffage, par un procédé mécanique (Deschepper, 2017). C'est une méthode simple et traditionnelle et qui est réservée aux agrumes (fruits frais du genre *Citrus*) (El Asbahani *et al.*, 2015; Deschepper, 2017). Le principe de cette méthode consiste à éclater les petites vésicules et les sacs d'huile localisés dans la partie externe du mésocarpe pour libérer l'huile volatile qu'ils contiennent. Cette huile est par la suite entraînée par un courant d'eau (Mnayer, 2014; El Asbahani *et al.*, 2015). L'avantage de cette technique consiste en l'obtention d'huile qui n'a pas subi de modifications chimiques liées à la chaleur (Mnayer, 2014). Cependant, quel que soit le procédé d'extraction, les HE étant des composés volatiles, ils doivent être conservés dans des flacons sombres et à l'abri de la lumière et de la chaleur (Jeune, 2011).

5.2 Méthodes non conventionnelles ou innovantes

Les techniques non conventionnelles d'extraction des huiles essentielles sont de nouvelles techniques dont l'objectif est : de réduire le temps d'extraction et augmenter le rendement, ainsi que de réduire la consommation d'énergie et l'émission du CO₂, mais aussi l'utilisation de solvants écoresponsables (El Asbahani *et al.*, 2015; Triaux, 2019). Les

produits obtenus par ces techniques sont appelés extraits ou encore extraits naturels ou extraits riches en composés terpéniques et ne sont plus appelés huiles essentielles (Triaux, 2019).

Les techniques innovantes ou non conventionnelles sont nombreuses dont on peut citer sans description des techniques : l'extraction par fluide supercritique, l'extraction par liquide subcritique, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes...etc (Besombes, 2008; El Asbahani *et al.*, 2015; Triaux, 2019).

6. Aromathérapie des mammites bovines

Les études *in vivo* concernant l'utilisation des huiles essentielles (aromathérapie) dans le traitement des mammites bovines sont peu fréquentes (Kammerer *et al.*, 2008; Corre, 2018; Guiadeur *et al.*, 2020). Cependant, lors de l'utilisation de cette thérapie pour soigner les mammites des vaches laitières, des taux de guérison intéressants ont été obtenus avec une guérison clinique de l'ordre de 90% et une guérison bactériologique ne dépassant pas 55 % et est meilleure pour certains germes notamment pour *S. aureus* (Corre, 2018).

Lors du traitement des mammites avec des huiles essentielles, l'objectif recherché est d'avoir un effet antibactérien, antiseptique et anti-inflammatoire tout en évitant la toxicité de ces extraits naturels pour l'animal ou pour l'homme par la présence de résidus dans le lait (Masson, 2016).

6.1. Aromatogramme

L'aromatogramme est une technique qui permet de déterminer le spectre d'activité des huiles essentielles vis-à-vis des bactéries. Son principe est le même que celui de l'antibiogramme : les bactéries à tester sont ensemencées sur un milieu gélosé puis des disques imbibés des HE à tester sont déposés sur la gélose et en fonction du diamètre du halo d'inhibition on établit une classification de l'efficacité des huiles essentielles sur les germes concernés (Masson, 2016; Rattez, 2017).

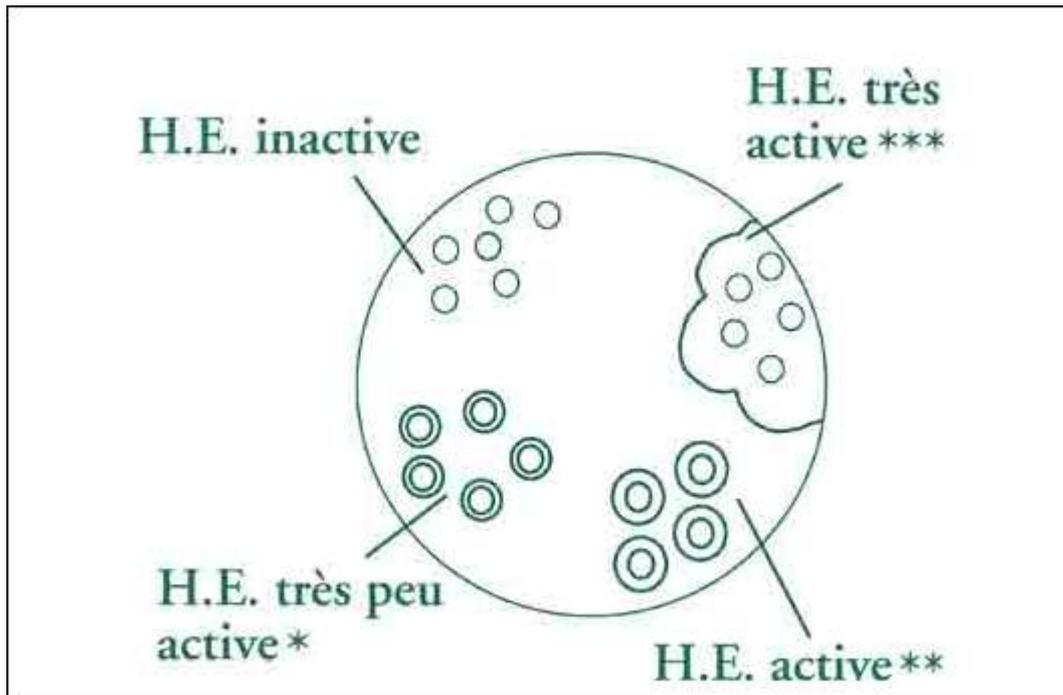


Figure 10. Différentes actions des HE sur la croissance bactérienne (Aromabio, 2022).

6.2. Voies d'administration des huiles essentielles

Avant son application, l'huile essentielle est généralement mélangée à une matière grasse, souvent une huile végétale, qui est considérée comme l'excipient de choix car elle favorise l'absorption et diminue l'irritation et est totalement et rapidement miscible avec l'HE (Jeune, 2011). Il existe deux principales voies qui sont généralement utilisées pour l'administration des huiles essentielles chez les vaches laitières : la voie orale et la voie cutanée (Rattez, 2017) ; Bien qu'il existe d'autres voies comme : la voie intra-mammaire (Jeune, 2011).

Concernant la voie orale, les HE sont incorporées dans les blocs à lécher ou bien diluées dans des huiles végétales et qui sont par la suite dispersées sur les rations ; Cependant, certaines huiles essentielles sont très toxiques par voie buccale (Desobry *et al.*, 2016; Rattez, 2017).

Pour la voie cutanée, la peau étant perméable aux HE car elles sont lipophiles et pouvant la traverser facilement par un simple massage cutané, cependant, les HE peuvent être corrosives à fortes concentrations et toxiques pour la peau (comme le thym à thymol) (Jeune, 2011; Desobry *et al.*, 2016).

Quant à la voie intra-mammaire, l'excipient utilisé doit être un gel hydrophile émulsifiant pour favoriser la dispersion de l'huile essentielle dans le lait ; Cependant, cette voie est très

délicate et nécessite certaines conditions de stérilité sans oublier que certaines HE sont irritantes pour la mamelle (Jeune, 2011).

7. Effet des huiles essentielles sur la flore du lait

Le lait et les produits laitiers, du fait de leur composition et leurs propriétés, sont connus pour être un excellent milieu pour de nombreuses détériorations et pour le développement de plusieurs micro-organismes pathogènes (Jemaa *et al.*, 2017). Une forte action bactéricide des huiles essentielles contre plusieurs pathogènes d'origine alimentaire a été montré dans de nombreuses études (Giannenas *et al.*, 2011).

7.1. Effet sur la flore normale

La grande majorité des études réalisées sur l'utilisation des huiles essentielles comme antimicrobiens dans les aliments, se sont concentrées surtout sur leurs effets sur les micro-organismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires afin d'assurer une durée de conservation plus longue et une sécurité sanitaire des aliments, et très peu sont les études qui ont recherché les effets de ces extraits naturels sur les micro-organismes bénéfiques utiles pour la conservation et la transformation des aliments et sur les probiotiques utiles pour la santé des consommateurs (Leite de Souza, 2021). Les bactéries lactiques sont connues pour être résistantes aux effets cytotoxiques des HE. Cette résistance des bactéries lactiques aux phénoliques peut être due au fait que ces bactéries sont présentes et poussent sur des plantes contenant du phénol, et se sont donc adaptées pour coloniser avec succès ces substrats antagonistes. Les capacités de dégradation des composés phénoliques par les bactéries lactiques ont également été décrites, bien que les travaux sur le sujet soient limités (Rodríguez *et al.*, 2009; Gann, 2013).

Les résultats de Kivanç *et al.* (1991) suggèrent aussi que la croissance et la production d'acide de *Lactobacillus plantarum* sont inhibées par l'huile essentielle d'origan. Le cumin et les épices d'origan semblent stimuler la production d'acide. L'épice de cumin et son huile essentielle améliorent la production d'acide par *Leuconostoc mesenteroides* à des concentrations élevées, tandis que l'épice et l'huile d'origan inhibent la croissance et la production d'acide (Kivanç *et al.*, 1991).

Des études précédentes de Bartkiene *et al.* (2020) ont montré de fortes propriétés antimicrobiennes de certaines huiles essentielles qui n'inhibent pas les bactéries lactiques tout en inhibant les bactéries pathogènes.

Mais dans un travail effectué par Ouis, (2015), la croissance et l'activité acidifiante des bactéries lactiques principalement : les *streptococcus thermophilus*, *lactobacillus bulgaricus*, et *lactobacillus rhamnosus*, a été inhibées par l'action de l'huile essentielle des graines de fenouil même à des faibles doses.

Une étude récente montre également que les HE d'origan et de thym sont très actifs contre les bactéries bénéfiques *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium breve*. Cependant, ces résultats contrastent avec ceux de Si *et al.* (2006) qui ont rapporté que l'eugénol, la cannelle, le thymol et le carvacrol étaient moins actifs contre les lactobacilles et les bifidobactéries en relation avec des bactéries pathogènes (*Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*) (Roldán *et al.*, 2010).

7.2. Effet sur la flore pathogène et d'altération

Les micro-organismes pathogènes et les bactéries d'altération des produits laitiers et carnés tels que : *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et d'autres germes et levures ont été contrôlés avec succès par l'application des huiles essentielles (Leite de Souza, 2021). Très peu d'études ont été réalisées sur l'action des huiles essentielles contre les moisissures pathogènes et d'altération des denrées alimentaires pour déterminer leur capacité à inhiber les agents pathogènes d'origine alimentaire et les moisissures d'altération. Par contre, l'action de la cannelle et du thym étaient les plus efficaces sur six huiles testées (Angelini *et al.*, 2006).

7.3. Résidus des huiles essentielles dans le lait

Étant donné que les composants des HE pourraient conférer une odeur ou un goût indésirable au lait et aux produits dérivés ou interférer avec la transformation du lait, il est nécessaire de quantifier leurs résidus dans le lait (Hallier *et al.*, 2013).

Ferme *et al.* (2007) ont noté qu'aucun résidu détectable de disulfure de diallyle et de cinnamaldéhyde n'a été trouvé dans le lait des vaches qui ont reçu ces huiles essentielles dans leur alimentation.

McPhee *et al.* (2011) ont démontré, dans une étude réalisée sur des chèvres ayant reçu des injections intramammaires de thymol, que cette composante essentielle de l'huile disparaissait très rapidement du lait où tous les résidus de thymol étaient éliminés dans les 24 h.

Tandis que dans un travail effectué par Armorini *et al.* (2016), le traitement des bovins laitiers en lactation avec des produits phytoceutiques contenant le thymol et le carvacrol, a donné lieu à des niveaux de résidus faibles mais mesurables à 96 h pour le foie et à 36 h pour le lait.

CHAPITRE IV : Activités des huiles essentielles de Lamiacées sur les staphylocoques et les pathogènes majeurs responsables de mammites

1. Activité des huiles essentielles d'*Origanum*

1.1. Historique et origine

Le terme origan provient du mot grec *origanon* composé de : **Oros** : montagne et de **Ganos** : joie, beauté, éclat ou aspect riant, ce qui signifie « qui se plaît sur la montagne » (Caillaud, 2013; Grbović *et al.*, 2013). L'origan est un nom commun pour les produits dérivés de plus de 60 espèces végétales et qui appartiennent pour la plupart à la famille des *Labiatae* (*Lamiaceae*) et à la famille des Verbénacées (Popović *et al.*, 2010).

L'origan porte le nom scientifique ou botanique d'*Origanum vulgare* Linné (Caillaud, 2013). Cette plante est originaire de la région méditerranéenne, de l'ouest de l'Eurasie et du nord de l'Afrique (Beltrán et Esteban, 2016; Pezzani *et al.*, 2017). Au total, 38 espèces d'*Origanum* sont reconnues dans le monde, et la plupart des espèces (plus de 75%) sont concentrées dans la sous-région de la Méditerranée orientale (Sahin *et al.*, 2004).

Le genre *Origanum* est appelé communément « zaâtar » en Algérie.

1.2. Caractéristiques botaniques

1.2.1. Classification

Le genre *Origanum* appartient à la famille des *Lamiaceae* qui contient environ 7000 espèces qui sont regroupées en 236 genres et qui est largement distribué dans la région méditerranéenne (Caillaud, 2013; Bouyahya *et al.*, 2016). Ce genre inclut des arbustes nains dicotylédones qui sont des plantes annuelles et vivaces (Sahin *et al.*, 2004). Selon la classification d'Ietswaart (1980) basée sur les caractères morphologiques (longueur de la tige, forme des feuilles, nombre de branches...), le genre *Origanum* contient 3 groupes, 10 sections, 38 espèces, 6 sous-espèces et 16 hybrides (Caillaud, 2013; Bora *et al.*, 2022).

Selon la classification de Deysson (1967), l'origan appartient au :

- **Règne** : *Plantae*
- **Embranchement** : *Spermaphytes*
- **Sous embranchement** : *Angiospermes*
- **Classe** : *Dicotylédones*

- **Sous Classe** : *Gamopétales*
- **Super Ordre** : *Tubiflorales*
- **Ordre** : *Lamiales*
- **Famille** : *Lamiaceae*
- **Sous Famille** : *Népétoïdes*
- **Genre** : *Origanum* (Mahfouf, 2018)

1.2.2. Description morphologique

L'origan est une herbe vivace aromatique, de 20 à 80 cm de haut, blanche ou à fleurs pourpres, à face opposées, lancéolées et à feuilles dentées (figure 11) (Grbović *et al.*, 2013; Pezzani *et al.*, 2017). Les parties souterraines de toutes les espèces d'*Origanum* sont plus ou moins ligneuses et les tiges sont arrondies ou légèrement carrées (Ietswaart, 1980). Les feuilles sont sessiles ou pétiolées selon les espèces et mesurent de 1 à 4 cm de long et de 2 à 30 mm de large (Ietswaart, 1980; Grbović *et al.*, 2013), avec l'extrémité la plus large à la base, des bords lisses ou très peu dentés, et les extrémités des feuilles d'origan varient d'aigues à rondes (Skoufogianni *et al.*, 2019).

Les fleurs à tige courte, généralement violettes, mesurent de 4 à 7 mm de long (Grbović *et al.*, 2013), l'inflorescence est à plusieurs fleurs, avec des fleurs regroupées en pointes courtes latérales denses ou terminales et chaque fleur est à quatre étamines (Skoufogianni *et al.*, 2019), et cette plante fleurit de mai à octobre (Sezik *et al.*, 1993). La corolle (anneau de pétales réunis) est de couleur blanche, rose ou violacée et mesure de 3 à 14 mm de long avec deux lèvres à angles larges par rapport au tube (Ietswaart, 1980; Skoufogianni *et al.*, 2019). Les calices (anneaux de sépales unis) sont parmi les parties les plus variables du genre *Origanum*. Ils ont un caractère en commun : ils sont droits de contour, avec 2,5 à 6 mm de long et sont à cinq dents (Ietswaart, 1980; Skoufogianni *et al.*, 2019). La figure 11 montre les différentes parties de la plante d'*Origanum*.

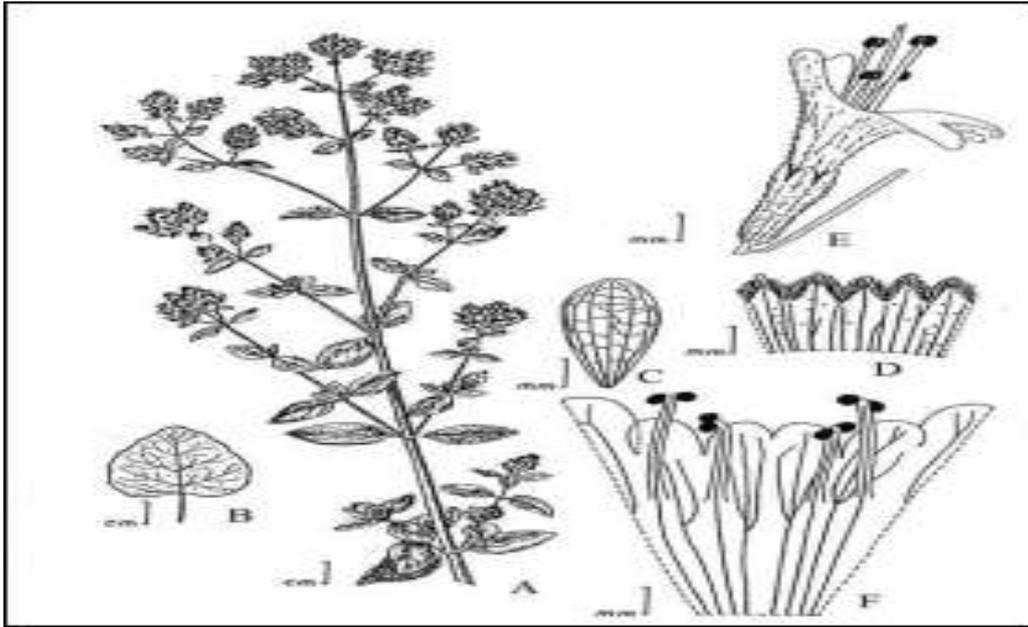


Figure 11. Dessin d'*Origanum vulgare* ssp. *vulgare* d'après Ietswaart (Ietswaart, 1980).

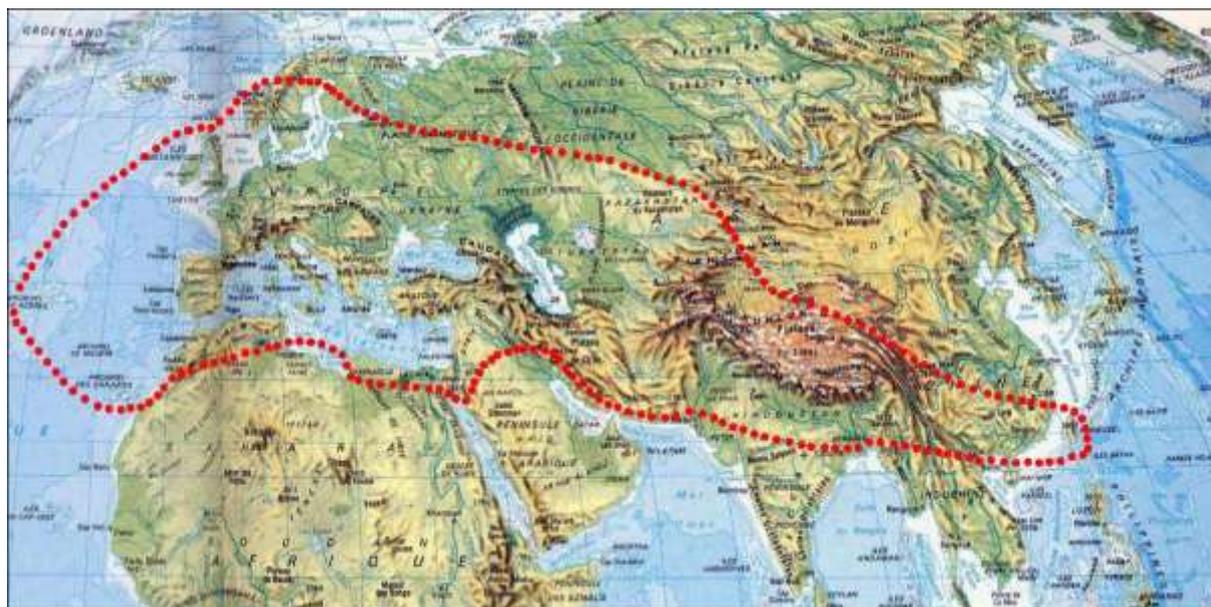
A : tige entière ; B : feuille ; C : bractée ; D : calice coupée par la lèvre inférieure ; E : fleur avec bractée avec vue de côté ; F : Corolle coupée par la lèvre inférieure.

1.3. Répartition géographique

1.3.1. Dans le monde

Les espèces du genre *Origanum* sont largement présentes dans les îles Canaries et dans les Açores, à l'Europe du Nord et à l'est de l'Asie. Elles peuvent être rencontrées aussi en culture à Cuba ou dans l'île de la Réunion, mais la région méditerranéenne représente la zone de distribution la plus importante de ce genre où on trouve que la plupart des espèces (à savoir 75%) poussent exclusivement dans la sous-région de la Méditerranée orientale (Ietswaart, 1980; Figueredo, 2007).

Ces plantes poussent surtout sur les sols calcaires des zones montagneuses, dans les falaises et les escarpements secs et dans les prairies pauvres sur une altitude atteignant jusqu'à 4000 m au-dessus du niveau de la mer (Ietswaart, 1980; Grbović *et al.*, 2013). La figure 12 représente la zone de distribution de l'origan dans le monde.



Le tableau 3 montre les régions de distribution des 06 sous-espèces d'*Origanum vulgare* dans le monde.

Tableau 3. Régions de distribution des sous-espèces d'*O. vulgare* dans le monde (Alekseeva et al., 2020)

Sous-espèces	Région
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>glandulosum</i> (Desfontaines) Ietsw	Algérie, Tunisie
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>gracile</i> (K.Koch) Ietsw	De la Turquie orientale à l'Afghanistan et la Sibérie méridionale
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> (Link) Ietsw	Balkans, Turquie
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>virens</i> (Hoffmanns. & Link) Ietsw	Açores, Madère, Îles Baléares, Portugal, Espagne, Maroc
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>viridulum</i> (Martrin-Donos) Nyman	Répandue de la Corse au Népal
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	De la Grande-Bretagne et de la Scandinavie à Taiwan ; naturalisé dans le Nord Amérique et Vénézuéla

1.3.2. En Algérie

Le genre *Origanum* en Algérie est représenté par deux espèces : *Origanum floribundum* Munby et *Origanum glandulosum* Desf. (Daoudi-Merbah *et al.*, 2016). Par contre, selon d'autres auteurs, il est représenté par trois espèces, avec *Origanum majorana* L. comme une troisième espèce (Sari, 2018). Le tableau 4 indique la répartition des espèces d'*Origanum* en Algérie.

L'espèce *O. floribundum* Munby est considérée comme une espèce rare et endémique en Algérie (Daoudi-Merbah *et al.*, 2016; Mahfouf, 2018).

Tableau 4. Répartition géographique des espèces d'origan en Algérie (Mahfouf, 2018)

Espèce	Localisation et caractéristiques
<i>Origanum glandulosum</i> Desf	Commune dans tout le Tell, Endémique Algéro-Tunisienne. Pousse dans les garrigues et broussailles
<i>Origanum floribudum</i> Munby	Pousse en pâturage et surtout en montagne. Espèce rare dans le sous-secteur du littoral et le secteur de Kabylie. Endémique d'Algérie

1.4. Principales utilisations de l'origan

1.4.1. Usages alimentaires

Depuis l'Antiquité, les plantes du genre *Origanum* sont utilisées comme herbes médicinales. Cependant, de nos jours l'importance des espèces d'*Origanum* dans les pratiques culinaires a dépassé leur importance thérapeutique (Alwafa *et al.*, 2021). L'aromatisation des aliments par l'utilisation d'herbes et d'épices naturelles est une nouvelle approche privilégiée pour réduire l'utilisation du sel dans la préparation des plats et pour accroître l'acceptabilité et l'appréciation des consommateurs (Krigas *et al.*, 2015). C'est ainsi que, l'origan est utilisé comme épice alimentaire pour aromatiser les aliments dans la plupart des pays du monde (Mombeini *et al.*, 2009; Beltrán et Esteban, 2016).

A cause de leur activité antibactérienne, ces plantes sont utilisées également comme des agents de conservation des aliments car ils permettent de retarder la croissance des bactéries dans les aliments ce qui permet une conservation plus longue de ces derniers (Beltrán et Esteban, 2016).

1.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle

Depuis l'antiquité et jusqu'à nos jours, les huiles essentielles ont été l'un des produits naturels les plus couramment utilisés dans plusieurs domaines et surtout dans la médecine traditionnelle (Bora *et al.*, 2022). Les plantes du genre *Origanum* ont été utilisées dans la médecine populaire et l'ethnomédecine pour traiter de nombreuses maladies infectieuses et pour soulager différentes douleurs (Beltrán et Esteban, 2016).

Les huiles essentielles d'*Origanum* sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter et soulager les maladies gastro-intestinales (telles que la diarrhée, douleurs et ulcères gastriques et les coliques), les maladies respiratoires (telles que l'asthme et la toux), les maladies rénales, hépatiques, métaboliques et hormonales, et sont utilisées aussi lors de cycles menstruels anormaux (Beltrán et Esteban, 2016).

1.5. Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum*

Les HE des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis longtemps pour avoir une action antibactérienne importante, parmi celles-ci, les huiles essentielles d'origan et de thym se sont avérées les plus efficaces contre les micro-organismes (Holley et Patel, 2005). L'activité des HE des différentes espèces du genre *Origanum* sur *S. aureus* et sur les autres bactéries responsables de mammites chez les vaches laitières a été démontrée dans de nombreuses études récentes, qui ont confirmé l'effet inhibiteur de ces HE sur la croissance des différents micro-organismes impliqués dans les mammites bovines (Rusenova et Parvanov, 2009; Bahmani *et al.*, 2019; Cheng et Han, 2020; Netopilova *et al.*, 2021; Kovačević *et al.*, 2021a; Neculai-Valeanu *et al.*, 2021; El amrani *et al.*, 2022).

2. Activité des huiles essentielles de *Thymus*

2.1. Historique et origine

Le thym est utilisé en médecine depuis des milliers d'années. En plus de son application culinaire commune, il a été recommandé pour une myriade d'indications, basées sur ses effets antimicrobiens, antiviraux, antitussifs, spasmolytiques proposés et son activité antioxydante (Basch *et al.*, 2004; Dauqan et Abdullah, 2017). Tout au long de l'histoire, les parties aériennes et les constituants volatils des espèces de *Thymus* sont fortement recommandés et sont communément utilisés comme tisanes, condiments et épices, ainsi qu'à diverses fins médicinales (Nikolić *et al.*, 2014). Traditionnellement, il a été utilisé pour traiter la dyspepsie, la gastrite chronique, l'asthme, la diarrhée, l'énurésie chez les enfants, la

laryngite, l'amygdalite (en gargarisme), et spécifiquement pour la coqueluche et la bronchite (Soni *et al.*, 2012).

Le thym (*Thymus vulgaris*) fait partie des herbes médicinales utilisées en médecine alternative. C'est une plante aromatique de la famille des Lamiacées et qui a reçu une attention majeure à la fois en tant que produit pharmaceutique et agent thérapeutique à travers le monde (Gumus *et al.*, 2017).

Le genre « *Thymus* », appelé communément en Algérie « Zaïtra », appartient à la famille des Lamiacées qui comprend environ 215 à 350 espèces. C'est une plante caractéristique de la région méditerranéenne qui peut être considérée comme le centre de ce genre, mais qui est présente aussi en Asie, au sud d'Europe et en Afrique du nord (Nikolić *et al.*, 2014; Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2016; Boulaghmen *et al.*, 2018).

2.2. Caractéristiques botaniques

2.2.1. Classification

Le genre *Thymus* appartient à la famille des Lamiacées selon la classification suivante

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophytes*

Classe : *Dicotyledonae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Sous-famille : *Nepetoideae*

Genre : *Thymus* (INPN, 2022).

Le nombre d'espèces actuellement cataloguées dépasse 500 espèces, bien qu'il peut exister encore beaucoup plus en raison de la grande facilité avec laquelle cette plante aromatique produit des hybridations et des mutations, et aussi en raison de son huile essentielle, dans laquelle sept chémotypes ont déjà été détectés, c'est d'ailleurs pour cette raison qu'il existe souvent des confusions taxonomiques pour ce genre et dont les variétés ou écotypes ont été identifiés comme des espèces différentes (Nieto, 2020).

2.2.2. Description morphologique

Le thym est une plante (ou petit arbuste) aromatique et vivace toujours verte de 10 à 30 cm de haut, avec un couvre-sol semi-persistant qui pousse rarement jusqu'à 40 cm de haut. Il est à la fois horizontal et vertical, les branches nombreuses deviennent ligneuses avec l'âge,

couvertes de poils épidermiques, dressées, compactes et brunâtres ou de couleur blanche veloutée. Les feuilles de thym sont sessiles, terriblement peu, linéaires et oblongues, légèrement enroulées sur les bords avec un dessous pâle et poilu, généralement de 2,5 à 8 mm de long. Les fleurs sont axillaires et groupées à l'extrémité des branches, formant une sorte de nœud terminal ayant une couleur rose ou blanche. Le fruit est un tétraquénium de couleur brune. Le thym fleurit à partir de Mars. C'est une espèce très variable, tant dans sa phénologie que dans la composition chimique de ses composés essentiels (Goodner *et al.*, 2006; Prasanth Reddy *et al.*, 2014; Tzima *et al.*, 2015; Hassani *et al.*, 2017; Nieto, 2020).



Figure 13. *Thymus vulgaris* (David, 2019).

2.3. Répartition géographique

2.3.1. Dans le monde

L'habitat du thym se situe dans les pays du bassin méditerranéen occidental. Il est abondant à l'Est, au Centre et au Sud de la péninsule ibérique, et il s'adapte à une large gamme de conditions environnementales. Le thym pousse dans des sols secs et ensoleillés ou relativement abrités, avec une ambiance bien éclairée et chaude. D'une façon générale, il préfère un climat doux avec plein de soleil et une longue saison de croissance car la plante a besoin d'une exposition au soleil et préfère les climats chauds et modérément secs, avec des

hivers doux et des étés ensoleillés. Il se développe dans les sols calcaires, argileux et, moins fréquemment, dans les sols siliceux. Il prospérera là où des températures moyennes de 68-86 ° F (20-30°C) au printemps et au début de l'été sont courantes et les températures du sol supérieures à 65°F (18°C) favorisent la croissance et la régénération après la récolte. Il pousse à une altitude de 0 à 1800 m avec un climat tempéré, chaud et montagneux. Il résiste au gel et à la sécheresse, mais pas à l'engorgement ni à l'excès d'humidité ambiante (Wilkinson *et al.*, 1979; Hailemariam et Emire, 2013; Król et Kiełtyka-Dadasiewicz, 2015; Nieto, 2020).

2.3.2. En Algérie

Le genre *Thymus* est représenté en Algérie par de nombreuses espèces en raison de la grande variabilité de ces espèces et hybrides qui se développent tout au long du territoire national, et dont ces différentes espèces sont réparties tout au long du littoral et arrivent même aux régions internes et aux zones arides et à l'Atlas saharien (Kabouche *et al.*, 2005; Abdelli, 2017).

2.4. Principales utilisations du thym

2.4.1. Usage alimentaire

Le thym est très utilisé en alimentation et en industrie agro-alimentaire et aromatique. Il est très précieux comme agent aromatisant au goût épicé couramment utilisé comme ingrédient culinaire pour ajouter de la saveur aux fromages et pour aromatiser les viandes de lapin et d'agneau. Il est utilisé aussi en alimentation comme conservateur alimentaire du fait de ses propriétés anti-oxydantes et antimicrobiennes contre de nombreux micro-organismes contaminants (Hailemariam et Emire, 2013; Anžlovar *et al.*, 2014; Satyal *et al.*, 2016; Nieto, 2020). L'application de l'huile essentielle de thym sur des denrées alimentaires à des concentrations appropriées peut prolonger la durée de conservation des aliments (Kang *et al.*, 2018).

2.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle

Le genre *Thymus* est l'un des genres les plus utilisés depuis des milliers d'années en médecine traditionnelle (Anžlovar *et al.*, 2014; Satyal *et al.*, 2016). Le thym et l'huile essentielle de thym (qui contient plus de 60 ingrédients actifs) sont utilisés en médecine traditionnelle pour traiter l'alopecie, la plaque dentaire comme sédatifs et carminatifs mais également pour le traitement des maladies de la peau (Satyal *et al.*, 2016; Nieto, 2020). Il est

utilisé aussi comme un remède antispasmodique, antimicrobien, expectorant et anti-inflammatoire (Amarti *et al.*, 2011).

2.5. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym

Les huiles essentielles de thym et d'origan avec deux de leurs principaux constituants, qui sont le thymol et le carvacrol, sont connues depuis longtemps par leur action antagoniste sur la croissance bactérienne (Juven *et al.*, 1994). Actuellement, les études portant sur l'action antibactérienne du thym et de l'huile essentielle de thym sur *Staphylococcus aureus* et sur de nombreux autres germes incriminés lors de mammites bovines sont très nombreuses. Pour le thym, la majorité des études se sont concentrées sur l'huile essentielle du thym commun, *Thymus vulgaris*. Ainsi, Kovačević *et al.* (2021b) ont démontré une activité efficace de l'huile essentielle du thym à thymol sur certaines bactéries responsables de mammites cliniques et subcliniques des vaches laitières, à savoir, *E. coli*, *Streptococcus spp* et à moindre efficacité sur *Staphylococcus spp* (Kovačević *et al.*, 2021b). Selon d'autres études, l'huile essentielle de thym a démontré une action antibactérienne efficace contre certaines bactéries isolées lors de mammites bovines, à savoir, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes* et *Streptococcus uberis* (Mullen *et al.*, 2014).

Selon l'étude réalisée par Hassani *et al.* (2017) sur l'effet bactéricide de *Thymus vulgaris* sur des souches de référence de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) et d'*Escherichia coli* (ATCC 10536), l'utilisation de 100 µl de l'HE de *T. vulgaris* a un effet bactéricide important sur ces deux bactéries et permis une inhibition à 73.33 % et à 87.77 % de la croissance de *S.aureus* et d'*E. coli* respectivement (Hassani *et al.*, 2017).

3. Activité des huiles essentielles de *Mentha*

3.1. Historique et origine

Le nom du genre *Mentha* a été inventé pour la première fois par le philosophe grec Théophraste (371-287 av. J.-C.), qui décrit plusieurs espèces végétales d'un point de vue botanique et agricole dans son étude des plantes. Le nom *Mentha* vient du grec classique de Minte (Mente) ou vient du vieil anglais minte (qui veut dire plante de menthe) (Shelepova *et al.*, 2021).

La plante *Mentha pulegium* appelée communément Menthe pouliot a été bien connue depuis l'antiquité dans les cultures grecques, romaines et médiévales pour son usage culinaire et ses propriétés médicinales (Caputo *et al.*, 2021).

3.2. Caractéristiques botaniques

3.2.1. Classification

Le genre *Mentha* est parmi les principaux genres appartenant à la famille des Lamiacées et comprend actuellement plus de 60 espèces, 31 sous-espèces ou variétés botaniques et 11 espèces hybrides reconnues selon le dernier classement taxonomique (Jebali *et al.*, 2022; Shelepova *et al.*, 2021). La classification taxonomique du genre *Mentha* est la suivante :

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Mentha* (Banerjee, 2013).

3.2.2. Description morphologique

La menthe est une plante herbacée vivace aromatique et tomenteuse qui pousse toute l'année dans les plaines alluviales et les habitats riverains. D'une hauteur de 20 à 40 cm, les menthes ont des tiges carrées et couchées avec des feuilles ascendantes opposées et parfumées, étroitement ovales ou elliptiques. Les fleurs des menthes sont souvent en épis verticillés bien espacés à l'aisselle des feuilles, de couleur violet pâle, irrégulières à deux lèvres avec (parfois) 5 sépales et 5 pétales, avec 2 ou 4 étamines, un ovaire super segmenté en 4 lobes du fait qu'il mûrit en 4 nucules à une seule graine qui est la caractéristique la plus constante de la famille (Casiglia *et al.*, 2017; Caputo *et al.*, 2021; Jebali *et al.*, 2022). La figure 14 montre la description de la plante *Mentha pulegium*.



Figure 14. *Mentha pulegium* L. (Sutour, 2010).

3.3. Répartition géographique

3.3.1. Dans le monde

Le genre *Mentha* de la famille des *Lamiaceae* est un genre important composé d'herbes vivaces aromatiques réparties principalement dans les régions tempérées et sub-tempérées du monde (Agnihotri *et al.*, 2005). La plante *Mentha pulegium* L. (Pennyroyal), appartenant à la famille des Lamiacées est originaire d'une vaste zone couvrant l'Asie centrale, le Moyen-Orient, l'Europe et l'Afrique du Nord. Elle a été introduite aux Amériques, certaines parties de l'Asie, le Mozambique, l'Australie et la Nouvelle-Zélande (Casiglia *et al.*, 2017).

3.3.2. En Algérie

Mentha pulegium est une espèce qui pousse spontanément en Algérie particulièrement dans les régions humides (Brada *et al.*, 2007), c'est la plus commune des espèces de menthe poussant en Algérie (Beghidja *et al.*, 2007). La menthe pouliot appelée communément « Fliou » en Algérie, est retrouvée surtout sur les terrains humides, le long des rives des eaux courantes ou stagnantes, à proximité des routes et dans les prairies des montagnes (Chalchat *et al.*, 2000).

3.4. Principales utilisations de la menthe pouliot

3.4.1. Utilisation alimentaire

Les espèces de menthe présentent plusieurs vertus et ont été utilisées à des fins différentes, telles que des utilisations culinaires pour améliorer l'arôme et la saveur, ainsi que dans les cosmétiques (Jebali *et al.*, 2022). Les feuilles de la plante étaient utilisées pour aromatiser le pudding (Hadi *et al.*, 2017).

3.4.2. Utilisation en médecine traditionnelle

Mentha pulegium L. fait partie des plantes aromatiques et médicinales largement utilisées en médecine traditionnelle (Barhoumi, 2020). Les parties sèches de menthe pouliot et son HE ont été utilisées en médecine traditionnelle comme remèdes ménagers pour les troubles gastro-intestinaux et les affections du foie et de la vésicule biliaire et pour d'autres affections comme la goutte, l'aménorrhée, l'augmentation de la miction, le rhume, les affections cutanées, comme abortif, et également en aromathérapie (comme antibactériens) (Agnihotri *et al.*, 2005; Luís et Domingues, 2021). En fait, des rapports antérieurs ont montré que l'huile essentielle de *M. pulegium* a montré une activité antibactérienne contre plusieurs souches bactériennes. De plus, le profil toxicologique de la menthe pouliot a également fait l'objet de recherches approfondies, et plusieurs constituants, en particulier les terpénoïdes ont été identifiés comme hépatotoxiques et abortif (Luís et Domingues, 2021). Le composé principalement responsable des effets toxiques de *M. pulegium* est la pulégone, qui confère à la plante la caractéristique de saveur de menthe poivrée qui est généralement très abondante dans son HE. Ce composé, une fois ingéré, peut agir comme un inhibiteur enzymatique et possède un organotropisme marqué pour le rein et le foie (Caputo *et al.*, 2021). La plupart des espèces de *Mentha* sont utilisées aussi comme désodorisants buccaux, astringents, toniques et laxatifs doux (Agnihotri *et al.*, 2005).

3.5. Activité antibactérienne des huiles essentielles de Menthe

La menthe verte (*Mentha spicata*) et la menthe pouliot (*Mentha pulegium*) ont été généralement reconnus comme sûres et sans danger. Les feuilles, les fleurs et les tiges de ces plantes sont fréquemment utilisées comme additifs pour de nombreux aliments, afin d'offrir l'arôme et la saveur. Certaines études récentes ont démontré l'activité antimicrobienne *in vitro* de leurs huiles essentielles contre les agents pathogènes d'origine alimentaire, y compris *Staphylococcus aureus* (Houicher *et al.*, 2020).

Dans une étude récente, Messaoudi *et al.*, (2022), ont démontré une activité antibactérienne importante de l'HE de *Mentha pulegium* récoltée à l'état sauvage sur certains micro-organismes impliqués dans les mammites bovines, à savoir, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Candida albicans* (ATCC 10231) avec des diamètres d'inhibition de $37.33 \text{ mm} \pm 1.15$, $31.67 \text{ mm} \pm 1.53$ et $11 \text{ mm} \pm 0.87$ respectivement (Messaoudi *et al.*, 2022).

Aussi, selon une autre étude réalisée au Maroc, l'HE de *Mentha pulegium* possède une activité inhibitrice importante sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des diamètres d'inhibition de 24 mm et 15 mm respectivement (Derwich, Benziane, *et al.*, 2010).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I : Utilisation des antibiotiques et de l'aromathérapie dans la gestion des mammites au tarissement dans le nord Algérien

1. Introduction

Le tarissement est une période critique dans le cycle de production du lait des vaches laitières et la bonne gestion de cette période, du point de vue gestion de l'alimentation et la distribution de rations adaptées aux besoins des vaches laitières durant cette phase, ainsi que la gestion de la santé du pis par les contrôle et le traitement des infections intra-mammaires, est nécessaire pour assurer une bonne production laitières durant les lactation à venir. Dans cette optique, une enquête par un questionnaire, destinée aux vétérinaires praticiens du nord de l'Algérie, concernant la gestion et la conduite, par les éleveurs, de la période sèche des vaches laitières dans les exploitations laitières suivies par ces vétérinaires a été entretenue en vue d'éclaircir la situation de nos élevages et le comportement des éleveurs durant cette période.

2. Matériel et méthodes

2.1. Le questionnaire

En raison du confinement imposé dans notre pays (Algérie) en raison de la pandémie du COVID-19 et des restrictions de la circulation entre les régions concernées par cette étude, et afin de faciliter le bon déroulement de notre enquête auprès des vétérinaires du nord du pays, un questionnaire en ligne a été créé via Google Forms®.

Le questionnaire de l'enquête (Annexe 1) est constitué de 31 questions comprenant des questions à choix multiples, des questions à réponse courte, à liste déroulante, à échelle linéaire et des questions à case à cocher. Le questionnaire a été enrichi d'illustrations pour fournir plus d'informations aux vétérinaires enquêtés sur deux indicateurs, le score d'état corporel ou Body Condition Score (BCS) et le California Mastitis Test (CMT).

Une liste non exhaustive des antibiotiques commercialisés à administration locale intra-mammaire ou systémique chez la vache tarie a été utilisée pour définir les molécules fréquemment utilisées par les vétérinaires. Cependant, pour des raisons éthiques, l'analyse et la présentation des résultats se sont limitées aux dénominations communes internationales (DCI) et aux noms des familles des antibiotiques sans citer les noms commerciaux.

2.2. Thèmes abordés par le questionnaire

Les questions techniques ont porté sur les points suivants :

- Gestion de la période sèche, y compris la gestion de l'alimentation.
- Approches adoptées par l'éleveur pour contrôler les mammites.
- Caractéristiques du traitement des vaches au tarissement (pratiques de Dry Cow Therapy (DCT)).
- Efficacité de la pratique de DCT.
- Solutions visant à réduire l'utilisation des antibiotiques par des alternatives ou des compléments à l'antibiothérapie (obturateur du trayon, phytothérapie et aromathérapie).

2.3. Population cible

La population cible est représentée par les vétérinaires praticiens exerçant en zone mixte ou rurale uniquement du nord algérien. Dont certaines adresses électroniques ont été collectées auprès de la direction des services agricoles de la wilaya. Cette sélection se justifie par la possibilité d'accéder à plusieurs exploitations par un même vétérinaire et par conséquent une centaine d'exploitations laitières seront couvertes par ce questionnaire.

2.4. Taux de participation

Le nombre de réponses reçues après une durée de l'enquête s'étalant sur 18 mois (première réponse reçue le 15 avril 2020 et la dernière réponse reçue le 7 octobre 2021) a été de 37 réponses. Tous les répondants ont rempli au moins 96 % du questionnaire.

2.5. Localisation des participants

L'enquête a couvert l'ensemble du nord de l'Algérie où 15 wilayas sont représentées. La majorité des vétérinaires qui ont remplis le questionnaire appartient au nord-est de l'Algérie. Les wilayas de Constantine de Skikda et d'Oum El Bouaghi ont été les régions les plus représentées (Figure 15).

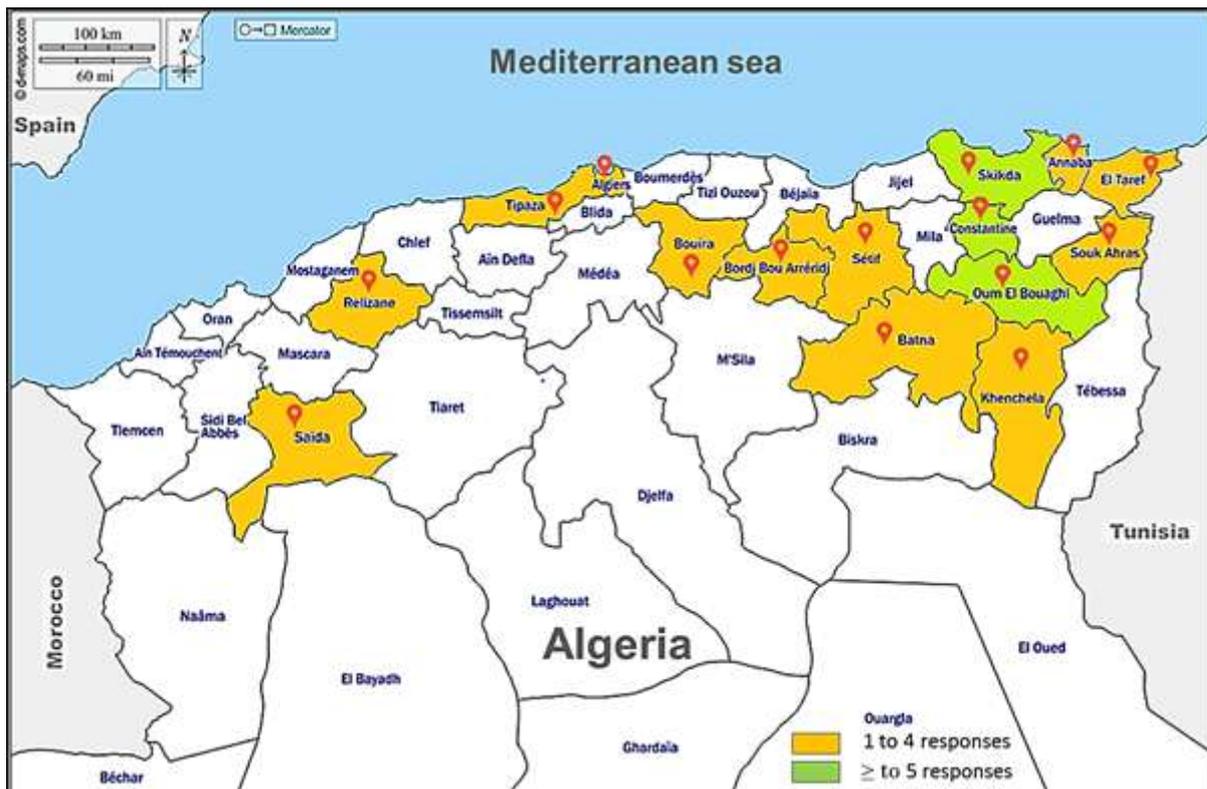


Figure 15. Localisation géographique des répondants au nord-est algérien.

2.6. Analyse statistique

Les réponses aux questions de l'enquête ont été analysées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 26. L'analyse descriptive des variables catégorielles impliquant les fréquences et les intervalles de confiance de chaque catégorie a été établie par le test binomial non paramétrique. L'estimation sera la proportion observée.

La relation entre les catégories des variables qualitatives (gestion de la période sèche, pratique de DCT et efficacité de DCT) a été explorée à l'aide de l'analyse des correspondances multiples (ACM) démontrant les résultats dans une dimension graphique. De plus, les mesures de discrimination ont été développées et les graphiques de quantification des catégories ont été appliqués pour identifier les associations des catégories.

Une analyse de cluster hiérarchique (ACH) a été effectuée pour classer tous les répondants (de v1 à v37) en groupes. Ces clusters ont été obtenus à partir des scores d'objets à deux dimensions de l'analyse des correspondances multiples (ACM) en utilisant la méthode de la distance euclidienne au carré. La solution de cluster a été sélectionnée en considérant que la solution expliquée est égale ou supérieure à 5 % des variables dépendantes par

rapport à la solution précédemment appliquée. Les variables pertinentes de l'ACM discriminant les dimensions 1 et 2 ont été comparées entre elles et au sein des groupes dérivés comprenant au moins deux sujets à l'aide des tableaux croisés.

3. Résultats et discussion

3.1. Gestion de la période sèche

3.1.1. Taille du troupeau

Les troupeaux laitiers couverts par les vétérinaires ayant participé à l'enquête varient en taille, de moins de 10 vaches par exploitation (45,95 %) à plus de 100 vaches pour la plus grande exploitation (2,70 %). La production laitière nationale est assurée à hauteur de 70% par le cheptel bovin, avec la mise en place d'un système de production semi-intensif (bovins laitiers modernes) qui assure l'essentiel de la production à travers un troupeau composé de vaches importées à haut potentiel génétique. D'autre part, le système de production extensif (Bovins laitiers améliorés) est assuré par des croisements entre vaches locales et importées, réparties dans des exploitations laitières de petite taille (1 à 6 vaches) comme revu par Meklati *et al.* (2020) (Meklati *et al.*, 2020). La caractérisation et la typologie des systèmes d'élevage laitier étudiés à travers l'enquête de Boukhechem *et al.* (2019), impliquant 217 exploitations laitières situées dans le nord de l'Algérie, a révélé une moyenne de 18,6 vaches/exploitation. La taille moyenne élevée du troupeau (35,14 %) (10-20 vaches/exploitation) enregistrée dans nos résultats est en accord avec ceux de ces auteurs (Boukhechem *et al.*, 2019).

3.1.2. Arrêt progressif et brutal de la traite au tarissement

Les résultats de l'enquête montrent que seulement 27,03 % des éleveurs de la zone d'étude pratiquent un arrêt brutal de la traite tandis que 72,97 % pratiquent un tarissement progressif. Cette part importante des pratiques d'élevage par rapport à la santé de la mamelle reste inférieure à celle obtenue (95,65 %) par Kebbal *et al.* (2020) à partir d'une étude descriptive menée sur 92 exploitations situées à Blida, région qui n'est pas couverte par cette enquête (Kebbal *et al.*, 2020).

Ces résultats sont également inférieurs à ceux obtenus par Roussel *et al.* (2020) en France, puisque sur 79 éleveurs interrogés, 69 (87,34 %) pratiquaient un arrêt brutal de la traite le jour du tarissement. Cette gestion du tarissement est également répandue (73%) en

Allemagne, selon le questionnaire mené par Bertulat *et al.* (2015) et qui est rempli par 91 agriculteurs.

L'arrêt de la traite est un processus crucial à considérer, principalement chez les animaux à haut rendement (Gott *et al.*, 2017). En effet, des risques élevés de nouvelles infections intra-mammaires (IIM) chez la vache en début du tarissement ont été associés à une dilatation au niveau des citernes du pis en raison de la forte pression exercée par l'accumulation excessive du lait suite à un tarissement brutal (Bertulat *et al.*, 2013; Vilar et Rajala-Schultz, 2020) ; d'autant plus que les vaches à haute production subissant ce type de tarissement sont plus sensibles aux fuites de lait (Zobel *et al.*, 2013; Vilar et Rajala-Schultz, 2020). Cela peut être limité par une diminution progressive de la traite pour réduire l'apparition de nouvelles IIM pendant la période sèche et au début de la nouvelle lactation (Gott *et al.*, 2017).

L'enquête montre aussi la non séparation entre les vaches taries et celles en lactation dans 35,14% des élevages, ce qui est inférieur aux résultats (65,22%) obtenus par Kebbal *et al.* (2020). Par ailleurs, la majorité des éleveurs (70,27 %) ne respectent pas une ration adaptée aux besoins des vaches taries, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des éleveurs distribuent aux animaux une ration alimentaire sans formulation ni stratégie nutritionnelle adaptée à leurs besoins réels et à l'état physiologique (Meskini *et al.*, 2021). Bien que, les vaches taries ont souvent (69,44 %) un score d'état corporel adéquat (BCS = 3), indiquant la préservation du bien-être de l'animal en terme d'alimentation à cette période ce qui est en accord avec les résultats de Roche *et al.* (2009).

Tableau 5. Caractéristiques de la gestion de la période sèche dans les troupeaux couverts par l'enquête dans le nord de l'Algérie

Gestion de la période sèche	Variantes	Données manquantes	Frequence (n)	Estimation (%)	Intervalle de Confiance à 95%	
					inferieur	superieur
Taille du troupeau			37			
	< 10 vaches		17	45,95	29,49	63,08
	10 to 20 vaches		13	35,14	20,21	52,54
	20 to 40 vaches		4	10,81	3,03	25,42
	50 to 70 vaches		2	5,41	0,66	18,19
	> 100 vaches		1	2,70	0,07	14,16
Séparation entre vaches tarries et vaches en lactation			37			
	Jamais		13	35,14	20,21	52,54
	Rarement		20	54,05	36,92	70,51
	Souvent		3	8,11	1,70	21,91
	Toujours		1	2,70	0,07	14,16
Gestion du tarissement			37			
	Arrêt brutal		10	27,03	13,79	44,12
	Arrêt progressif		27	72,97	55,88	86,21
Durée d'arrêt de la traite		12	25			
	0-7 jours		11	44,00	24,40	65,07
	10 jours		4	16,00	4,54	36,08
	15 jours		4	16,00	4,54	36,08
	20 jours		3	12,00	2,55	31,22
	25 jours		1	4,00	0,10	20,35
	30 jours		2	8,00	0,98	26,03
Ration adaptée au tarissement			37			
	Non		26	70,27	53,02	84,13
	Oui		11	29,73	15,87	46,98
Note d'état corporel (NEC)		1	36			
	NEC = 2		4	11,11	3,11	26,06
	NEC = 3		25	69,44	51,89	83,65
	NEC = 4		5	13,89	4,67	29,50
	NEC = 5		2	5,56	0,68	18,66

3.2. Réactions des éleveurs pour le contrôle des mammites

3.2.1. Demande par les éleveurs d'un antibiotique intra-mammaire pour les vaches tarries (automédication)

Les vétérinaires interrogés ont noté que 27,03 % des éleveurs sont totalement indifférents aux campagnes de vaccination pour le bétail, tandis que 54,05 % des éleveurs

y participent rarement. Ces campagnes, généralement gratuites, ont été principalement initiées ces dernières années suite à la recrudescence des cas de fièvre aphteuse et en raison des pertes économiques encourues (Meklati *et al.*, 2020; Meskini *et al.*, 2021). Cette réticence des éleveurs se traduit également par le fait qu'une grande majorité d'entre eux ne vaccine pas contre la mammite (91,67%). Ceci s'explique probablement par le manque de commercialisation de ce type de vaccin sur le marché de la médecine vétérinaire, comme l'observent les praticiens (81,08%).

Les résultats de l'enquête ont montré la présence importante de mammites au tarissement dans les exploitations laitières couvertes par les vétérinaires interrogés puisqu'environ 43,25% des éleveurs demandent des antibiotiques intra-mammaires (ATB IMM) pour lutter contre les mammites à cette période, néanmoins, l'évaluation de leur prévalence à travers les études épidémiologiques au tarissement dans les troupeaux laitiers algériens n'ont pas souvent été publiées.

Cependant, plus de la moitié (56,75 %) des vétérinaires enquêtés ont déclaré que les éleveurs réclament peu ou pas de traitement antibiotique au tarissement. Ce résultat est très proche de celui (52,17 %) noté par Kebbal *et al.* (2020). Ceci s'explique par le recours abusif à l'automédication, notamment pour le traitement de la mammite bovine (Debeche *et al.*, 2018). Cette pratique est malheureusement très fréquente dans les pays émergents et plus particulièrement en Afrique où les médicaments vétérinaires sont souvent vendus sans ordonnance, favorisant le développement de résistances aux antibiotiques (Darwish *et al.*, 2013; Ssajjakambwe *et al.*, 2017; Titouche *et al.*, 2019).

Tableau 6. Approches adoptées par les éleveurs pour lutter contre la mammite dans la zone étudiée

Approches adaptées au tarissement pour contrôler les mammites	Variantes	Frequence (n)	Estimation (%)	Intervalle de Confiance à 95%	
				inferieur	superieur
Utilisation des vaccins contre les maladies infectieuses bovines par les éleveurs		37			
	Jamais	10	27,03	13,79	44,12
	Rarement	20	54,05	36,92	70,51
	Souvent	6	16,22	6,19	32,01
	Toujours	1	2,70	0,07	14,16
Connaissance des marques des vaccins contre les mammites		37			
	Non	30	81,08	64,84	92,04
	Oui	7	18,92	7,96	35,16
Utilisation des vaccins contre les mammites par les éleveurs		36			
	Non	33	91,67	77,53	98,25
	Oui, mais pas tellement	3	8,33	1,75	22,47
Recommandation de la vaccination contre les mammites		36			
	Non	14	38,89	23,14	56,54
	Oui	22	61,11	43,46	76,86
Demande d'ATB intramammaires pour vaches taries par les éleveurs		37			
	Jamais	5	13,51	4,54	28,77
	Rarement	16	43,24	27,10	60,51
	Souvent	13	35,14	20,21	52,54
	Toujours	3	8,11	1,70	21,91

3.2.2. Traitement des vaches taries

Les résultats résumés dans le tableau 07 montrent que seulement 13,51 % des vétérinaires interrogés traitent systématiquement les vaches taries quel que soit l'état de santé de leur mamelle (traitement général ou systématique), tandis que la majorité (86,49 %) sélectionne les vaches pour un traitement au tarissement (traitement sélectif). Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans l'enquête menée par Vilar *et al.* (2018) dans les troupeaux laitiers finlandais avec une dominance de la thérapie (DCT) sélective (78 %) sur l'utilisation de la thérapie (DCT) générale. Ceci contraste avec ce qui a été observé dans certains pays industrialisés comme les États-Unis (USDA APHIS, 2008) et l'Allemagne (Bertulat *et al.*, 2015) où, respectivement, 90 % et 79,6 % des exploitations laitières étudiées appliquent une couverture antibiotique avec un traitement systématique au tarissement (DCT générale).

Parmi les vétérinaires participant à l'enquête et utilisant la thérapie sélective, 77,4 % traitent les vaches pour des signes cliniques évidents de mammite (par exemple, présence de grumeaux dans le lait) ; 32,26 % sur la base du score CMT correspondant à un nombre de cellules somatiques supérieur ou égal à 400 000 cellules/mL. De plus, les vaches tarées atteintes de mammite récurrente faisaient partie du groupe sélectionné dans 45,16 % des cas (Figure16). Cependant, l'utilisation de tests bactériologiques pour la thérapie sélective était faible (12,9%). Des considérations de terrain et financières liées à l'échantillonnage et à l'examen du lait de toutes les vaches tarées peuvent expliquer cette mauvaise utilisation des tests bactériologiques. L'utilisation très limitée de cette pratique est corroborée par les résultats (31 %) obtenus par Bertulat *et al.* (2015). A l'inverse, dans les fermes laitières finlandaises caractérisées par une thérapie sélective, les tests microbiologiques ont été la méthode privilégiée pour sélectionner les vaches avant le traitement au tarissement (82 %), suivis d'autres critères de sélection, comme les antécédents des mammites cliniques et le nombre élevé de cellules somatiques (Vilar *et al.*, 2018).

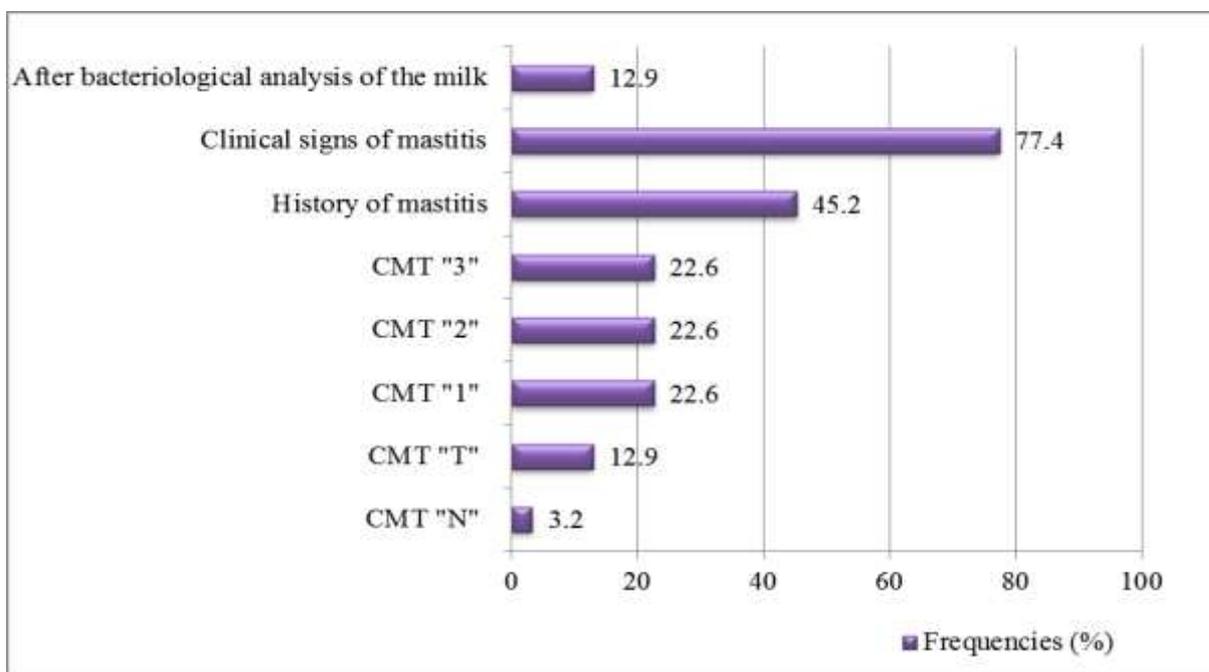


Figure 16. Critères de sélection pour le traitement des vaches au tarissement.

CMT "N": négatif, CMT "T": traces, CMT "1": faiblement positif, CMT "2": clairement positif avec un score élevé, CMT "3": fortement positif.

3.2.3. Début de l'antibiothérapie au tarissement

L'enquête a montré que 62,50 % des vétérinaires interrogés démarrent une antibiothérapie dès la première semaine du tarissement, alors que seulement 25 % l'initient dès le premier jour leur permettant de profiter de cette approche. L'application d'un traitement antibiotique le jour du tarissement peut réduire considérablement la prolifération des agents pathogènes de la mammite (Krömker et Leimbach, 2017), et il est beaucoup plus efficace pour guérir les vaches infectées (Remy, 2010).

3.2.4. Antibiothérapie intra-mammaire et parentérale des vaches au tarissement

Le nombre de vétérinaires utilisant exclusivement la voie intra-mammaire pour le traitement des mammites chez les vaches taries, même en présence de mammites cliniques, été faible (18,92 %), de même que celui des vétérinaires qui combinent les deux voies systémique et locale malgré l'absence de mammites cliniques (13,51 %) (Tableau 07). Selon Remy, (2010), l'administration d'antibiotiques par voie intra-mammaire est beaucoup plus efficace pour guérir les vaches que l'utilisation de la voie systémique. Cependant, la combinaison de ces deux voies a un effet positif et peut éliminer plus de germes que la voie locale seule. L'association entre ces deux modalités révélée dans la présente enquête semble être conditionnée par l'altération de l'état général des animaux lors de mammites cliniques dans 32,43 % des cas. Ces disparités dans les réponses fournies peuvent s'expliquer par des différences de gestion des mammites d'un élevage à un autre. En effet, peu d'éleveurs initient le traitement dès l'apparition des premiers symptômes, mais plutôt lorsque les signes de mammite clinique s'accompagnent d'une dégradation de l'état général de l'animal. Ceci a également été confirmé par les travaux de Kebbal *et al.* (2020) qui ont noté que la mammite été un problème sérieux dans les élevages algériens étudiés. Cependant, notre enquête a montré que la perfusion intra-mammaire été la voie privilégiée seule ou en association avec une administration systémique et quelle que soit la forme de la maladie, ce qui est cohérent avec les résultats d'une enquête menée en France auprès de 523 élevages (Gay *et al.*, 2002). Ces auteurs rapportent l'utilisation de la voie intra-mammaire en association avec la voie parentérale indépendamment du tableau clinique dans moins de 40 % des cas. De plus, au Royaume-Uni, Fujiwara *et al.* (2018) ont constaté qu'une grande majorité (95,9 %) des exploitations enquêtées utilise des tubes antibiotiques intra-mammaires de la vache tarie au tarissement, dont 82,2 % en combinaison avec des obturateurs internes et/ou externes des trayons.

3.3. Fréquence des molécules et des familles d'antibiotiques utilisées comme untraitement intra-mammaire (IMM) des vaches tarées

Les résultats de l'enquête ont révélé que 40,54 % des vétérinaires utilisent exclusivement la céfalexine (LEX) pour les traitements intra-mammaires (Figure17), laquelle été associée à d'autres molécules par 24,32 % des vétérinaires. Le céfalonium (CNM) est la deuxième molécule la plus utilisée par voie locale (10,81 %). Le taux d'utilisation d'une infusion intra-mammaire d'une molécule ou d'une autre varie selon la région (pays) et le stade physiologique (tarissement ou lactation). Par exemple, en Angleterre et au Pays de Galles, l'enquête menée par Brunton *et al.* (2012) en 2010/2011 au niveau des fermes laitières a montré que 96% utilisent des antibiotiques intra-mammaires au tarissement et où le céfalonium, une céphalosporine de première génération, été la molécule la plus fréquemment utilisée (43%). Aux États-Unis, les antibiotiques pour vaches tarées les plus utilisés été l'association pénicilline G (procaïne)/ dihydrostreptomycine et la céphapirine, respectivement 36,9 % et 31,0 % (USDA APHIS, 2008). Compte tenu du stade physiologique, les antibiotiques pour vaches tarées ont une action prolongée et sont destinés aux animaux qui ne devraient pas produire de lait. Selon l'enquête menée en France (entre juin 1999 et janvier 2001), le produit le plus couramment utilisé pour traiter les mammites cliniques chez les vaches laitières par voie intra-mammaire été un produit commercial associant trois antibiotiques (tétracycline, néomycine et bacitracine) et un anti-inflammatoire (prednisolone). Cette association été utilisée par 57,2 % des répondants, suivie par l'association de deux antibiotiques, l'amoxicilline et l'acide clavulanique (AMC) avec une fréquence de 15 % (Gay *et al.*, 2002). Cependant, l'étude de la prévalence des antibiotiques intramammaires en lactation (IMM) menée par Burke et Adley (2021) a révélé que l'association AMC a été préférée en première intention chez 34% des producteurs laitiers irlandais. Ils ont également signalé que les aminosides dont les formulations été commercialisées sous la forme d'une combinaison de deux produits, le premier est une combinaison entre la novobiocine, la dihydrostreptomycine et la néomycine ; le second contient de la kanamycine et de la céfalexine, complétant le classement avec respectivement 31 % et 16 % de fréquence.

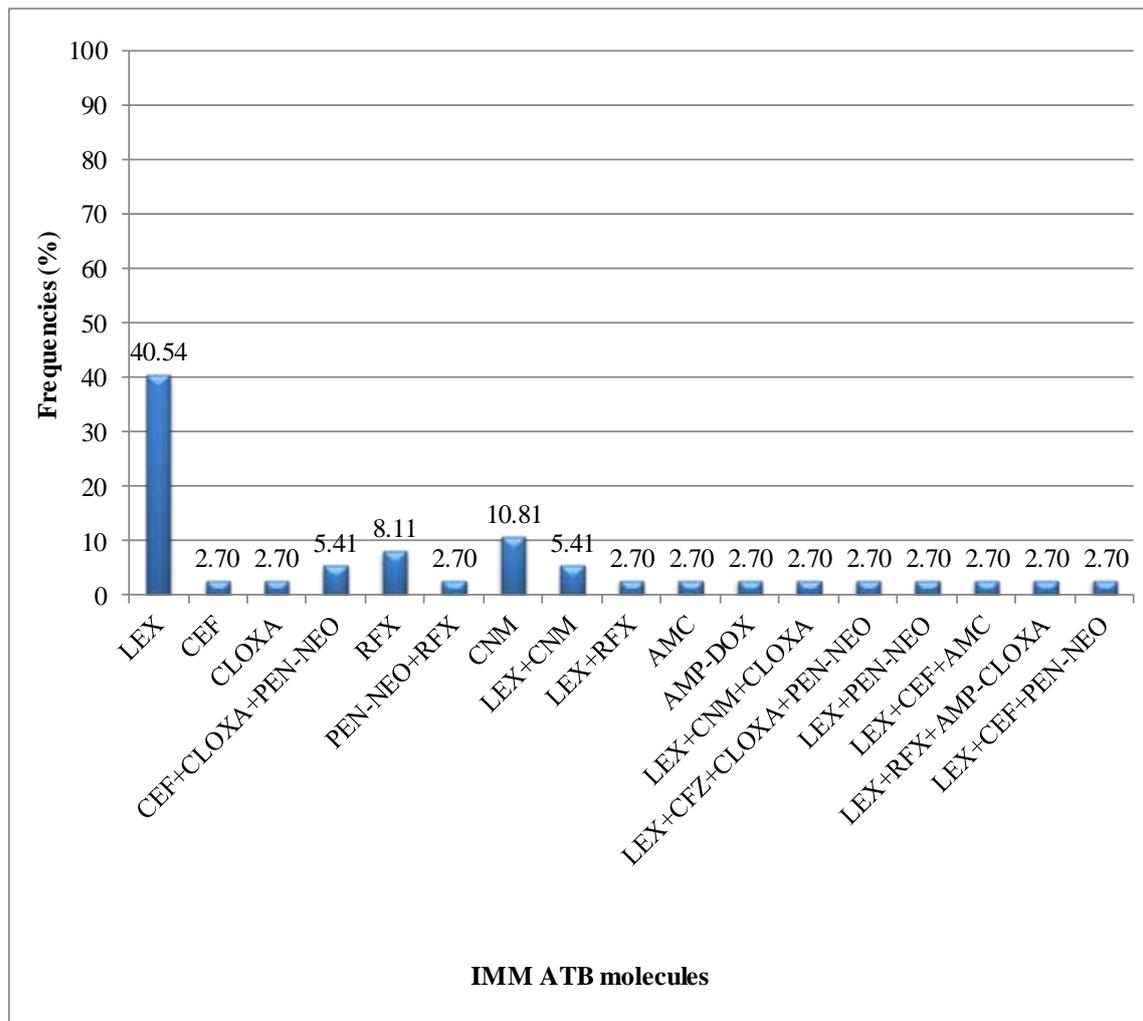


Figure 17. Molécules d'antibiotiques intra-mammaires utilisées pour le traitement de la vache tarie

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; AMP- CLOXA : Ampicilline+cloxacilline ; AMP- DOX : Ampicilline+Dicloxacilline ; CEF: Cefquinome; CFZ: Cefazoline; CL: Colistine; CLOXA : Cloxacilline ; CNM: Cefalonium; LEX: Cefalexine; PEN-NEO: Benzylpenicilline + Neomycine; RFX: Rifaximine

Comme le montre la figure 18, les β -lactamines ont été les antibiotiques les plus couramment utilisés au tarissement par les vétérinaires interrogés avec une fréquence de 72,97 %. Concernant l'association de deux ou plusieurs familles d'antibiotiques, les résultats montrent que l'association β -lactamines + aminosides été la plus fréquemment formulée avec un pourcentage de 10,81 %. Dans une enquête menée en Pennsylvanie (États-Unis) sur les antibiotiques utilisés pour le traitement de diverses maladies chez les vaches laitières, les bêta-lactamines ont été les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des mammites chez les vaches tariées (Sawant *et al.*, 2005). La nature de la

gamme majoritaire d'antibiotiques est largement déterminée par les attitudes des vétérinaires et des éleveurs. Aux Pays-Bas, il y a eu une tendance croissante ces dernières années à réduire l'utilisation des médicaments par les vétérinaires suivant les élevages laitiers néerlandais pour le traitement des mammites (Scherpenzeel *et al.*, 2018).

Cependant, il a été constaté dans ce pays de 2005 à 2012, que les éleveurs ont été réticents à réduire l'utilisation des molécules telles que les pénicillines à spectre étroit ou certaines combinaisons (Procaine benzylpénicilline-aminoglycoside) pendant la période sèche (Kuipers *et al.*, 2016). Ces derniers ont signalé une faible utilisation des bêta-lactamines comme les céphalosporines de troisième et quatrième génération (0,21 % en 2005-2010 à 1,17 % en 2011) contre une évolution vers l'association pénicilline-aminoglycoside comme traitement des vaches tarées (DCT) entre 2005-2010 (14,17 %) et en 2012 (22,91 %).

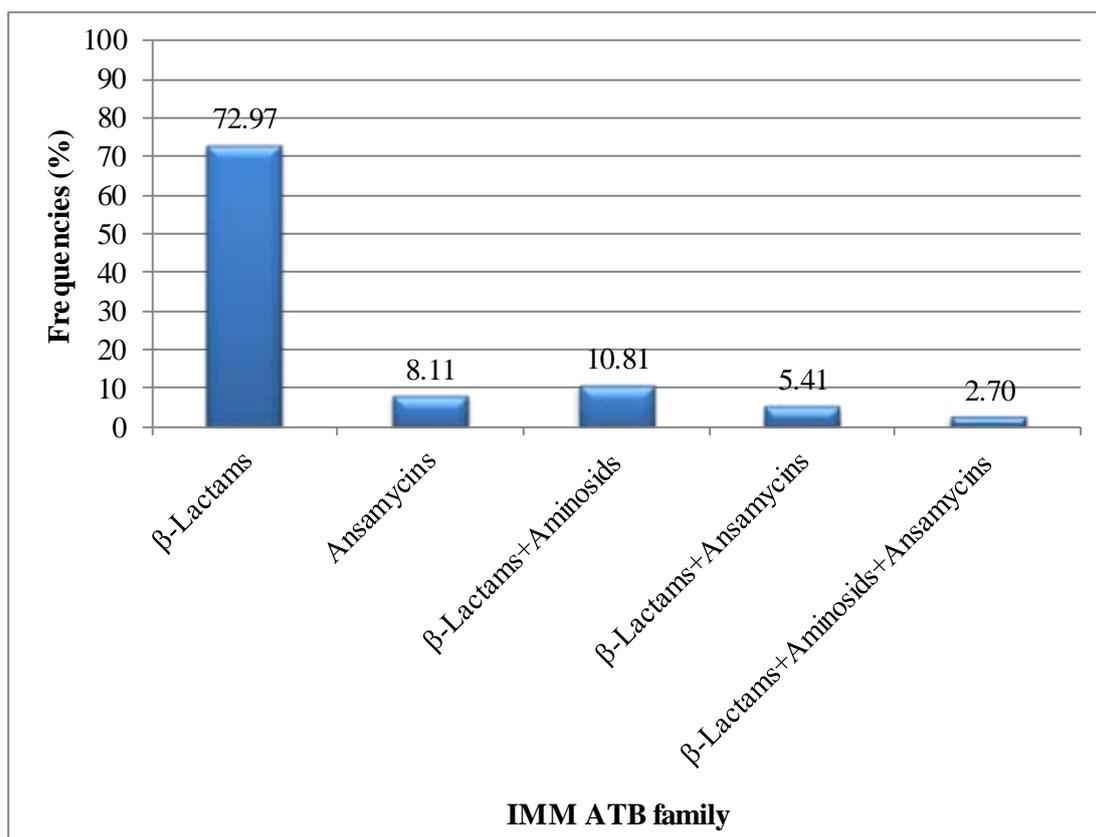


Figure 18. Familles d'antibiotiques intra-mammaires utilisées pour le tarissement des vaches tarées.

3.4. Fréquence des molécules et familles d'antibiotiques utilisées comme un traitement par la voie parentérale chez la vache tarie

Concernant les molécules administrées par voie parentérale, la tylosine est la plus fréquemment utilisée seule (48,15 %) ou en association avec d'autres molécules comme la spiramycine et le pénéthamate, respectivement 11,11 % et 7,41 %. La spiramycine, classée deuxième, n'a été utilisée seule que par 7,41 % des vétérinaires enquêtés (Figure 19). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Brunton *et al.* (2012), la tylosine étant la plus fréquemment citée (27,4 %) par les répondants utilisant un antibiotique systémique, suivie par l'association dihydrostreptomycine, pénicilline procaïne (PEN-S) avec 20,7 %. A l'inverse, selon une enquête menée en France, la spiramycine est l'antibiotique systémique le plus utilisé pour le traitement de la mammite suivi de la tylosine (Gay *et al.*, 2002). Comme indiqué également dans cette enquête, l'utilisation de sulfadiazine-triméthoprime (SFD-T) (3,9 %), d'amoxicilline (2,7 %) et de céfalexine (0,7 %) a été trouvée par Brunton *et al.* (2012) plutôt limité.

Quel que soit le stade physiologique (Tarissement ou lactation) et la maladie ciblée par le traitement (mammites ou autre), l'enquête réalisée en Algérie auprès des praticiens de la région de M'sila, non incluse dans la présente enquête, a montré que l'oxytétracycline est l'antibiotique le plus utilisé (23,6%) pour traiter les vaches laitières pour différentes pathologies ou comme complément alimentaire suivi des sulfamides (15,5%), des pénicillines (13,8%) et de l'amoxicilline (8,0%) (Debeche *et al.*, 2018). En Afrique, une autre enquête sur les antibiotiques utilisés pour traiter différentes maladies chez les vaches laitières a montré que la pénicilline-streptomycine et l'oxytétracycline ont été les molécules les plus utilisées pour traiter les mammites, sans préciser le stade physiologique, avec respectivement 42 % et 38 % de fréquence (Mansour *et al.*, 2020).

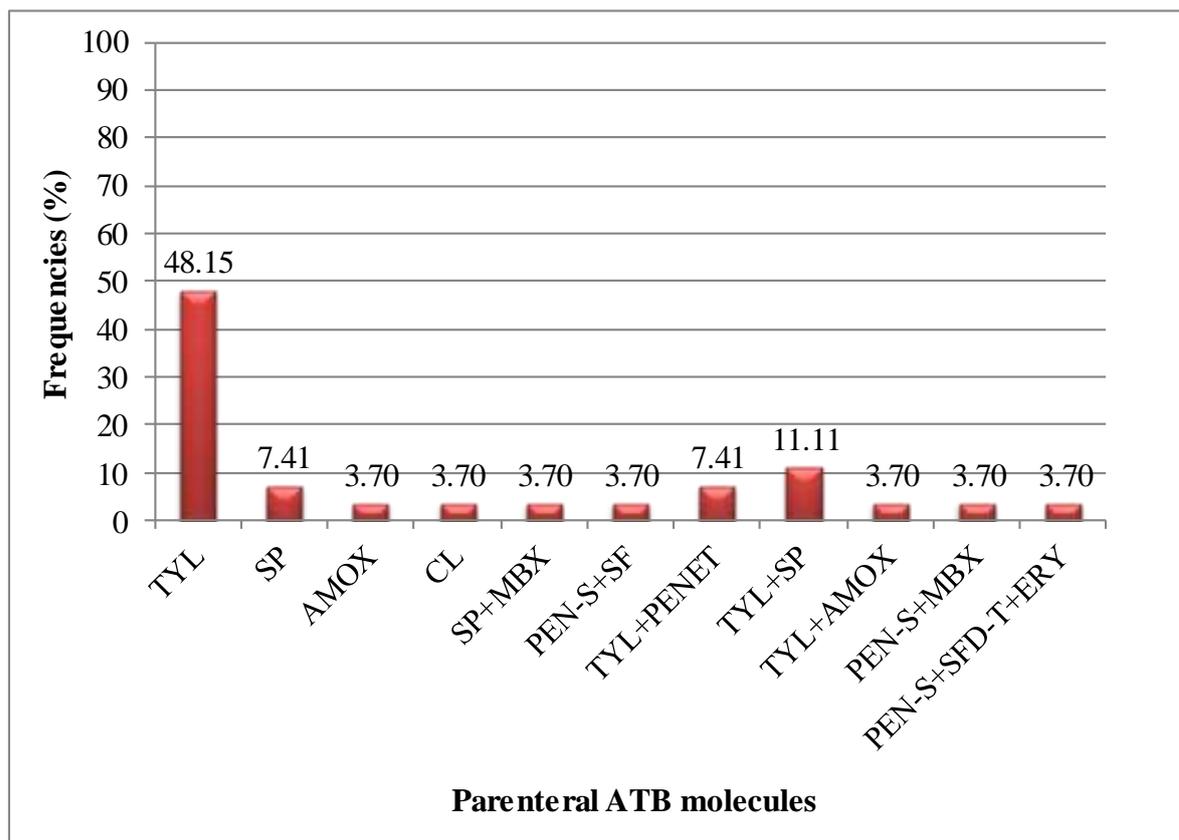


Figure 19. Molécules d'antibiotiques utilisées par voie parentérale pour le traitement des mammites des vaches tarées

AMOX : Amoxicilline ; CL: Colistine; ERY: Erythromycine; LEX: Céfalexine; PENET: Pénéthamate; PEN-S: Benzylpenicilline+Dihydrostreptomycine; SF : Sulfamides ; SFD-T : Sulfadimidine- Triméthoprime ; SP: Spiramycine; TYL: Tylosine

Pour les antibiotiques DCT administrés par voie parentérale, les macrolides sont la famille la plus fréquemment utilisée (66,67 %), tandis que l'association d'un macrolide avec une bêta-lactamine a été formulée par 11,11% des praticiens interrogés (Figure 20). L'association d'un antibiotique systémique, appartenant notamment à la famille des macrolides, avec un antibiotique DCT a été rapportée par Breen *et al.* (2011) comme une approche recommandée par les vétérinaires pour améliorer le taux de réussite du traitement d'une IIM existante.

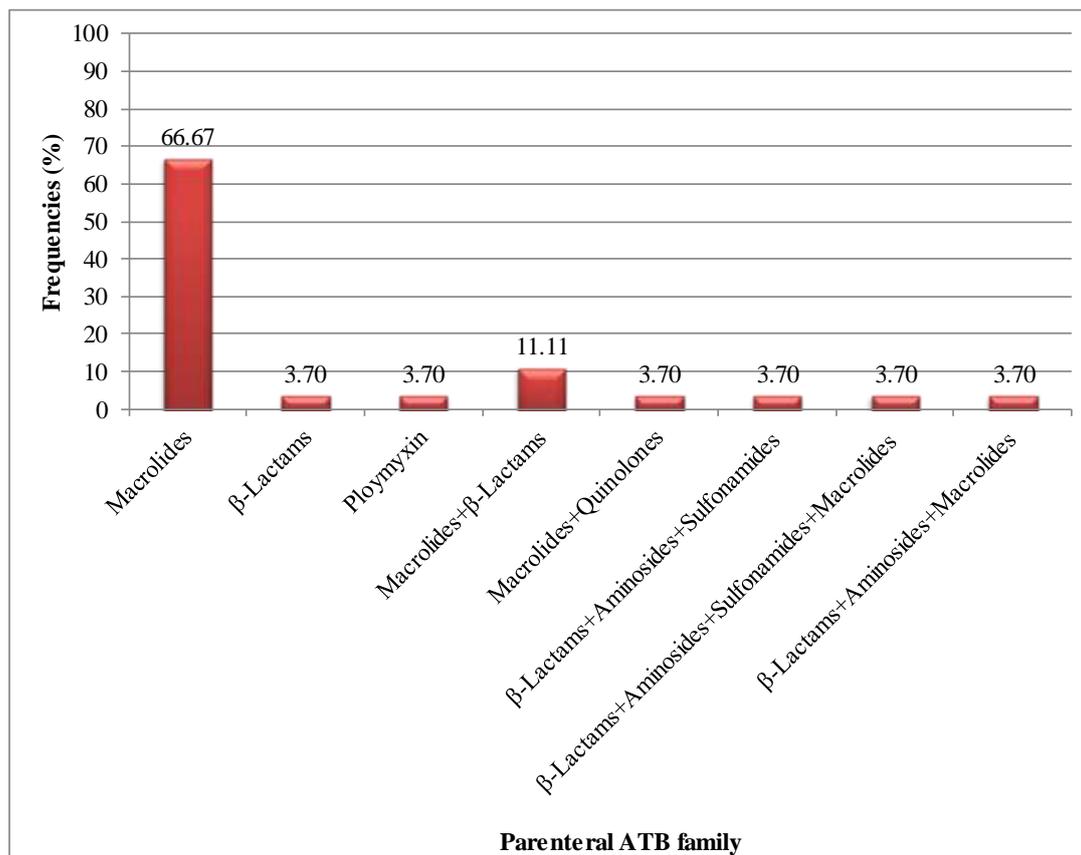


Figure 20. Familles des antibiotiques parentéraux utilisées pour le traitement des mammites au tarissement

3.5. Pratiques de traitement des mammites

Les résultats montrent que le nettoyage et le séchage des trayons avant la perfusion d'antibiotiques sont suivis par la majorité des praticiens (94,59%). Cependant, seuls 29,41 % des vétérinaires veillent à ce que la canule tubulaire soit partiellement insérée pendant le traitement, tandis que l'application d'un bain de trayon après l'utilisation de la perfusion et/ou d'obturateur n'a pas été une pratique régulière (18,92 %). Ces résultats sont très différents de ceux enregistrés par McDougall (2003) auprès de 158 propriétaires de troupeaux laitiers de la région de Waikato (Nouvelle-Zélande), qui ont constaté que les deux tiers (65,8 %) d'entre eux pratiquent une insertion partielle de la canule de la seringue lors du traitement au tarissement (DCT). De plus, cet auteur a noté que seulement 15,2% des éleveurs n'effectuent aucune préparation des trayons avant l'infusion du traitement DCT, tandis que la grande majorité (82,9%) utilise un spray de trayons après l'infusion. L'insertion profonde de la canule de la seringue dans le canal du trayon peut provoquer une érosion de la couche de kératine à l'intérieur et ainsi réduire l'efficacité des défenses

naturelles de la glande mammaire. Cette barrière naturelle est d'une importance vitale dans la prévention des infections. De plus, certains composés (acides gras, protéines) naturellement présents dans la couche de kératine servent à sauvegarder le canal du trayon (Gruet *et al.*, 2001).

Tableau 7. Caractéristiques du traitement au tarissement dans les troupeaux couverts par l'enquête dans le nord de l'Algérie.

Caractéristiques du traitement au tarissement (DCT)	Choix des questions	Fréquence (n)	Estimation (%)	Intervalle de Confiance à 95%	
				Inférieur	Supérieur
Politique du traitement au tarissement		37			
	Traitement sélectif	32	86,49	71,23	95,46
	Traitement systématique	5	13,51	4,54	28,77
Début du traitement		32			
	Au premier jour du tarissement	8	25,00	11,46	43,40
	Durant la première semaine du tarissement	20	62,50	43,69	78,90
	Une semaine avant le tarissement	4	12,50	3,51	28,99
Modalités du traitement au tarissement		37			
	Infusion IMM + injection parentérale avec ou sans mammite clinique	5	13,51	4,54	28,77
	Infusion IMM + injection parentérale si mammite clinique	13	35,14	20,21	52,54
	Infusion IMM + injection parentérale avec ou sans mammite clinique avec signes généraux	12	32,43	18,01	49,79
	Infusion IMM seule	7	18,92	7,96	35,16
Nettoyage et séchage des trayons avant l'infusion IMM		37			
	Non	2	5,41	0,66	18,19
	Oui	35	94,59	81,81	99,34
Insertion partielle à l'infusion		34			
	Non	24	70,59	52,52	84,90
	Oui	10	29,41	15,10	47,48
Bain de trayons après l'infusion IMM et/ou utilisation d'obturateur		37			
	Non	30	81,08	64,84	92,04
	Oui	7	18,92	7,96	35,16

3.6. Efficacité du traitement au tarissement

L'efficacité du traitement des vaches taries (DCT) doit toujours être abordée selon une approche holistique et prendre en compte divers facteurs liés à la gestion du tarissement d'une part et à l'environnement des vaches taries, la présence de micro-organismes et le risque d'émergence de résistance bactérienne d'autre part (Petzer *et al.*, 2009). Elle est le plus souvent mesurée par les taux de guérison et d'incidence des nouvelles infections intra-mammaires (IIM) (Bradley *et al.*, 2010).

3.7. Apparition des mammites après le traitement

Les résultats de l'enquête montrent que les vaches en bonne santé recevant une infusion d'antibiotiques au tarissement présentent peu ou pas de cas de mammites pendant la période du tarissement et aux premiers jours du post-partum (respectivement 94,6 % et 91,9 %). Cependant, l'apparition fréquente de nouvelles IIM par la suite chez les vaches atteintes de mammites et qui avaient été taries avec une infusion d'antibiotiques a été évaluée par 13,5% des répondants (tableau 8)

Selon Blowey et Edmondson, (2010), lorsque plus d'une vache sur douze (8,33 %) au cours des quatre premières semaines de lactation ou si le nombre de cellules somatiques est élevé (au-dessus de 200 000 cellules) chez les génisses au moment du vêlage et du développement d'une mammite, il est recommandé de réaliser un test de dépistage, car ces résultats indiquent souvent une origine environnementale des infections en période sèche.

Dans une étude réalisée au Royaume-Uni portant sur quatre troupeaux laitiers, aucune mammite clinique n'a été observée au tarissement chez les vaches traitées au tarissement, alors que les vaches non traitées présentent un nombre important de cas de mammites cliniques au tarissement et au vêlage (Berry et Hillerton, 2002). Selon l'enquête menée par Godden *et al.* (2003), les vaches traitées le premier jour du tarissement avec un antimicrobien et un obturateur interne des trayons présentent une prévalence plus faible des nouvelles IIM après le vêlage par rapport à celles traitées avec des antibiotiques seuls.

3.8. Réalisation d'analyses bactériologiques

Les résultats de l'enquête montrent que les analyses bactériologiques après échec du traitement antibiotique ne sont réalisées systématiquement que par 5,56% des vétérinaires enquêtés alors que le reste ne les réalise que rarement (25%) ou jamais (58,33%). Selon les conclusions de l'enquête effectuée par Bertulat *et al.* (2015), une

majorité (64,9 %) des éleveurs ont révélé que les traitements antibiotiques entrepris lors du tarissement ont été réalisés sans examen bactériologique préalable.

Tableau 8. Efficacité du traitement au tarissement sur la survenue et la récurrence des mammites pendant les périodes du tarissement et du post-partum

Efficacité du traitement au tarissement	Choix des questions	Fréquence (n)	Estimation (%)	Intervalle de Confiance à 95%	
				Inférieur	Supérieur
Apparition de mammites au tarissement chez des vaches saines recevant une infusion IMM d'antibiotiques		37			
	Jamais	3	8,11	1,70	21,91
	Rarement	32	86,49	71,23	95,46
	Souvent	2	5,41	0,66	18,19
Apparition de mammites durant les premiers jours du post-partum chez des vaches saines recevant une infusion antibiotique IMM au tarissement		37			
	Jamais	6	16,22	6,19	32,01
	Rarement	28	75,68	58,80	88,23
	Souvent	3	8,11	1,70	21,91
Apparition de nouvelles IIM chez des vaches atteintes de mammites recevant une infusion antibiotique IMM au tarissement		37			
	Jamais	6	16,22	6,19	32,01
	Rarement	26	70,27	53,02	84,13
	Souvent	5	13,51	4,54	28,77
Réalisation des analyses bactériologiques en cas de récurrences		36			
	Jamais	21	58,33	40,76	74,49
	Rarement	9	25,00	12,12	42,20
	Souvent	4	11,11	3,11	26,06
	Toujours	2	5,56	0,68	18,66

3.9. Facteurs liés à la survenue et à la récurrence des mammites chez les vaches tarées infusées par des antibiotiques intra-mammaires (ATB IMM)

Afin de résumer et afficher graphiquement la relation entre toutes les variables, un diagramme en deux dimensions (Figure 21) a été créé à l'aide de l'analyse des correspondances multiples (ACM). Les réponses d'une même catégorie sont tracées les unes à côté des autres, mais celles des différentes catégories sont tracées aussi éloignées que possible.

Les deux axes retenus pour la présentation des données reflètent une inertie totale de 0,482 (48,25 %) de l'information contenue dans le jeu de données soumis à l'ACM, 25,67 % par dimension 1 et 22,58 % par dimension 2. L'alpha de Cronbach, 0,84 pour la dimension 1 et 0,81 pour la dimension 2 (tableau 9) dépassent la limite inférieure (0,70) des valeurs acceptables de l'alpha de Cronbach, allant de 0,70 à 0,95 (Tavakol et Dennick, 2011).

Pour représenter l'intensité avec laquelle la variable explique chacun des deux axes, des mesures de discrimination ont été établies et reprises dans le tableau 9.

Tableau 9. Contributions des variables aux mesures de discrimination

Mesures de discrimination		Dimension		Moyenne
		1	2	
Alpha de Cronbach		0,84	0,81	0,83
Efficacité du traitement au tarissement (DCT)	Occurrence du tarissement	0,09	0,43	0,26
	Occurrence du postpartum	0,21	0,59	0,40
	Nouvelles IIM	0,34	0,03	0,18
Gestion de la période sèche	Taille du troupeau	0,34	0,54	0,44
	Séparation	0,08	0,10	0,09
	Management	0,01	0,06	0,04
	Durée d'arrêt de la traite	0,32	0,25	0,29
	Ration Adaptée	0,13	0,16	0,14
	Note d'état corporel (NEC)	0,20	0,15	0,18
Approches du tarissement pour contrôler les mammites	Utilisation de la vaccination contre les mammites par les éleveurs	0,14	0,04	0,09
	Demande par les éleveurs d'ATB IMM du DCT	0,42	0,23	0,32
Pratique DCT	Type d'ATB IMM	0,69	0,80	0,74
	Type d'ATB parentéral	0,73	0,29	0,51
	Politique du DCT	0,39	0,07	0,23
	Commencement du DCT	0,30	0,21	0,25
	Modalités du DCT	0,39	0,20	0,30
	Nettoyage des trayons avant l'infusion IMM	0,01	0,11	0,06
	Insertion partielle	0,02	0,03	0,03
	Bain de trayons après infusion IMM	0,07	0,00	0,03
Total Active		4,88	4,29	4,58

Il n'y avait pas de fortes valeurs différenciatrices attribuées à chacune des dimensions obtenues (tableau 9 et figure 21); toutes les mesures de discrimination ont été inférieures à 0,6 à

l'exception de la valeur maximale de 0,69 pour la première dimension et de 0,80 pour la deuxième dimension présentée à la fois par le type d'ATB IMM et celles du type d'ATB parentéral (0,73) pour la première dimension. Hiérarchiquement, pour la dimension 1, le type d'ATB parentéral, la demande par les éleveurs d'ATB IMM pour le traitement au tarissement, la politique du traitement DCT, la modalité du traitement DCT et la nouvelle infection IM ont été les variables les plus discriminantes. Ces variables ont de grandes mesures de discrimination sur la première dimension à l'inverse de la seconde.

On peut noter que les variables décrivant les pratiques du traitement DCT, à savoir le type d'ATB parentéral, la demande par les éleveurs d'ATB IMM pour le traitement au tarissement, la politique du traitement DCT et la modalité du traitement DCT ont été discriminantes pour la survenue de nouveaux cas de mammites chez les vaches atteintes et qui ont été traitées avec une infusion intra-mammaire d'ATB (Nouvelle IIM).

La dimension 2 été principalement influencée par le type d'ATB IMM (0,80), l'occurrence du post-partum (0,59), la taille du troupeau (0,54) et l'occurrence du tarissement (0,43). L'occurrence du post-partum, la taille du troupeau et l'occurrence du tarissement ont une grande valeur sur la deuxième dimension mais une petite valeur sur la première. Cependant, le type d'ATB IMM a également une grande valeur sur la première dimension (0,69).

Les autres variables telles que la gestion du tarissement, l'insertion partielle, l'immersion des trayons après l'infusion intra-mammaire, sont situées très près de l'origine, et ne discriminant pas du tout dans les deux premières dimensions.

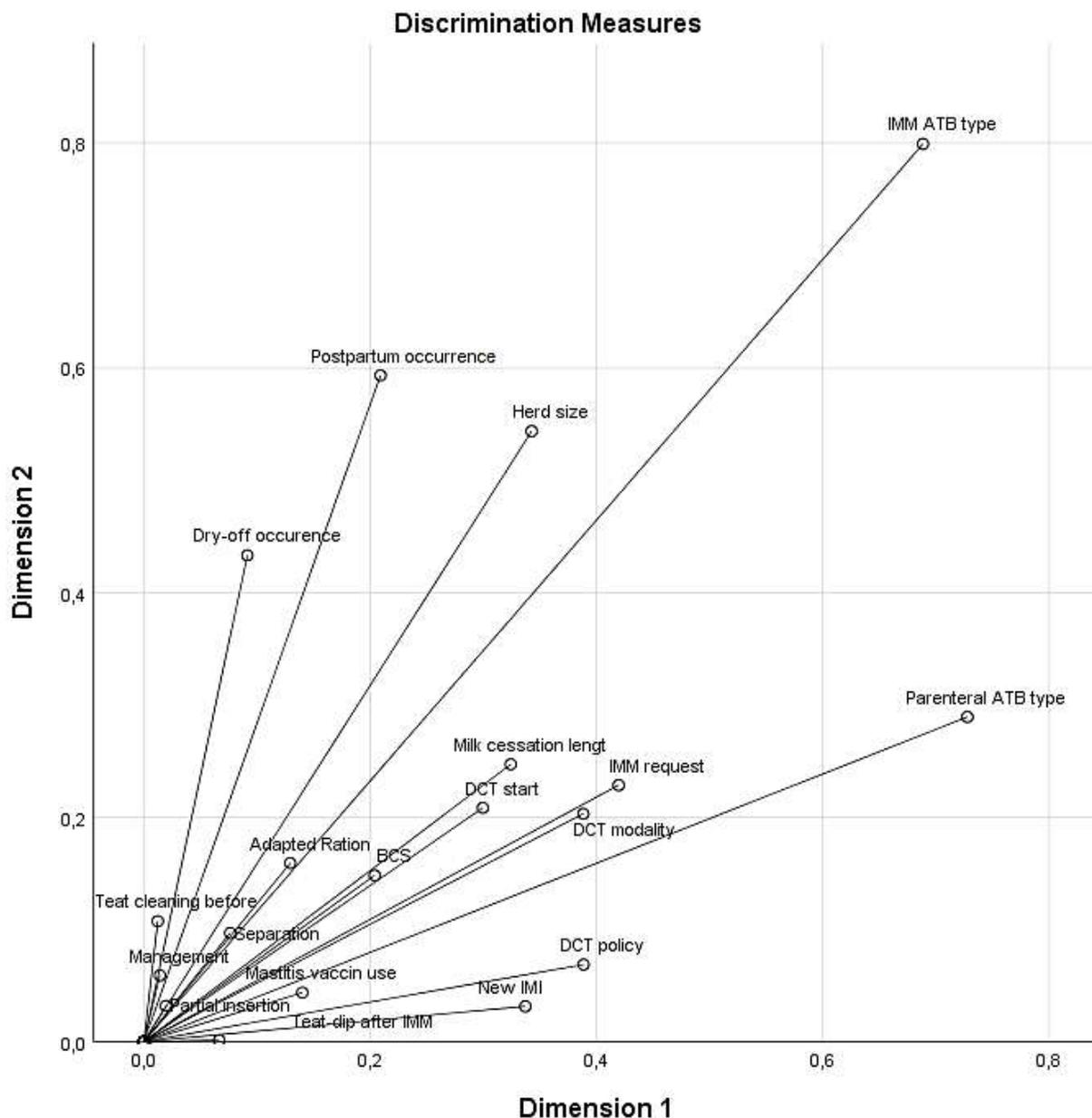


Figure 21. Graphique des mesures de discrimination à l'aide de l'analyse des correspondances multiples (ACM).

DCT: dry cow therapy; Dry-off occurrence: Occurrence des mammites au tarissement chez des vaches saines recevant une infusion IMM d'antibiotiques; Postpartum occurrence: Occurrence des mammites durant les premiers jours du post-partumchez des vaches saines recevant une infusion IMM d'antibiotiques au tarissement; New IMI: Occurrence des nouvelles IIM chez des vaches atteintes de mammites recevant une infusion IMM d'antibiotiques au tarissement.

D'après le tracé conjoint des points de catégorie (figure 22), il apparaît que pour la variable Nouvelles IIM, les catégories (Jamais et Souvent) font partie intégrante. Pour la politique du traitement au tarissement (DCT), la catégorie traitement systématique est très éloignée de la catégorie traitement sélectif et donne une grande mesure de discrimination négative le long de la première dimension. Ces deux variables discriminent mieux la première

dimension que les variables type d'ATB parentéral, modalité du traitement au tarissement (DCT) et la demande d'antibiotique IMM avec des catégories proches les unes des autres. Les variables occurrence du tarissement et occurrence du post-partum avec des catégories (jamais et souvent) éloignées discriminent mieux la dimension 2 que la taille variable du troupeau avec des catégories approximatives.

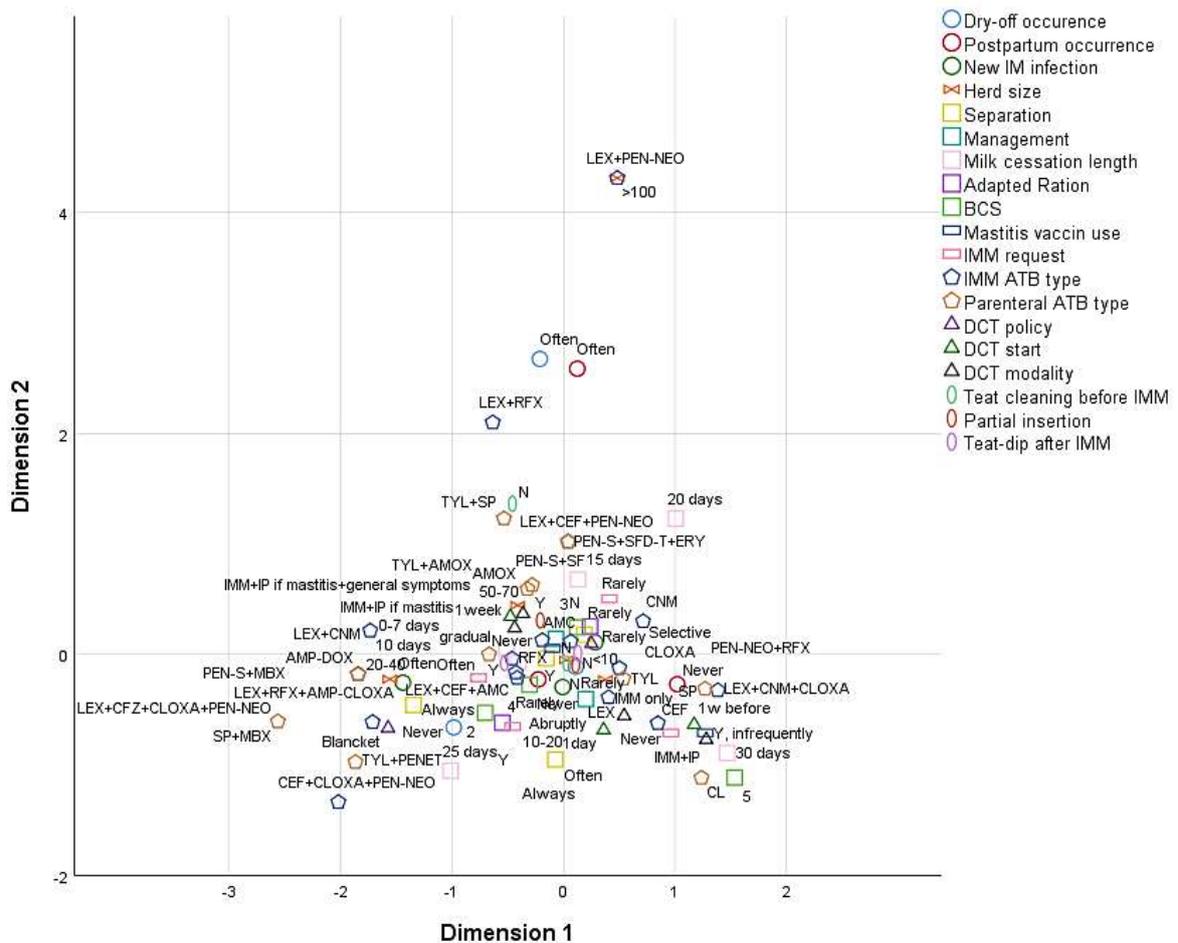


Figure 22. Contribution des modalités de questions dans les mesures de discrimination à l'aide d'une solution d'Analyse des Correspondances Multiples bidimensionnelle.

L'utilisation de l'ACH (tableau 10, figure 23) pour classer hiérarchiquement les réponses en clusters impliquant la correspondance entre les catégories des variables a révélé une divergence notable entre les deux clusters 1 et 2, qui regroupent différentes pratiques dont la politique du traitement au tarissement (DCT), systématique (66,67 % du cluster 1) et sélectif (100% du cluster 2). Ces pratiques sont associées à deux statuts d'efficacité divergents de l'infusion intra-mammaire d'ATB aux vaches atteintes de mammites

(observation rare de récurrences dans 81,82% des cas par les vétérinaires regroupés dans le cluster 2 par rapport à l'observation fréquente de récurrences par les 50% du cluster 1).

Le traitement sélectif s'est avéré augmenter le risque de développement des infections intra-mammaires (IIM) par rapport au traitement général (RR = 1,34, IC à 95 % = 1,13, 1,16), s'il n'est pas associé à l'utilisation d'obturateurs internes de trayons (Winder *et al.*, 2019). De même, une autre étude récente a montré qu'en l'absence d'association avec un obturateur interne des trayons, le traitement sélectif a été plus associé que le traitement général ou systématique au risque de développement de nouvelles IIM pendant la période sèche et leurs persistance jusqu'au vêlage (Kabera *et al.*, 2021). La méta-régression réalisée par ces auteurs a révélé que le risque de développer une IIM au tarissement et au vêlage, et le risque de développer une mammite clinique en début de lactation, ainsi que le niveau de production du lait et de numération des cellules somatiques en début de lactation n'ont pas de différence entre le traitement sélectif et le traitement systématique tant qu'un obturateur interne de trayon (65 % de sous-nitrate de bismuth) a été administré aux quartiers sains non traités au tarissement. Halasa *et al.* (2009) ont rapporté que la thérapie sélective, par rapport à la thérapie générale, offre une protection moindre contre les nouvelles IIM, mais meilleure que celle observée chez les vaches ne recevant pas de traitement au tarissement (DCT). De plus, l'utilisation de produits obturateurs internes pour les trayons peut améliorer la protection contre les nouvelles IIM pendant le tarissement. Alors que le traitement sélectif à l'avantage de réduire l'utilisation d'antibiotiques pendant la période sèche (Kabera *et al.*, 2021), ainsi, il a été rapporté qu'un traitement généralisé avait pour résultat une guérison de 75 % des infections existantes et une réduction de 50 % des nouveaux cas d'infection au cours de la période sèche (Roussel *et al.*, 2010).

Dans le cluster 1, 66,7 % des vétérinaires ont signalé une automédication fréquente (demande d'antibiotiques IMM) par les éleveurs (tableau 10). La relation entre cette attitude des éleveurs et l'incidence des mammites a été rapportée par Kayitsinga *et al.* (2017) dans l'est des États-Unis. Ces auteurs ont découvert que l'utilisation accrue de l'administration intra-mammaire (AIM) de médicaments antimicrobiens par les éleveurs au tarissement et la croyance que la "malchance" joue un rôle dans les problèmes de mammite ont été associées à une amélioration de la fréquence de l'AIM pour le traitement de la mammite clinique. De plus, Jansen *et al.* (2009) ont suggéré que l'incidence des mammites et la variation de la qualité du lait (numération des cellules somatiques) dans les fermes laitières néerlandaises ont été liées aux attitudes des éleveurs.

Cependant, l'ACH n'a pas confirmé une forte relation entre l'incidence des nouvelles infections IM et la mammite pendant la période sèche et le début de la lactation avec les autres variables mises en évidence par l'ACM telles que la modalité du traitement DCT, les molécules d'antibiotiques utilisées comme traitement IMM, le traitement systématique et la taille du troupeau (Tableau 10, Figure 23). Chez les vaches laitières Holstein allemandes recevant un traitement pour vaches tarées, le type d'antibiotique et l'état des tissus du pis été associés aux taux de guérison bactériologique, tandis que l'âge et l'état de santé du pis semblent être les principaux déterminants des nouvelles infections IM et de la mammite clinique pendant la période sèche et au début de lactation (Gundelach *et al.*, 2011).

Dans cette section, l'analyse des facteurs influençant l'efficacité de l'antibiothérapie au tarissement (DCT) s'est limitée aux données acquises auprès des vétérinaires intervenants et mérite d'être étendue à plus d'exploitations et d'éleveurs faisant preuve d'automédication pour fournir des conclusions réelles sur d'éventuelles facteurs de risque d'inefficacité de cette pratique (DCT).

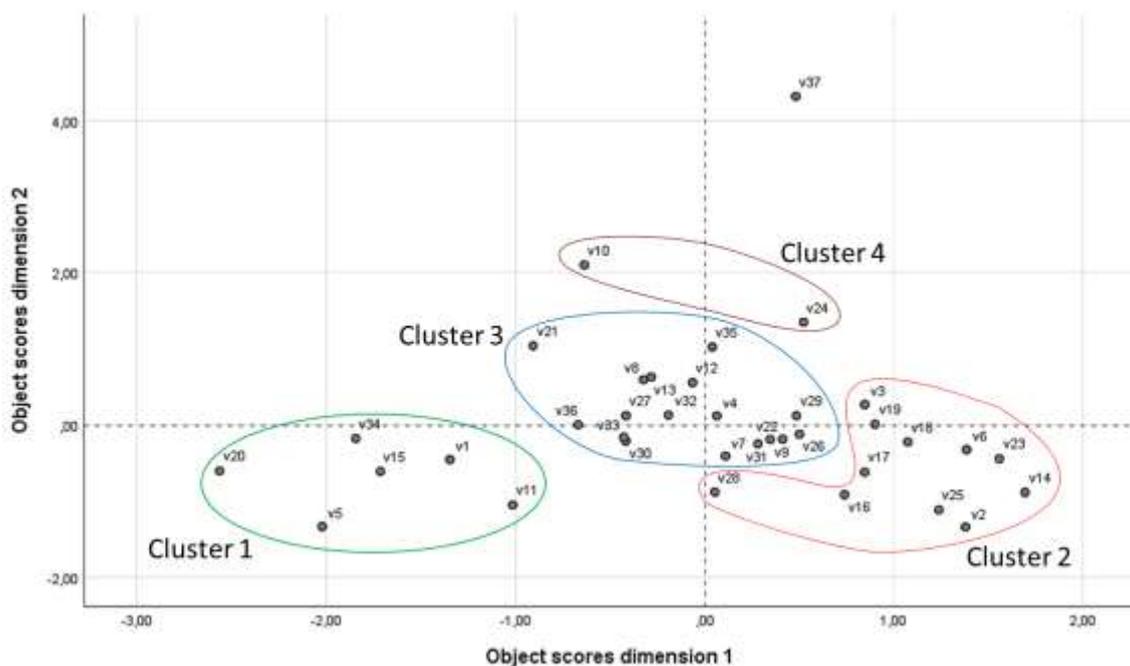


Figure 23. Scores des groupes d'objets étiquetés par les répondants à l'aide de la méthode ACH

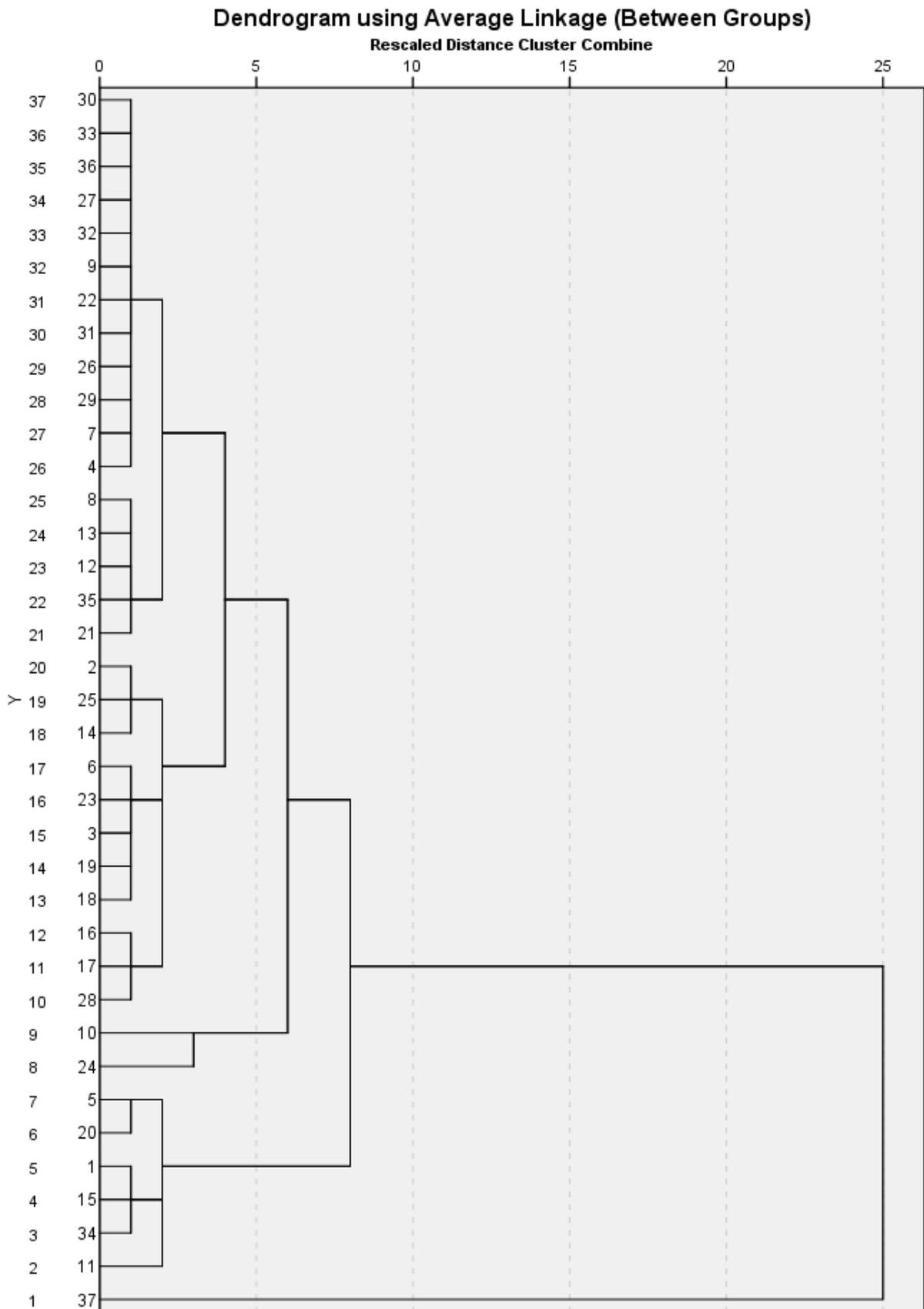


Figure 24. Dendrogramme de classement utilisant le lien moyen entre groupes des répondants.

Tableau 10. Comparaison des catégories de variables pertinentes au sein des clusters dans les deux dimensions

DIMENSIONS	Variables	Catégories	Fréquences au sein des clusters (%)				Total (%)
			Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	
DIMENSION 1	Nouvelles IMM	Jamais	16,67	18,18	17,65	0,00	16,67
		Rarement	33,33	81,82	70,59	100	69,44
		Souvent	50,00	0,00	11,76	0,00	13,89
	Type d'ATB Parentéral	TYL	0,00	66,67	50,00	50,00	48,15
		SP+MBX	25,00	0,00	0,00	0,00	3,70
		TYL+PENET	50,00	0,00	0,00	0,00	7,41
		TYL+SP	0,00	0,00	16,67	50,00	11,11
		PEN-S+MBX	25,00	0,00	0,00	0,00	3,70
	Modalité DCT	IMM+IP	0,00	45,45	0,00	0,00	13,89
		IMM+IP si mammites	50,00	0,00	52,94	0,00	33,33
		IMM+IP si Mammites+ symptômes généraux	33,33	9,09	41,18	100	33,33
		IMM seule	16,67	45,45	5,88	0,00	19,44
	Demande IMM	Souvent	66,67	9,09	47,06	0,00	36,11
		Toujours	33,33	9,09	0,00	0,00	8,33
	Politique DCT	Sélectif	33,33	100	94,12	100	86,11
		Systématique	66,67	0,00	5,88	0,00	13,89
DIMENSION 2	Occurrence du tarissement	Jamais	33,33	0,00	5,88	0,00	8,33
		Rarement	66,67	100	88,24	100	88,89
		Souvent	0,00	0,00	5,88	0,00	2,78
	Occurrence post-partum	Jamais	0,00	36,36	11,76	0,00	16,67
		Rarement	100	63,64	88,24	0,00	77,78
		Souvent	0,00	0,00	0,00	100	5,56
	Taille du troupeau	<10	16,67	63,64	52,94	0,00	47,22
		10-20	16,67	36,36	47,06	0,00	36,11
		20-40	50,00	0,00	0,00	50,00	11,11
		50-70	16,67	0,00	0,00	50,00	5,56
	Type d'ATB IMM	LEX	16,67	63,64	41,18	0,00	41,67
		CEF	0,00	9,09	0,00	0,00	2,78
		CLOXA	0,00	0,00	5,88	0,00	2,78
		RFX	16,67	0,00	11,76	0,00	8,33
		CNM	0,00	18,18	5,88	50,00	11,11
		AMC	0,00	0,00	5,88	0,00	2,78
AMP-DOX		16,67	0,00	0,00	0,00	2,78	

3.10. Alternatives aux antibiotiques pour le traitement des vaches tarées

3.10.1. Utilisation des obturateurs des trayons

Une grande majorité des vétérinaires enquêtés (71,43 %) ont déclaré qu'ils n'utilisaient pas de scellant pour trayons dans leur pratique, alors que seulement 22,86 % l'utilisent en complément d'une antibiothérapie. Le constat d'une utilisation limitée de cette mesure préventive dans notre enquête est corroboré par les résultats de Bertulat *et al.* (2015), car seuls 33,3% des éleveurs ont répondu qu'ils avaient déjà utilisé des scellants internes pour trayons pendant le tarissement. Cependant, les résultats sont en contraste avec ceux obtenus par Fujiwara *et al.* (2018), car 84,9 % des fermes étudiées utilisent des produits obturateurs pour trayons pendant le tarissement, avec une utilisation prédominante de produits obturateurs internes seuls, par 86,3 % de ces fermes.

Une récente étude brésilienne réalisée par Freu *et al.* (2020), a révélé que la combinaison d'un scellant interne pour trayons avec un antibiotique pour les vaches tarées a prouvé son efficacité pour prévenir les nouvelles IIM pendant la période sèche et ainsi réduire le risque de survenue de mammites cliniques jusqu'à 60 jours du post-partum. De plus, selon l'essai réalisé par (Newton *et al.*, 2008), l'incidence des nouvelles IIM été plus faible avec des tests bactériologiques plus favorables pour les quartiers traités à la cloxacilline en association avec un scellant interne pour trayons que ceux traités à la cloxacilline seule. Ces résultats sont cohérents avec les travaux antérieurs menés par Cook *et al.* (2004) dans des troupeaux commerciaux du Wisconsin. Ces auteurs ont également rapporté que la proportion de mammite clinique jusqu'au 100 jour du post-partum été plus faible dans le groupe traité par antibiotique pour les vaches tarées en association avec un scellant pour trayons (24,4 %) que dans le groupe ayant reçu une infusion intra-mammaire seule (29,9 %).

3.10.2. Utilisation des plantes et des huiles essentielles dans le traitement des mammites

Concernant la substitution des antibiotiques par un autre moyen de lutte contre les mammites, les résultats ont montré que 77,78 % des vétérinaires enquêtés ont été d'accord avec l'idée de remplacer ces médicaments par une voie alternative (Tableau 11). En effet, selon une enquête menée en Angleterre, la réduction de l'utilisation des antimicrobiens, ainsi que le choix de la molécule à adopter pour une meilleure performance

de gestion de l'élevage été la deuxième réponse la plus formulée par les éleveurs (Higham *et al.*, 2018).

De plus, la plupart des participants (89,19 %) ont été en faveur de l'utilisation des huiles essentielles (aromathérapie) pour traiter les mammites, où 35,14 % remplaçant totalement les antibiotiques par les HE et 54,05 % complétant l'antibiothérapie par les HE. Ces résultats indiquent une ouverture croissante à l'utilisation des plantes médicinales dans la prévention et le traitement des mammites, en raison des résultats prometteurs obtenus et des avantages conférés par l'absence d'effets secondaires (Mullen *et al.*, 2014; Hamlaoui *et al.*, 2021; Sharun *et al.*, 2021). Néanmoins, ce questionnaire a mis en évidence une méconnaissance flagrante des produits à base d'huiles essentielles commercialisés en Algérie, puisque seulement 29,73 % des vétérinaires enquêtés connaissent ces produits. De plus, selon les observations des vétérinaires, l'utilisation des plantes pour traiter les mammites n'a été fréquemment employée que par 5,71 % des éleveurs (tableau 11). Dans une observation similaire de Higham *et al.* (2018), sur 135 répondants à l'enquête, seulement 3% ont fait référence aux remèdes naturels comme alternatives aux traitements pour réduire ou remplacer l'utilisation des antibiotiques. Plusieurs études ont néanmoins démontré l'intérêt et l'efficacité des huiles essentielles dans le traitement des mammites chez les vaches laitières. Fratini *et al.* (2014) ont rapporté l'efficacité de dix huiles essentielles commerciales sur six souches bactériennes provoquant la mammité chez les vaches laitières. De leur côté, Neculai-Valeanu *et al.* (2021), ont noté que les huiles essentielles peuvent être utilisées dans le traitement des mammites en association avec d'autres produits en raison de leur capacité à traverser la barrière cutanée et ainsi prouver leur efficacité dans le domaine du traitement de la mammité.

En conclusion, l'application de la médecine complémentaire dans ce domaine n'est pas répandue en raison des connaissances limitées et de l'indisponibilité des préparations réglementées.

Tableau 11. Opportunité d'appliquer une alternative aux antibiotiques dans les troupeaux du nord algérien

Alternatives aux antibiotiques pour le traitement au tarissement	Variantes	Fréquence (n)	Estimation (%)	Intervalle de Confiance à 95%	
				Inférieur	Supérieur
Utilisation d'un scellant pour trayons		35			
	Non	25	71,43	53,70	85,36
	Oui, parfois pour complimenter le traitement aux antibiotiques	8	22,86	10,42	40,14
	Oui, pour remplacer les antibiotiques	1	2,86	0,07	14,92
	Oui, systématiquement comme compliment aux antibiotiques	1	2,86	0,07	14,92
Acceptation d'alternatives pour remplacer les antibiotiques pour contrôler les mammites		36			
	Non	8	22,22	10,12	39,15
	Oui	28	77,78	60,85	89,88
Utilisation de la phytothérapie par les éleveurs pour contrôler les mammites					
	Pas du tout fréquemment	18	51,43	33,99	68,62
	Plutôt fréquemment	4	11,43	3,20	26,74
	Plutôt rarement	11	31,43	16,85	49,29
	Assez fréquemment	2	5,71	0,70	19,16
Connaissance de produits contenant des HE pour contrôler les mammites commercialisés en in Algérie		37			
	Non	26	70,27	53,02	84,13
	Oui	11	29,73	15,87	46,98
Acceptation de l'utilisation de l'aromathérapie pour le contrôle des mammites		37			
	Non	4	10,81	3,03	25,42
	Oui, comme compliment aux antibiotiques	20	54,05	36,92	70,51
	Oui, pour remplacer les antibiotiques	13	35,14	20,21	52,54

4. Conclusion

Cette enquête a permis d'identifier des lacunes dans la gestion du tarissement des vaches laitières dans les exploitations du Nord algérien couvertes par les vétérinaires interrogés. Il s'agit surtout du non-respect des pratiques zootechniques conseillées pendant la période sèche, qui peut être un facteur de risque d'un mauvais état sanitaire de la mamelle et de la non-efficacité de l'antibiothérapie au tarissement (DCT). Il est donc essentiel d'améliorer le bien-être des vaches taries en formulant une ration alimentaire

adaptée aux différents stades physiologiques et la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène à l'échelle de l'élevage, notamment autour de l'infusion intra-mammaire antimicrobienne. Les résultats soulignent également l'urgence de limiter l'utilisation anarchique et sélective de certaines molécules antibiotiques, principalement les β -lactamines, particulièrement exacerbée par l'attitude des éleveurs comme l'automédication. Cette enquête offre des perspectives intéressantes sur la possibilité d'utiliser la phytothérapie et l'aromathérapie comme approche complémentaire ou palliative pour contrôler la mammite et réduire l'utilisation d'antibiotiques. Enfin, l'utilisation de produits de scellement des trayons en combinaison avec les antibiotiques pour les vaches tarées ainsi que la mise en œuvre d'autres agents antimicrobiens alternatifs devraient être davantage encouragées en tant qu'approches efficaces pour améliorer la santé du pis.

CHAPITRE II : Efficacité *in vitro* des huiles essentielles de lamiacées (*Thymus*, *Mentha* et *Origanum*) sur des souches cliniques de staphylocoques isolées de lait cru mammitieux de vaches laitières

1. Introduction

En filière bovin laitier algérienne, l'usage abusif et systématique des antibiotiques a été considéré comme l'une des causes de la remarquable présence de leur résidus dans le lait, et plus particulièrement des β -lactamines et des tétracyclines (Meklati *et al.*, 2022). Ces molécules sont réputées pour être responsable du fléau mondial de l'antibiorésistance menaçant à la fois l'être humain et l'animal (Oliver *et al.*, 2020). Face à ce problème, des stratégies thérapeutiques alternatives contre les mammites basées sur l'usage des huiles essentielles (HE) de certaines plantes aromatiques au cours de la période de lactation ont été rapportées par la littérature (Lefevre *et al.*, 2009; Abboud *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2015). Leur utilisation au tarissement n'a jamais été abordée en Algérie (Hamlaoui *et al.*, 2021), toutefois, quelque travaux ont été répertoriés à une échelle mondiale (Mullen *et al.*, 2014). D'ailleurs, les études sur des alternatives aux antibiotiques qui s'inscrivent dans un cadre d'évaluation d'une meilleure stratégie de traitement des vaches tarées sont limitées presque exclusivement à l'usage d'obturateurs, notamment internes (Winder *et al.* 2019). Il semble logique alors qu'avant de penser à évaluer l'effet *in vivo* des huiles essentielles, de tester leur efficacité *in vitro* sur les bactéries majeurs les plus fréquemment impliquées dans l'apparition des mammites au tarissement à savoir les staphylocoques et les streptocoques (Sztachañska *et al.*, 2016). Les données disponibles provenant de travaux réalisés dans la région Est du pays (Zaatout *et al.*, 2020) ou à travers le monde (Khan et Khan, 2006) ont montré que les staphylocoques sont les principaux pathogènes responsables de mammites bovines. Ceci a été bien noté dans les élevages laitiers finlandais où les staphylocoques à coagulase-négative (SCN) (43%) et *Staphylococcus aureus* (21%), étaient les plus fréquemment rencontrés dans les échantillons du lait de vaches mammitieuses (Vakkamäki *et al.*, 2017). De même, en Afrique, les SCN étaient les plus isolées selon une étude récente réalisée au Kenya avec une prévalence de 42.8% contre 15,7 % pour *Staphylococcus aureus* (Mbindyo *et al.*, 2020). Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont actuellement représentées par les *Staphylococcus aureus* résistante à la méthycilline, ou à résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine selon la liste établie par l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) des agents pathogènes à priorité

élevée pour la recherche et développement de nouvelles molécules antibiotiques (World Health Organization, 2017). Dans le cadre de la recherche d'alternative aux antibiotiques dans le traitement des mammites bovines, Cheng et Han, (2020) dans leur récente revue de littérature n'ont rapporté que 8 études seulement traitant les effets des huiles essentielles de plantes sur les agents de mammites bovines ; parmi lesquelles quatre ont fait appel au thym et l'origan (Fratini *et al.*, 2014; Cho *et al.*, 2015; Fratini *et al.*, 2017; Piotr *et al.*, 2018). De plus, deux préparations à base de produits naturels avec présence des huiles essentielles d'origan, de lavande et de romarin dans leur composition ont été récemment testées *in vivo* (Paşca *et al.*, 2020).

Ce travail avait pour objectif d'étudier comparativement l'effet *in vitro* des huiles essentielles de trois genres de lamiacées (*Origanum*, *Thymus* et *Mentha*) qui poussent spontanément dans la région du nord-est algérien sur des souches de staphylocoques isolées du lait cru de vaches mammitieuses.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel Végétal

Les parties aériennes des lamiacées utilisées (*Thymus munbyanus* Boiss. & Reut., *Origanum vulgare subsp. glandulosum* (Desf.) Ietsw. et *Mentha pulegium*) dans notre étude (figure 25) ont été récoltées en période de floraison au niveau de la zone montagnaise de la commune de Hamma Bouziane (Wilaya de Constantine). Des parties aériennes d'*Origanum floribundum* ayant été récoltées préalablement à la période de floraison au niveau de la région de Djebel HOUARA (Guelma) situé dans le Nord-est algérien (figure 26) et mises à la disposition de notre laboratoire par Dr. Ksouri Samir.

L'ensemble des échantillons de lamiacées ont été séchés et conservés dans des sacs en papier à l'abri de la lumière et maintenus à température ambiante.

Par ailleurs, la collecte et l'extraction de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* provenant de la région de Sétif (Amoucha) ont été assurées par une entreprise privée agréée spécialisée dans la production des huiles essentielles des plantes. L'identification botanique des échantillons a été assurée par deux spécialistes, professeur Boutabia Lamia de l'université d'El Tarf et Dr Lekehal Samia de l'université d'Annaba.



Figure 25. Plantes de Thym (1), de Menthe (2) et d'Origan de (3 et 4) récoltées au niveau de la région de Constantine (Originale, 2021).

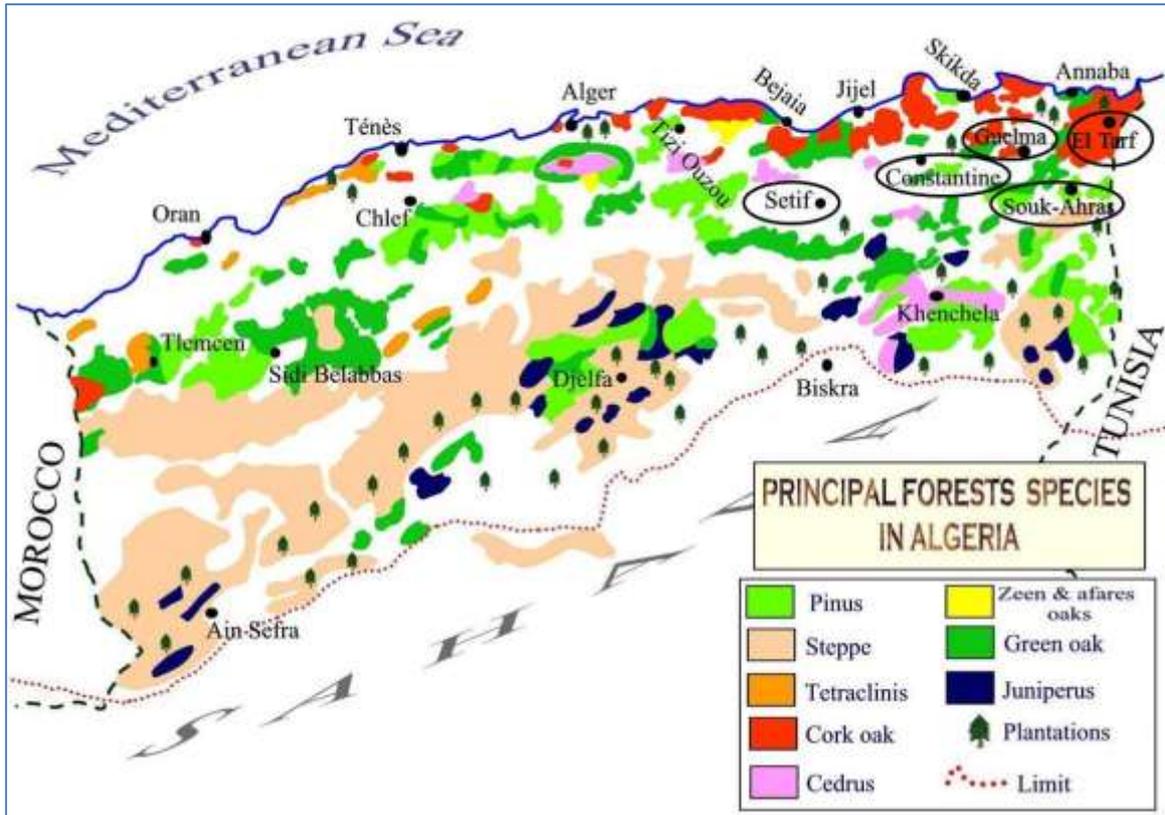


Figure 26. Localisation des régions (encerclées en noir) d'échantillonnage du lait (Constantine, El Tarf, et Souk-Ahras) et de collecte d'*Origanum vulgare* (Constantine et Sétif), d'*Origanum floribundum* (Guelma), de *Thymus munbyanus* (Constantine), de *Mentha pulegium* (Constantine et El Tarf) dans les groupes de végétation forestière de l'Algérie (FAO, 2012).

2.2. Matériel Biologique

Les souches de staphylocoques visées qui feront l'objet de notre étude sont des germes à caractères zoonotiques souvent impliqués dans les cas de toxi-infections alimentaires chez l'être humaine. Également, elles sont responsables de mammites sub-cliniques et récidivantes chez les bovins (Anses, 2017). Leur passage de l'animal à l'homme susceptible d'être provoqué par l'ingestion d'un lait cru de vache commercialisé pouvant être contaminé.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites de lamiacées a été effectuée sur des souches cliniques et des souches de référence.

2.2.1. Souches de référence

Les souches de *S. aureus* ATCC 25913 et ATCC 25923 sont sensible à la méthicilline ou methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), alors que la souche ATCC 700699 (Mu 50) est une résistante à la méthicilline (MRSA).

La souche ATCC 25913 a été fournie par le laboratoire de recherche « *Développement et contrôle des préparations pharmaceutiques hospitalières* » (Faculté de Médecine de l'université Badji Mokhtar- Annaba).

La souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et la souche ATCC 700699 (Mu 50) ont été fournies par le Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) de Bou-Ismaïl (Tipaza).

2.2.2. Souches cliniques (isolées du lait cru)

Les prélèvements à l'origine des souches cliniques ont été collectés à l'issue d'un suivi qui s'est déroulé sur une période allant de Janvier à Mai 2018 sur 90 vaches provenant de trois fermes sises dans trois régions de l'est algérien à savoir Souk-Ahras, El-Tarf et Constantine.

Le lait a été échantillonné seulement à partir des vaches ayant présentées des mammites récidivantes. Ces animaux ont été préalablement identifiés après consultation du recueil du suivi vétérinaire clinique pratiqué pendant la période d'étude. Durant ce suivi, en plus du commémoratif et l'examen clinique, le test CMT (California Mastitis Test) a été utilisé pour le dépistage des mammites, notamment dans la région de Souk-Ahras.

Au total, 24 prélèvements ont été réalisés selon les critères préétablis et sont répartis sur les trois régions comme suit : 10 prélèvements des fermes de Souk-Ahras, 10 prélèvements de la ferme de Constantine et 4 prélèvements de la ferme de Ben M'hidi. Sur l'ensemble de ces prélèvements, 18 souches de Staphylocoques ont été isolées.

2.2.3. Identification et caractérisation des souches cliniques isolées

2.2.3.1. Prélèvement du lait et préparation des échantillons

Les prélèvements des échantillons de lait ont été réalisés dans des conditions d'asepsie en évitant au maximum sa contamination. La méthode utilisée pour le prélèvement est celle décrite dans la littérature (Allain, 2011; Noireterre, 2006), avec le port de gants, le nettoyage et l'assèchement de la mamelle, la désinfection du bout du

trayon avec un coton imbibé d'alcool chirurgical à 70°, l'élimination des premiers jets de lait et par la suite le prélèvement de lait dans des pots stériles de 30 ml. Ces derniers ont été identifiés sur place et acheminés au laboratoire en condition réfrigérées.

Afin de préparer les échantillons, 1 ml de lait a été pipeté dans 9 ml d'eau physiologique dans des conditions aseptiques, puis des dilutions décimales ont été effectuées (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). La solution mère ainsi que les différentes dilutions réalisées sont ensemencées sur des boîtes de Pétri (1 ml).

2.2.3.2. Isolement des bactéries et aspect macroscopique des colonies

L'isolement des souches cliniques de staphylocoques a été réalisé en utilisant la gélose Chapman (milieu sélectif pour les staphylocoques), et la description de l'aspect macroscopique des colonies est portée sur l'observation des colonies à l'œil nu pour décrire les caractéristiques de ces dernières (la forme, la taille, la couleur, etc...).



Figure 27. Dissout de la gélose Chapman et préparation des milieux de culture (Originale, 2021).

2.2.3.3. Aspect microscopique après coloration de Gram

Après la réalisation de la coloration de Gram sur les souches prélevées à partir des colonies ensemencées auparavant sur la gélose Chapman, les souches de staphylocoques apparaissent au microscope sous la forme de cocci Gram + regroupées en diplocoques ou en grappes de raisin.

2.2.3.4. Test de catalase

Le test de catalase est un test utilisé pour faciliter la détection de l'enzyme catalase chez les bactéries, il est essentiellement utilisé pour différencier les *Micrococcaceae* catalase positives des *Streptococcaceae* catalase négatives (Reiner, 2010).

L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène par l'accélération de sa décomposition en eau et en oxygène ($2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalase} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), ainsi, cette réaction se manifeste par la formation rapide de bulles (Reiner, 2010).

L'activité catalytique consiste à prélever une colonie de bactéries et la dissocier dans une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) à 10 volumes, l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène.

2.2.3.5. Test de coagulase libre

La coagulase libre est une enzyme qui est capable de coaguler le plasma sanguin en catalysant la transformation du fibrinogène en fibrine, ce qui permet de créer un caillot qui délimite le foyer infectieux et rend les germes à l'abri du système immunitaire (Haidara, 2010), *S. aureus* est considéré comme une espèce de staphylocoques à coagulase positive donc qui peut produire la coagulase (Javid *et al.*, 2018).

Le test de coagulase est effectué en ajoutant 0.5 ml d'une culture de staphylocoques cultivés sur bouillon dans 0.5 ml de plasma animal puis le mélange est incubé dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La réaction est considérée positive si un caillot de coagulation est visible lorsque le tube est incliné (Bude et Mengesha, 2021).

2.2.3.6. Tests biochimiques (galerie API STAPH)

Le système API Staph est un système biochimique d'identification des staphylocoques et des microcoques sur la base de 19 propriétés. Il se compose d'une bande contenant des tests de substrats déshydratés répartis dans des microtubes individuels (Pascoli *et al.*, 1986).

Suite aux recommandations du fabricant, une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium et ayant une opacité de 0,5 McFarland a été inoculée dans les microtubes. Les différentes galeries ont par la suite été incubées à 37°C pendant 24 heures. La lecture des résultats des réactions biochimiques a été réalisée en se référant au tableau de lecture disponible dans le kit. La figure 28 résume les principales étapes de la réalisation de la galerie API.

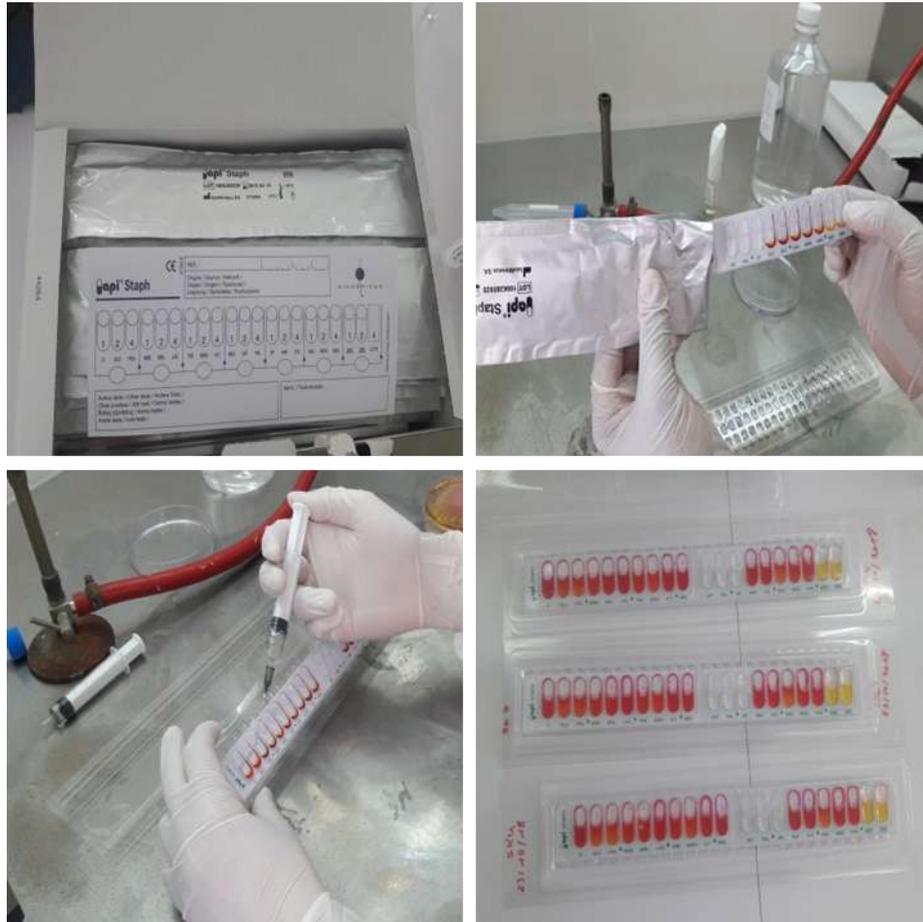


Figure 28. Préparation des suspensions bactériennes et inoculation de la galerie API
(Originale, 2021)

2.2.3.7. Test par MALDI-tof

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS ou Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) est une méthode alternative rapide et fiable pour l'identification des bactéries pathogènes chez l'homme et l'animal par l'analyse de leurs protéines totales (Sauget, 2016; Braga *et al.*, 2018; Nonnemann *et al.*, 2019). Il s'agit d'une technique d'analyse qui permet d'identifier différents types de molécules ionisées par la mesure de leur rapport masse/charge (Sauget, 2016).

Le principe de la technique est basé sur la génération de spectres de masse à partir de colonies entières, ce spectre de masse est très majoritairement constitué de protéines ribosomales et membranaires, avec un logiciel associé au spectromètre qui compare le spectre obtenu à des spectres référencés dans une base de données (Sauget, 2016).

Afin de réaliser le test MALDI-TOF, nous avons procédé à la préparation des échantillons à partir des souches qui se sont développées après 24 heures de culture (cultures fraîches) selon la méthode étendue « Extended method », puis nous avons suivis les étapes suivantes :

- Étaler une colonie de la culture sur le spot de la cible MALDI-TOF ;
- Déposer 1µl d'acide formique sur le spot ;
- Laisser sécher à température ambiante.
- Ajouter 1µl de la matrice HCCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamique ou α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) ;
- Laisser sécher à température ambiante ;
- Analyse par MALDI-TOF.

L'équipement utilisé pour la réalisation du test est MALDI-TOF MICROFLEX LT de BRUKER avec les caractéristiques (Software 1: FlexControl 3.4 ; Software 2: Biotyper RTC 4.0 ; Database: BDAL ; Laser frequency: 60.0 HZ ; Mode : Linear ; Sensitivity: 100.0 mv/full scale ; Polarity : positive). L'identification de l'espèce et du genre par MALDI-TOF MS ont été effectuées conformément aux spécifications techniques du fabricant.



Figure 29. MALDI-TOF MICROFLEX LT de BRUKER utilisé pour le test Maldi-tof (Originale, 2021)

2.2.3.8. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches cliniques de staphylocoques aux différents antibiotiques a été testée par la réalisation d'un antibiogramme. Les antibiotiques à tester ont été choisis

sur la base des résultats d'une enquête menée auprès des vétérinaires praticiens de la région d'étude sur les principales molécules utilisées pour le traitement des mammites bovines. Deux molécules d'antibiotiques fortement utilisées en médecine humaine ont été rajoutées au test.

Les disques d'antibiotiques utilisés pour les essais de diffusion sur disque, sont les suivants : Spiramycine (100 µg/disc), Pénicilline G (10 unités/disc), Streptomycine (300 µg/disc), Amoxicilline (25 µg/disc), Céfalexine (120 µg/disc), et Gentamicine (120 µg/disc). Le principe de cette méthode consiste à placer la culture bactérienne en présence du ou des antibiotiques à tester et observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci.

2.2.3.8.1. Préparation du milieu de culture

Le milieu utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme est la gélose Mueller-Hinton (MH). La gélose est coulée en boîte de pétri bien uniformément de manière à ce que l'épaisseur soit de 4 mm (25 ml pour les boîtes de 9 cm de diamètre). Les boîtes doivent être pré-séchées avant l'emploi (30 minutes à 37°C).

2.2.3.8.2. Préparation de l'inoculum et ensemencement bactérien

A partir d'une culture pure et fraîche de 18 à 24 heures (milieu d'isolement), on prélève quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une anse de platine. Les colonies prélevées sont par la suite déposées dans 10 ml d'eau physiologique stérile, puis homogénéisée à l'aide d'un agitateur Vortex de manière à obtenir une opacité équivalente à 0,5 McFarland.

Après avoir préparé l'inoculum, l'ensemencement des bactéries doit se faire dans les 15 minutes qui suivent. Il consiste à déposer 1 ml de l'inoculum dans le milieu de culture puis tourner la boîte de façon à ce que la gélose soit entièrement recouverte. Cette opération doit être répétée à deux reprises en tournant la boîte sur un angle de 60° à chaque fois afin d'assurer l'entrecroisement du dépôt de l'inoculum. La suspension excédentaire a été aspirée de façon à laisser la boîte légèrement humide sans trace de liquide, et séchée pendant 20 à 30 min.



Figure 30. Préparation des inoculum à partir des différentes souches bactériennes (Originale, 2021).

L'application des disques d'antibiotiques est effectuée à l'aide d'une pince stérile par dépôt sur le milieu de la culture, puis les boîtes sont mises en incubation à 35°C pendant 18 à 24 heures.

2.2.3.8.3. Lecture et interprétation des résultats

La lecture des résultats de l'antibiogramme est réalisée 24 heures après incubation par la mesure des diamètres des zones d'inhibition exprimés en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse. L'interprétation des résultats est effectuée on se référant aux recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (SFM, 2020).

L'interprétation des résultats de l'antibiogramme selon le diamètre de la zone qui entoure le disque d'antibiotique ou zone d'inhibition est divisée en trois types : souche ou bactérie sensible, intermédiaire ou résistante.

Les souches ayant un diamètre de la zone d'inhibition inférieur au seuil de résistance sont considérées comme résistantes. Celles ayant un diamètre supérieur au seuil de sensibilité sont considérées comme sensibles et les souches ayant un diamètre compris entre le seuil de résistance et le seuil de sensibilité sont considérées comme intermédiaires et sont classées avec les souches résistantes.

2.2.4. Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne des HE

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HE étudiées sur les souches de staphylocoques utilisées a été déterminée par la méthode de diffusion d'HE en milieu

solide similaire à l'antibiogramme selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) américain (Fontanay *et al.*, 2015).

Après avoir coulé les boîtes de pétri avec la gélose Mueller-Hinton (MH), ces dernières sont ensemencées avec la suspension bactérienne à tester (avec une densité de 0,5 au McFarland (10^6 - 10^8 UFC)) provenant d'une culture fraîche (24 heures). Un disque stérile vierge pour aromatogramme ayant un diamètre de 6 mm et imprégné de 10 μ l de l'HE à tester a été déposé à la surface de la gélose au milieu de la boîte de pétri à l'aide d'une pince stérile.

Après avoir terminé de la mise en place de tous les disques imprégnés de toutes les HE à tester, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure à l'aide d'un pied à coulisse du diamètre d'inhibition (mm ou cm) correspondant à la zone claire autour du disque d'HE (halo translucide).



Figure 31. Application des disques, imprégnation de l'HE et lecture des résultats (Originale, 2021).

2.3. Caractérisation des huiles essentielles étudiées

2.3.1. Extraction des huiles essentielles

2.3.1.1. Dispositif d'extraction

Un hydrodistillateur de type Clevenger a été utilisé pour l'extraction des huiles essentielles à partir des parties aériennes des plantes étudiées. L'hydrodistillateur est constitué d'un chauffe ballon, d'un ballon en verre pyrex dans lequel est placé le matériel végétal qui est immergé dans l'eau distillée, d'une colonne de condensation de la vapeur ou réfrigérant et d'un collecteur en verre pyrex et qui reçoit aussi les extraits de la distillation.



Figure 32. Hydrodistillateur de type Clevenger (Originale, 2021).

2.3.1.2. Procédé d'extraction

Afin d'extraire les HE des différentes plantes, une quantité des parties aériennes séchées de chaque plante a été pesée et a été mise dans le ballon en verre pyrex de l'hydrodistillateur avec un litre d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition, et l'huile essentielle est entraînée par la vapeur d'eau après l'apparition de cette dernière. La durée moyenne de l'extraction varie d'environ 2h30min à 3h afin de récupérer la quantité maximale de l'HE.

La phase organique représentée par l'huile essentielle est recueillie dans un vial en verre ambré et conservée en condition réfrigérée à 4°C (Burt, 2004).



Figure 33. Pesée et extraction des HE par hydrodistillation (Originale, 2021).

2.3.1.3. Détermination du rendement d'extraction

La détermination du rendement d'extraction des différentes huiles essentielles est effectuée en suivant la méthode normalisée de la norme AFNOR pour la détermination du rendement d'extraction. Selon la norme établie par l'association française de normalisation (AFNOR, 1986), le rendement en huile essentielle (RHE) peut être défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M'}{M} \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%) ;

M' : Masse d'huile essentielle en gramme (g) ;

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

2.3.2 Caractérisation chimique des huiles essentielles étudiées par chromatographie en phase gazeuse associé à la spectrométrie de masse (CPG-MS ou GC/MS)

La composition chimique des différentes huiles essentielles a été identifiée en se basant sur les indices de Kováts (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG-SM). Les analyses chromatographiques ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard Agilent HP 6890 couplé à un spectromètre de masse Hewlett Packard Agilent HP 5973 (Agilent, CA, USA) et équipé

d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m × 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm, 5% Phenyl/95% dimethylpolysiloxane).

Les spectres ont été obtenus selon les conditions opératoires suivantes :

Le volume injecté était de 1 µl en mode splitless; la température d'injection était de 250°C. Le gaz vecteur est l'hélium de pureté N6 dont le débit est fixé à 0,5 ml/min. Le programme de température du four (60°C pendant 8 min, augmenté à raison de 2°C/min jusqu'à 250°C, puis maintenu en isotherme à 250°C pendant 10 min). La durée d'analyse de 113 min.

La gamme de masse scannée m/z : 30-550 et la température d'interface est de 270°C et une température de la source réglée à 230°C. La fragmentation est réalisée par impact électronique à 70eV. Le type de l'analyseur de masse est quadripôles.

La base de données du spectre de masse utilisée pour l'identification des composants d'huile essentielle était Wiley 7N et NIST 02 (National Institute of Standards and Technology, USA).

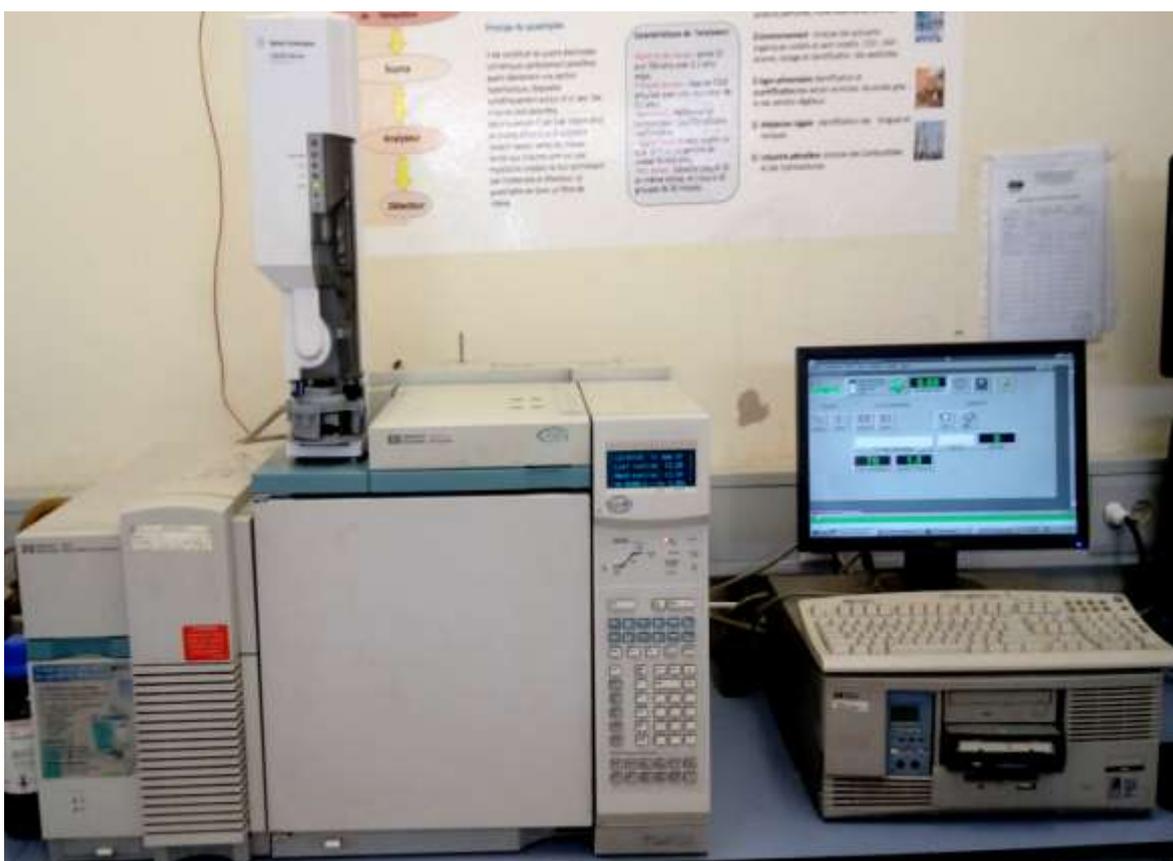


Figure 34. Analyse de l'huile essentielle par CPG-SM (Originale, 2021).

3. Résultats et discussion

3.1. Rendement en huile essentielle des plantes étudiées

Le tableau 12 suivant résume les rendements moyens en huile essentielle des différentes plantes étudiées (origan, menthe et thym).

Tableau 12. Rendements en huiles essentielles des différentes plantes étudiées

Espèce végétale	Rendement % (ml HE/100 g de matière sèche)
<i>Origanum Floribundum Munby</i>	1,08
<i>Origanum vulgare</i>	3,24
<i>Thymus munbyanus</i>	1,64
<i>Mentha pulegium</i>	1,49

3.1.1. Rendement en HE d'*Origanum floribundum*

L'extraction de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum* a permis d'obtenir un rendement évalué à 1,08 % exprimé en millilitre pour 100 grammes de matière végétale sèche. Ce rendement est différent de ceux cités dans d'autres travaux réalisés en Algérie (Tableau 13).

Le rendement enregistré est légèrement inférieur à celui (1,6%) rapporté par Brada *et al.* (2012) à partir d'une étude réalisée dans la région d'Ain-Defla au centre nord de l'Algérie. Par ailleurs, le rendement obtenu est très faible comparativement à ceux provenant de la région de Chréa (Blida) (Chikhoune, 2007; Hadjadj et Hazzit, 2020) et de la région d'Alger (Hazzit et Baaliouamer, 2009; Kerbouche *et al.* 2015).

Toutefois, le rendement est supérieur à celui obtenu par Baser *et al.* (2000) dans la région de Chréa-Blida.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la variabilité du rendement en HE au sein de la même espèce, ces facteurs peuvent être extrinsèques et intrinsèques.

L'*Origanum floribundum*, selon la littérature est une espèce aromatique avec un rendement en huile essentielle moyen vis-à-vis des autres espèces.

Le faible rendement en HE obtenu par rapport aux autres études réalisées sur la même espèce pourrait être expliqué par l'origine et la période de récolte de la plante, la durée de séchage, de conservation et la méthode d'extraction employée qui sont autant d'éléments qui peuvent avoir un impact directe sur les rendements en HE (Aprotosoiaie *et al.*, 2010).

Une meilleure maîtrise des différentes étapes, de la récolte de la plante jusqu'à l'extraction de l'HE, serait l'élément clé pour minimiser les pertes et maximiser le rendement. Au-delà, il existe des facteurs intrinsèques qui interviennent dans la variabilité du rendement en huiles essentielles ; dont le stade végétatif, la mutation, l'hybridation et la polyploïdie (Aprotosoia *et al.*, 2010), nécessitant l'emploi d'outils complexes.

Tableau 13. Quelques rendements en HE d'*O. floribundum* de différentes régions algériennes

Rendement (%)	Région d'Algérie	Référence
18,4	Alger	Kerbouche <i>et al.</i> , 2015
3,00	Blida	Hadjadj et Hazzit 2020
0,66	Blida	Baser <i>et al.</i> 2000
1,6	Ain Defla	Brada <i>et al.</i> 2012
4,3	Blida	Chikhoun, 2007
2,00	Alger	Hazzit et Baaliouamer 2009

3.1.2. Rendement en HE d'*Origanum vulgare*

L'extraction de l'HE d'*O. vulgare* a fourni un rendement de l'ordre de 3,24 %.

Ce résultat est supérieur à ceux obtenus dans certains travaux menés sur *O. vulgare* dans le Nord-est Algérien. Amrouni *et al.* (2014) ont ainsi obtenu un rendement évalué à $2,7 \pm 0,06\%$ pour des plantes issues des régions de Guelma et Annaba. Mahfouf, (2018) a évalué pour sa part, le rendement en HE à 1,15% dans la région de Guelma, tandis que Heni *et al.* (2020) ont relevé 2,8% dans la région de Skikda.

Au Maroc, Derwich *et al.*, (2010) ont enregistré un rendement de 1,15% en HE d'*O. vulgare* marocains. En Turquie, Sezik *et al.*, (1993), ont obtenus un rendement de 0.08% pour la même espèce d'origan, alors que Kokkini et Vokou, (1989), ont enregistré un rendement en HE de 0,1-0,3% au Nord de la Grèce.

Cette différence des rendements peut être expliquée par à la variabilité des paramètres écologiques, comme le climat, le stade de développement des plantes et la saison de récolte (Sari, 2018).

Tableau 14. Rendements en HE d'*O. vulgare* dans quelques pays du monde

Rendement (%)	Pays	Référence
2,7 ± 0,06	Algérie (Guelma et Annaba)	Amrouni <i>et al.</i> (2014)
1,15	Algérie (Guelma)	Mahfouf, (2018)
2,8	Algérie (Skikda)	Heni <i>et al.</i> (2020)
1,15	Maroc	Derwich <i>et al.</i> , (2010)
0,08	Turquie	Sezik <i>et al.</i> , (1993)
0,1 à 0,3	Grèce	Kokkini et Vokou, (1989)

3.1.3. Rendement en HE de *Thymus munbyanus*

L'extraction de l'HE de *T. munbyanus* a fourni un rendement de 1,64%. Cette valeur est supérieure à celle obtenue par Bendif *et al.* (2018), suite à l'extraction de l'HE des parties sèches de la même espèce que la nôtre *T. munbyanus* récolté à partir de la région de Tiaret au nord-ouest algérien avec un rendement de 0,09% (Bendif *et al.*, 2018). Le *Thymus munbyanus* est une espèce endémique de l'Algérie et Maroc. Par rapport aux études réalisées dans ce dernier pays, le rendement extraite de la même espèce est supérieure à celui enregistré par Moukhles *et al.*, (2018) qui ont enregistré un rendement de 0,39%.

Toutefois, dans des études sur la même espèce, le rendement était inférieur à celui obtenu par Chikhounne *et al.*, (2015) dans la région centre de Bejaïa qui ont enregistré un rendement de 2,8%, à celui de 1,8% trouvé par Hazzit *et al.* (2006) en Kabylie, et aussi à celui de 2,3% enregistré par Benchabane *et al.*, (2012) sur des échantillons de *Thymus munbyanus* récoltés dans la région de Azzazga (Tizi Ouzou).

En outre, selon Khadir *et al.*, (2013) et Tefiani *et al.*, (2015), le rendement en HE des parties sèches de *T. munbyanus* récolté dans la région de Tlemcen à l'ouest algérien a été de 6% et de 3%, respectivement.

Au Maroc, selon Belmalha *et al.*, (2015), le rendement en HE de *T. munbyanus* a été variable selon la région de provenance de thym et varie de 0,37 à 0,44% ($\pm 0,03$). Dans ce pays, aussi, Ouknin *et al.*, (2018), ont rapporté un rendement en HE de *T. munbyanus* de $1,7 \pm 0,10\%$.

Tableau 15. Rendements en HE de *Thymus munbyanus* en Algérie et au Maroc

Rendement (%)	Région	Référence
0,09	Algérie (Msila)	Bendif <i>et al.</i> (2018),
2,8	Algérie (Béjaia)	Chikhounne <i>et al.</i> (2015)
1,8	Algérie (Kabylie)	Hazzit <i>et al.</i> (2006)
2,3	Algérie (Azzazga)	Benchabane <i>et al.</i> (2012)
6	Algérie (Tlemcen)	Khadir <i>et al.</i> (2013)
3	Algérie (Tlemcen)	Tefiani <i>et al.</i> (2015)
0.39	Maroc	Moukhles <i>et al.</i> (2018)
0,37-0,44 ($\pm 0,03$)	Maroc	Belmalha <i>et al.</i> (2015)
1,7 \pm 0,10	Maroc	Ouknin <i>et al.</i> (2018)

3.1.4. Rendement en HE de *Mentha pulegium*

Un rendement de 1,49% en HE de *Mentha pulegium* a été obtenu suite à son extraction. Selon une étude réalisée par Beghidja *et al.* (2007), sur des plantes de l'espèce *Mentha pulegium* récoltées de différentes régions de l'est algérien, les rendements d'extraction étaient compris entre 1,16 et 2,19 %. Cependant, ce rendement a été évalué à $2,931 \pm 0,020\%$ sur des échantillons de menthe pouliot récoltés dans la région de Tizi-Ouzou (Benazzouz, 2012). Dans la région de l'est algérien (M'sila), suite une étude sur la même espèce de menthe récoltée à l'état sauvage, un rendement plus faible de 0,202% a été enregistré (Messaoudi *et al.* 2022). D'après l'étude réalisée au Maroc, le rendement en HE a été de 1,66% (Derwich *et al.*, 2010).

Tableau 16. Rendements en HE de *Mentha pulegium* en Algérie et dans certaines régions du monde

Rendement (%)	Région	Référence
1,16 à 2,19	Algérie (Est algérien)	Beghidja <i>et al.</i> (2007)
2,931 ± 0,020	Algérie (Tizi-Ouzou)	Benazzouz (2012).
0,202	Algérie (Msila)	Messaoudi <i>et al.</i> (2022)
1,66	Maroc	Derwich <i>et al.</i> (2010)

3.2. Composition chimique des HE analysées par CPG-SM

3.2.1. Huile essentielle d'*Origanum floribundum*

L'analyse de l'HE d'*Origanum floribundum* par CG/SM (Annexe 2, Tableau 17) a permis l'identification de 18 composés (94,94% de l'HE) dont les composés majoritaires sont représentés par le thymol (43,01%), le p-cymène (38,60%) et le carvacrol (7,58%).

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Ksouri *et al.* (2017) qui ont utilisé de l'*O. floribundum* provenant de la même région de collecte (Guelma) et mis en évidence la présence de thymol (50,47%) et de P-cymène (24,22%) comme composés prédominants.

En outre, selon Hadjadj et Hazzit, (2020), l'analyse chromatographique de l'HE de deux échantillons d'*O. floribundum* récoltés dans la région de Blida (Algérie) a permis l'identification de 47 composants actifs (98,8- 99,1% de l'HE), avec le p-cymène composé majoritaire (60,7-73,4%).

Selon Baser *et al.* (2000), l'analyse de l'HE d'*O. floribundum* récolté du parc national de Chréa de Blida (Algérie) par CG/SM a permis la mise en évidence de 70 composants dans l'huile (98,7% des composés de l'HE), avec la présence du carvacrol (40%), du linalool (16,1%), et du p-cymène (12,4%) comme composés majoritaires.

Selon Boulaghmen *et al.* (2019), l'analyse a permis d'identifier 27 composés (99,8% des composés de l'HE) dont le composé majoritaire a été le p-cymène (53,4%).

Selon Kerbouche *et al.* (2015), l'analyse par CG/SM de l'huile essentielle d'*O. floribundum* récolté dans la région de Lakhdaria (Bouira) au nord centre de l'Algérie a permis d'identifier le thymol (33,6 %), γ -terpinène (19,9 %) et la p-cymène (15,5 %) comme composés majoritaires parmi 55 composés (98,4% de l'HE).

Tableau 17. Composition de l'huile essentielle d'*Origanum floribundum*.

Nombre de pics	Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage de la zone de pic (%)
1	α -Pinene	9,9	0,18
2	1-Octen-3-ol	12,78	0,85
3	3-Octanone	13,28	0,26
4	p-Cymene	15,82	38,60
5	Limonene	16,04	0,14
6	Trans-Linalool oxide	19,16	0,26
7	Linalool	21,16	0,87
8	Borneol	25,7	0,38
9	Terpinen-4-ol	26,58	0,50
10	p-Cymen-8-ol	27,2	1,44
11	α -terpineol	27,55	0,62
12	Thymol Methyl Ether	30,75	trace
13	Thymol	34,9	43,01
14	Carvacrol	35,41	7,58
15	Caryophyllene	42,77	0,09
16	α -Curcumene	46,83	0,14
17	β -Bisabolene	48,38	0,20
18	Caryophyllene oxide	52,6	1,10
	Composés non identifiés		5,06
	Total des composés identifiés		94,94

3.2.2. Huile essentielle d'*Origanum vulgare*

L'analyse de l'HE d'*Origanum vulgare* par CG/SM (Annexe 2, Tableau 18) a permis l'identification de 21 composés (99,92%) dont le p-cymène (44,59%), le thymol (35,69%), le γ -terpinène (13,87%) et le α -terpinène (1,45%).

Selon Heni *et al.* (2020), l'huile essentielle extraite par hydrodistillation des parties aériennes d'*Origanum vulgare* récolté dans la région de Skikda (Nord-est algérien) et analysée par chromatographie (GC/MS) a permis d'identifier 98,10 % de ses constituants

prédominés par le carvacrol (47,6 %), le thymol (16,6 %), le p-cymène (13,5 %) et le γ -terpinène (11,2%).

Aussi, selon l'étude d'Ounaïssia *et al.* (2019), l'analyse par CG/SM de l'HE d'*O. vulgare* récolté dans la région de Guelma a montré que le composant le plus abondant était le thymol avec un pourcentage proche de ce qu'on a obtenu (32,58%).

La composition identifiée est différente à celle obtenue par Fikry *et al.* (2019) en Égypte. Ces auteurs ont rapporté la prédominance du terpinène-4-ol (38,35 %) et l'hydrate de trans-sabinène (10,06 %) dans la composition de l'HE d'*Origanum vulgare*.

En outre, selon Arámbula *et al.* (2019), l'analyse de l'HE par CG/SM a montré que les composants majoritaires de l'huile sont représentés par : le thymol (30,6%), suivi par le thymol éther méthylique (17,4%), le α -terpinène (15,7 %) et le carvacrol (8,1%).

Une autre étude effectuée au Maroc a révélé que le carvacrol était le constituant majeur de l'HE avec 18,06% d'abondance (Derwich *et al.*, 2010). Cependant, ce composé n'a pas été identifié dans la présente HE d'*Origanum vulgare* Constantinois. Bien que le patrimoine génétique de la plante est le déterminant exclusive de la présence ou l'absence d'un composé chimique, sa concentration est influencée à la fois par des facteurs génétique et environnementaux (Deschepper, 2017). Une telle absence du carvacrol peut être liée à la localisation du site de collecte. Hazzit *et al.* (2009) ont rapporté son absence dans la composition de l'HE de *Thymus algeriensis* collecté à 1500 m par rapport à sa présence dans les échantillons de cette espèce ayant poussés à 800 m d'altitude au parc national de Chréa (Blida).

Tableau 18. Composition de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* (Constantine)

Nombre de pics	Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage de la zone de pic (%)
1	α -Thujene	8,27	0,71
2	α -Pinene	8,62	0,71
3	Camphene	9,45	0,09
4	β -Pinene	11,11	0,10
5	1-Octen-3-ol	11,94	0,03
6	β -Myrcene	12,18	0,70
7	α -Phellandrene	12,98	0,10
8	δ -3-Carene	13,28	0,05
9	α-Terpinene	13,85	1,45
10	p-Cymene	14,73	44,59
11	γ-Terpinene	17,03	13,87
12	Linalool	20,95	0,16
13	Camphor	22,71	0,01
14	4-Terpineol	26,25	0,05
15	Thymol Methyl Ether	29,40	0,15
16	Carvacrol Methyl Ether	30,04	0,16
17	Thymol	35,98	35,69
18	β -Caryophyllene	41,27	0,31
19	β -Bisabolene	46,98	0,28
20	Aromadendrene	47,92	0,24
21	Caryophyllene oxide	51,30	0,47
Composés non identifiés			0,08
Total des composés identifiés			99,92

3.2.3. Huile essentielle de *Thymus munbyanus*

L'analyse de l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* par CG/SM (Annexe 2, Tableau 19) a permis l'identification de 27 composés actifs représentant un total de 97,9% composés. Les composés majoritaires sont le thymol (56,37%), le p-cymène (15%), le carvacrol (12,55%), le linalool (3,09%), le thymol méthyl éther (2,68%), α -pinène (2,24%) et dl-

limonène (1,04%). Cette prédominance de thymol a été également rapportée par Chikhouné *et al.* (2015) dans l'HE de *T. munbyanus* récolté dans la région de Kabylie en Algérie avec le thymol (52,0%), γ -terpinène (11,0%), p-cymène (8,5%) et le carvacrol (5,2%) comme composés majoritaires, et aussi par Hazzit *et al.* (2006) qui ont rapporté la prédominance du thymol (37,7%) en présence du p-cymène (14,2%).

Ce chimotype (thymol) est différent de ce qui a été rapporté par d'autres auteurs algériens qui ont trouvé que le carvacrol était le composé majoritaire. Ils ont rapporté des pourcentages de 35,2 % de carvacrol et de 18,5 % de thymol dans l'HE de *T. munbyanus* récolté dans la région de Azzazga (Benchabane *et al.*, 2012), de 80,1% de carvacrol dans la région de Tlemcen (Khadir *et al.*, 2013), et 71% de carvacrol, aussi, dans la région de Tlemcen (Tefiani *et al.*, 2015).

Contrairement à nos résultats, au Maroc, l'analyse de l'HE des échantillons de *Thymus munbyanus* a démontré que le composé majoritaire dans cette huile était le carvacrol (44,52%) suivi du p-cymène (16,64%) et du γ -terpinène (10,85%) (Moukhles *et al.*, 2018). Dans ce pays, selon Ouknin *et al.* (2018), le carvacrol (31,8%) était aussi le composant dominant suivi du γ -Terpinène (21,9%), p-cymène (14,7%) et du thymol (7,6%). Or, un autre chercheur marocain a noté que le camphre était le composant prédominant dans les huiles essentielles de *T. munbyanus* récolté de différentes régions avec des pourcentages variant de 21,83% à 36,63% (Belmalha *et al.*, 2015).

Tableau 19. Composition de l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* (Constantine).

Nombre de pics	Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage de la zone de pic (%)
1	α -Thujene	9,69	0,23
2	α-Pinene	10,09	2,24
3	Camphene	10,91	0,06
4	β -Pinene	12,63	0,09
5	Octen-3-ol	13,21	0,48
6	β -Myrcene	13,68	0,22
7	α -Phellandrene	14,51	0,08
8	3-Carene	14,85	0,01
9	α -Terpinene	15,35	0,56
10	<i>p</i>-Cymene	16,16	15,00
11	dl-Limonene	16,28	1,04
12	γ -Terpinene	18,34	0,74
13	α -Terpinolene	20,41	0,02
14	Linalool	21,74	3,09
15	Terpin-4-ol	27	0,43
16	Thymol methyl ether	31,06	2,68
17	Thymol	36,68	56,37
18	Carvacrol	37,12	12,55
19	α -Copaene	40,28	0,04
20	β -Bourbonene	40,86	0,03
21	Caryophyllene	43,03	0,60
22	α -Humulene	45,14	0,02
23	Germacrene D	46,65	0,11
24	β -Bisabolene	48,67	0,36
25	γ -Cadinene	48,93	0,10
26	δ -Cadinene	49,49	0,28
27	Caryophyllene oxide	52,97	0,48
	Composés non identifiés		2,10
	Total des composés identifiés		97,90

3.2.4. Composition chimique de *Mentha pulegium*

L'analyse de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* collecté à la région de Constantine par CPG-SM n'a pas permis d'identifier sa composition chimique pour raison technique liée à la qualité de l'échantillon analysé (pureté). Le profil de cette composition est disponible en annexe 2.

Selon la littérature, l'analyse des HE extraites de différents échantillons de *M. pulegium* provenant de différentes régions de l'est algérien (Beghidja *et al.*, 2007) a montré que la pulégone était le constituant majoritaire dans la plupart des échantillons avec des concentrations allant jusqu'à 87,3%. Au Maroc, au contraire, l'analyse de la composition chimique de *Mentha pulegium* a montré que le composant majeur était la pipéritone (35,56%), suivie par la pipériténone (21,18%), l'alpha-terpinéol (10,89%) et la pulégone (6,452%) (Derwich *et al.*, 2010).

3.3. Distribution géographique des souches identifiées

3.3.1. Distribution géographique des souches identifiées par API- Staph et MALDI-TOF

Le tableau 20 montre l'absence de différence significative ($p > 0,05$) dans la distribution géographique des différentes souches bactériennes isolées dans les exploitations laitières suivies dans les trois régions d'étude (Souk Ahras, Constantine et El-Tarf). Les résultats des analyses microbiologiques des échantillons de laits prélevés par le système d'identification API-Staph et par MALDI-TOF montrent la présence, principalement, de trois genres bactériens, à savoir, *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus*, en plus d'une souche non identifiée. Ces résultats montrent une prépondérance du *Staphylococcus* spp. (15 isolats ; 72,22%) comme agent étiologique des mammites dans les élevages suivis dont 7 espèces ont été identifiées à savoir *S. aureus* et des staphylocoques non aureus (SNA) ou staphylocoques à coagulase négative (SCN) qui sont représentés par *S. haemolyticus* et *S. xylosus* (11,1%), et par *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes* et *S. capitis*.

La présence de *S. aureus* a caractérisé les fermes de la région de Souk Ahras et d'El Tarf (11,1 % et 5,6 % respectivement) par rapport à la ferme de la région de Constantine où l'absence totale de *S. aureus* dans tous les échantillons de lait collectés a été notée.

En accordance avec cette constatation, Lopes *et al.* (2022), sur 107 échantillons de lait de vaches prélevés de différents élevages touchés par les mammites au sud de Brésil, ont

analysé 51 isolats, préidentifiés bactériologiquement, par MALDI-TOF dont 41 isolats ont été mis en évidence avec succès. Cette technique a confirmé à ces auteurs la prédominance et l'appartenance de 35 isolats au genre *Staphylococcus* (85,4%). La fréquence d'isolement de *Staphylococcus aureus* estimé à 20% parmi les 8 espèces identifiées par ces auteurs était proche de ce qu'on a identifié bien que sur un total de 18 souches (16,7%).

De même, Haydar et Reem Rabie, (2019) au Soudan, sur 60 échantillons de lait prélevés lors de mammites bovines, ont observé que les staphylocoques représentaient 52% des isolats.

Tableau 20. Distribution géographiques des souches cliniques isolées et identifiées par galerie biochimique (API Staph) et par MALDITOF-MS

Espèces	Région				Chi-2	Sig.	
	Souk Ahras	Constantine	El-Tarf	Total			
<i>S. aureus</i>	N	2 _{a, b}	0 _b	1 _a	3	20,50	0,31
	%	11,1	0,0	5,6	16,7		
<i>S. capitis</i>	N	0 _a	1 _{a, b}	1 _b	2		
	%	0,0	5,6	5,6	11,1		
<i>S. chromogenes</i>	N	0 _a	1 _a	0 _a	1		
	%	0,0	5,6	0,0	5,6		
<i>S. cohnii</i>	N	0 _a	1 _a	0 _a	1		
	%	0,0	5,6	0,0	5,6		
<i>S. epidermidis</i>	N	1 _a	1 _a	0 _a	2		
	%	5,6	5,6	0,0	11,1		
<i>S. haemolyticus</i>	N	0 _a	2 _a	0 _a	2		
	%	0,0	11,1	0,0	11,1		
<i>S. xylosus</i>	N	0 _a	2 _a	0 _a	2		
	%	0,0	11,1	0,0	11,1		
<i>Bacillus licheniformis</i>	N	0 _a	1 _a	0 _a	1		
	%	0,0	5,6	0,0	5,6		
<i>Micrococcus spp.</i>	N	3 _a	0 _b	0 _{a, b}	3		
	%	16,7	0,0	0,0	16,7		
Souche non-identifiée	N	1 _a	0 _a	0 _a	1		
	%	5,6	0,0	0,0	5,6		
Total	N	7	9	2	18		
	%	38,9	50,0	11,1	100		

Par rapport au nombre total des échantillons contaminés par *Staphylococcus*, l'analyse des résultats montre la faible prévalence de *S. aureus* avec son absence totale les échantillons prélevés dans la région de Constantine comparativement à celle des staphylocoques non aureus dont 61,5% de ces souches proviennent de Constantine (figure 35). La fréquence

élevée des SNC est similaire à celles rapportées en Afrique par Mbindyo *et al.* (2020) au Kenya et en Europe par Vakkamäki *et al.* (2017) en Finlande.

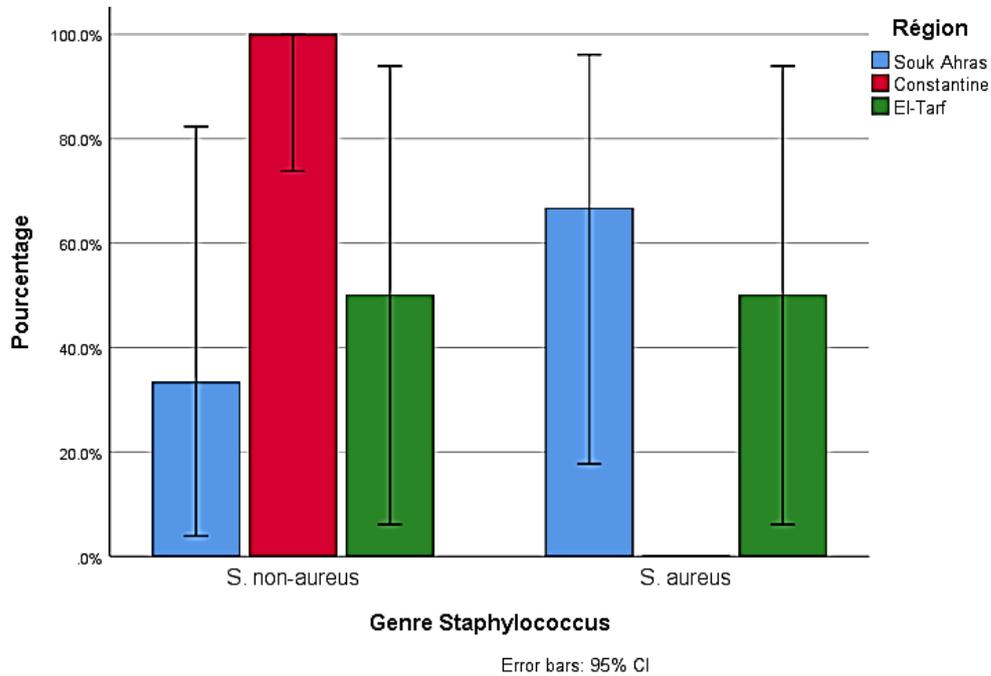


Figure 35. Distribution géographique des souches de Staphylocoques (aureus et non aureus).

3.4. Sensibilité des souches de staphylocoques (cliniques et de référence) vis-à-vis des antibiotiques testés

3.4.1. Effets des antibiotiques sur les souches de staphylocoques étudiées

Le tableau ci-dessous montre l'activité des antibiotiques vis-à-vis des différentes souches de staphylocoques étudiées (aureus et non aureus). Il montre que le diamètre de la zone d'inhibition le plus élevé a été obtenu pour la gentamicine avec une moyenne de 34,29 mm. Toutefois, il est variable entre les souches aureus et non aureus, avec un diamètre de 35,00 mm pour les staphylocoques non aureus et de 32,50 mm pour les aureus. En revanche, le diamètre d'inhibition le moins important (17,07 mm) était dû à l'action de la pénicilline. Cependant ce diamètre moyen varie entre les souches de staphylocoques, allant de 9,75 mm pour les souches aureus jusqu'à 20 mm pour les non aureus.

Tableau 21. Effet des antibiotiques sur les souches du genre *Staphylococcus* (Cliniques et ATCC)

Antibiotiques testés	Souches du genre <i>Staphylococcus</i>	N	Diamètre d'inhibition (moyenne)	S.D	Min	Max	ANOVA	
							F	Sig.
Amoxicilline (AMOX)	<i>S. non-aureus</i>	10	26,30	11,28	12,00	45,00	1,11	0,31
	<i>S. aureus</i>	4	33,50	12,23	17,00	45,00		
	Total	14	28,36	11,58	12,00	45,00		
Streptomycine (HLS)	<i>S. non-aureus</i>	10	28,10	10,13	0,00	36,00	0,07	0,80
	<i>S. aureus</i>	4	29,50	5,57	24,00	37,00		
	Total	14	28,50	8,86	0,00	37,00		
Pénicilline (P)	<i>S. non-aureus</i>	10	20,00	4,99	12,00	28,00	5,92	0,03
	<i>S. aureus</i>	4	9,75	11,32	0,00	21,00		
	Total	14	17,07	8,36	0,00	28,00		
Gentamicine (HLG)	<i>S. non-aureus</i>	10	35,00	2,98	31,00	38,00	1,90	0,19
	<i>S. aureus</i>	4	32,50	3,32	30,00	37,00		
	Total	14	34,29	3,17	30,00	38,00		
Céfalexine (CN)	<i>S. non-aureus</i>	10	25,10	10,93	0,00	36,00	0,54	0,48
	<i>S. aureus</i>	4	29,25	2,22	27,00	32,00		
	Total	14	26,29	9,36	0,00	36,00		
Spiramycine (SR)	<i>S. non-aureus</i>	10	23,10	8,52	0,00	29,00	3,03	0,11
	<i>S. aureus</i>	4	31,00	4,24	27,00	36,00		
	Total	14	25,36	8,25	0,00	36,00		

3.4.2. Profil global de sensibilité des souches de staphylocoques isolées

S. aureus est une bactérie qui peut développer une évolution adaptative aux antibiotiques mieux que d'autres agents pathogènes car elle a une capacité exclusive à réagir rapidement à chaque nouvel antibiotique par le développement d'un mécanisme de résistance. Cette résistance a commencé vis-à-vis de pénicilline et à la méthicilline et en arrivant aux antibiotiques les plus récents comme le linézolide et la daptomycine (Pantosti *et al.*, 2007). Le tableau 22 montre la sensibilité des souches de staphylocoques isolées vis-à-vis de certains antibiotiques.

Tableau 22. Profil de sensibilité des souches de staphylocoques isolées

Antibiotiques	Valeurs critiques (mm)			Pourcentage (%)		
	R	I	S	R	I	S
Amoxicilline (25 µg/disc)	<	-	≥	-	-	-
Pénicilline G (10 unités/disc)	< 29	-	29 ≥	94%	-	6%
Streptomycine (300 µg/disc)	< 13	13-15	15 ≥	11%	-	89 %
Spiramycine (100 µg/disc)	< 20	-	20 ≥	11 %	-	89 %
Céfalexine (120 µg/disc)	<25	25-30	30 ≥	28 %	28 %	44 %
Gentamicine (120 µg/disc)	< 20	-	20 ≥	-	-	100 %

R : Résistant ; S : Sensible ; I : Intermédiaire

3.4.2.1. Activité des bêta-lactamines

3.4.2.1.1. Amoxicilline

Un diamètre d'inhibition assez important de 26,30 mm et 33,50 mm a été enregistré respectivement sur les souches de staphylocoques non aureus et aureus testées. Cependant, l'interprétation de la sensibilité des souches vis-à-vis de cette molécule n'a pas été effectuée en raison de l'absence des valeurs critiques de référence (les staphylocoques sont considérés depuis longtemps comme germes résistants à l'amoxicilline).

Selon Ouakli *et al.* (2022), les souches de Staphylocoques à coagulase positive (SCP) et notamment *S. aureus* isolées lors de mammites subcliniques chez des vaches en lactation sont résistantes à l'association amoxicilline et acide clavulanique, oxacilline et tétracycline avec des taux de 4,4%, 44,4% et 11,1% respectivement.

Selon Saidi *et al.* (2019), dans une étude effectuée au nord algérien sur les mammites bovines, 80% des souches de *S. aureus* isolées ont été sensibles à l'amoxicilline et 20% étaient résistantes.

Selon, Haydar et Reem Rabie, (2019), les tests d'antibiorésistance ont montré que *S. aureus* a été sensible à l'amoxicilline avec un diamètre de la zone d'inhibition de 9 mm.

Aussi, selon Al-Ashmawy *et al.* (2016), les souches de *S. aureus* isolées du lait et des produits laitiers en Égypte ont montré un taux de résistance à l'amoxicilline évalué à 55,6%.

3.4.2.1.2. Pénicilline

Sur les souches testées, on note un pourcentage de résistance très élevé à la pénicilline (94 %), avec un diamètre d'inhibition moyen de 17,07 mm.

Nos résultats sont similaires à ceux enregistrés par Tamendjari *et al.* (2021) lors d'une étude réalisée sur le lait cru de vache et de chèvre dans les régions de Tiaret et de Souk Ahras en Algérie, pour la recherche de *S. aureus* et la détection du profil d'antibiorésistance, 26,72% des échantillons étaient contaminés par ce germe ayant montré une résistance élevée à la pénicilline (96,77%). En outre, selon Cheng *et al.* (2019), *S. aureus* isolé lors de mammite bovine été résistant aussi bien à la pénicilline (66%) qu'aux combinaisons clindamycine-céfalexine-tétracycline ou enrofloxacin-céfalexine-pénicilline (27%).

Selon Achek *et al.* (2018), toutes les souches de *S. aureus* isolées de différentes denrées alimentaires étaient résistantes à la pénicilline et 45,5% d'entre elles étaient résistantes à la tétracycline.

Aussi, le test de sensibilité des germes isolés lors de mammite bovine réalisé par Baumgartner *et al.* (2018) a révélé une résistance de *S. aureus* à la pénicilline à 65% pour les échantillons de lait isolés des fermes de la République tchèque. Toutefois, cette bactérie a montré une sensibilité à 89% à la pénicilline pour les échantillons de lait isolés des fermes laitières d'Autriche. De même, Bolte *et al.* (2020) ont observé une sensibilité à la pénicilline des souches de *S. aureus* isolées lors de mammites bovines à partir de 20 fermes laitières (12 allemandes et 8 danoises) avec des CMI 90 de 0,5 µg/mL et ≤0,06 µg/mL pour les isolats des fermes allemandes et danoises respectivement.

3.4.2.1.3. Céfalexine

On remarque une moindre activité de la Céfalexine sur les souches testées, mais elle restait, dans l'ensemble, efficace sur 44 % des staphylocoques. En revanche, des souches intermédiaires et résistantes à cette molécule ont été observées avec un

pourcentage relatif de 28 % pour chacune des souches, I et R. Une moyenne du diamètre de la zone d'inhibition de 26,29 mm a été enregistrée.

Selon, Wald *et al.* (2019), les tests de résistance des staphylocoques aux antimicrobiens ont démontré qu'aucun isolat de terrain de *S. aureus* lors de mammites bovines n'était résistant à la kanamycine et la céfalexine, par contre ils étaient majoritairement sensibles au céfopérazone (90%), à la pénicilline (90%) et à l'oxacilline (98%).

De plus, selon Haydar et Reem Rabie, (2019), toutes les souches de *S. aureus* isolées lors de mammites bovines ont montré une sensibilité à la céfalexine avec un diamètre de la zone d'inhibition de 8 mm.

3.4.2.1.4. Activité de la Streptomycine (famille des aminosides)

La streptomycine a montré une bonne activité avec un pourcentage de sensibilité de 89 %. La zone d'inhibition de la croissance des staphylocoques a été caractérisée par un diamètre de 28,10 mm et de 29,50 mm pour les souches non aureus et aureus respectivement.

Nos résultats sont similaires à ceux notés par Sumon *et al.* (2018), où tous les isolats de *S. aureus* obtenus lors de mammites subcliniques chez des vaches laitières étaient très sensibles à la streptomycine (100%), à la gentamycine (100%), à la pénicilline (100%) et à l'amoxicilline (100%).

Cependant nos résultats sont contraires à ceux enregistrés par Zaatout *et al.* (2019) en Algérie, où toutes les souches de *S. aureus* isolées étaient résistantes à la streptomycine et à la pénicilline (100%), et par Holko *et al.* (2019) en Slovaquie qui ont trouvé que 44,6% des souches de *S. aureus* isolées lors de mammites bovines étaient résistantes à la streptomycine.

3.4.2.1.5. Activité de la Spiramycine (famille des macrolides)

Un taux de 89 % des souches testées était sensible à la Spiramycine alors que 11 % ont affiché une résistance. Une moyenne de 25,36 mm du diamètre de la zone d'inhibition a été enregistrée.

Nos résultats sont proches à ceux enregistrés dans une étude réalisée dans la région de Batna (est algérien) sur le profil d'antibiorésistance des bactéries isolées lors de mammites subcliniques des vaches laitières, où toutes les souches de *S. aureus* isolées étaient

sensibles à la streptomycine (100%) alors que 75% étaient sensibles à la Spiramycine (Mamache *et al.*, 2011).

Par contre, dans une autre étude réalisée par Monistero *et al.* (2020) sur la sensibilité phénotypique aux antimicrobiens et la survenue de gènes de résistance chez *S. aureus* isolé lors de mammites dans 6 pays (Argentine, Brésil, Allemagne, Italie, États-Unis, et Afrique de Sud), ce germe a exprimé une résistance notable où 53,8% des isolats n'ont pas été inhibés par une gamme de concentrations testées de Spiramycine, lequel a révélé le taux de résistance le plus élevé.

3.4.2.1.6. Activité de la Gentamicine (famille des aminoglycosides)

Une très bonne activité de la gentamicine a été enregistrée sur les souches de staphylocoques testées avec un pourcentage de sensibilité égal à 100 %. Aucune souche résistante à cette molécule n'a été détectée. Toutefois, les diamètres des zones d'inhibitions ont varié de 32,50 mm pour les souches aureus à 35,00 mm pour les souches non aureus. Similairement, dans des étude menée au nord Algérien (Mamache *et al.*, 2011; Matallah *et al.*, 2019; Saidi *et al.*, 2019), les auteurs ont notés que toutes les souches de *S. aureus* isolées étaient sensibles à la gentamicine (100%).

3.5. Évaluation de l'activité antimicrobienne des HE

Les effets des différentes huiles essentielles sur les souches bactériennes cliniques et de référence du genre *Staphylococcus* sont exprimés par les diamètres des zones d'inhibition (Tableau 23). Ces derniers montrent que *S. aureus* a été sensible surtout à l'HE de *Thymus munbyanus* avec un diamètre d'inhibition de 41,07 mm, et beaucoup moins sensible à l'HE de *Mentha pulegium* de Constantine avec un diamètre d'inhibition de 12,98 mm.

3.5.1. Huile essentielle d'*Origanum floribundum*

Concernant l'HE d'*O. floribundum*, l'activité inhibitrice sur *S. aureus* a été exprimée par des diamètres des zones d'inhibition variant de 20 à 36 mm avec une moyenne de 28,76 mm, et l'activité inhibitrice sur les autres staphylocoques non aureus a été caractérisée par des diamètres d'inhibition qui ont été compris entre 22 et 38 mm et une moyenne de 30,44 mm de diamètre.

Les recherches concernant l'activité antibactérienne de l'HE essentielle d'*O. floribundum* sont peu abondants étant donné que la plante est endémique d'Algérie, et la plupart des auteurs parlent sur la composition chimique de cette huile.

Selon Kerbouche *et al.* (2015), l'HE d'*O. floribundum* récolté dans la région de Lakhdaria à l'est d'Alger a démontré une activité antibactérienne et inhibitrice importante sur la croissance de la souche de référence de *S. aureus* ATCC 6538 et des diamètres des zones d'inhibition de l'ordre de $79,0 \pm 1,0$ mm. Cette activité ne semble pas stable car, sur la même souche (ATCC 6538), Kerbouche *et al.* (2021), en utilisant l'HE de l'*O. floribundum* de la même région (Lakhdaria, Algérie) ont enregistré une moindre activité antibactérienne avec un diamètre de la zone d'inhibition de $44,1 \pm 1,7$ mm malgré la prédominance de thymol comme composé majoritaire dans les deux cas.

3.5.2. Huile essentielle d'*Origanum vulgare*

Concernant l'HE d'*O. vulgare*, l'activité antibactérienne contre *S. aureus* a été caractérisée par des diamètres des zones d'inhibitions compris entre 25,71 et 58,06 mm avec une moyenne de 37,32 mm. Par contre, l'activité de cette huile contre les autres staphylocoques non aureus a été caractérisée par des diamètres des zones d'inhibition allant de 32,44 à 40,35 mm et ayant une moyenne de 36,60 mm de diamètre.

Selon une étude effectuée dans la région de Guelma en Algérie sur l'activité antibactérienne d'*Origanum vulgare* sur des isolats cliniques de *S. aureus*, l'HE d'origan a démontré une activité antimicrobienne sur les souches cliniques de *S. aureus* avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 9,9 à 31,9 mm (Ounaissia *et al.*, 2019).

Aussi, selon une autre étude menée dans la région d'Annaba (Algérie) sur l'activité antibactérienne de l'HE d'*O. vulgare* sur différents micro-organismes. Cette HE a montré une activité antibactérienne importante sur *S. aureus* ATCC 43300 avec un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 38 mm pour une dilution de $\frac{1}{2}$ de l'HE (Leila *et al.*, 2020).

En outre, selon Rusenova et Parvanov, (2009), cette HE a démontré un effet antibactérien intéressant sur une souche de référence de *S. aureus* similaire à notre souche de référence (ATCC 25923), et dont le diamètre de la zone d'inhibition a été de $30,7 \pm 2,3$ mm.

Ainsi, selon Oliveira *et al.* (2009), l'HE d'*O. vulgare* possède un effet inhibiteur sur la croissance des souches cliniques de *S. aureus* avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 27 à 32 mm.

3.5.3. Huile essentielle de *Thymus munbyanus*

L'huile essentielle de thym a démontré une activité antibactérienne importante sur les souches cliniques et de référence du genre *Staphylococcus*. Les diamètres des zones d'inhibition ont été compris entre 26,64 mm et 71,37mm pour *S. aureus* avec une moyenne de 41,07 mm et entre 28,36 mm et 54,05 mm pour les autres souches non aureus avec une moyenne de 35,89 mm. Nos résultats sont proches de ceux enregistrés par Khadir *et al.* (2013) dans la région de Tlemcen à l'ouest algérien, où ils ont enregistré un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 40 mm lors de l'utilisation de l'huile essentielle de *T. munbyanus* sur la même souche de référence que la nôtre (*S. aureus* ATCC 25923). Le même constat a été fait comparativement à une autre étude réalisée dans la région de Tlemcen (Algérie), où l'HE de *T. munbyanus* a démontré une activité antibactérienne sur *S. aureus* (MRSA) avec un diamètre de la zone d'inhibition de 13.83 ± 0.29 mm (Tefiani *et al.*, 2015). Notre étude s'est portée sur l'espèce *Thymus munbyanus*, une espèce endémique et si on la compare avec les études réalisées sur le *Thym vulgaris*, espèce plus commune, dont son huile essentielle est la plus testée partout dans le monde, on peut rapporter que : Au niveau national, nos résultats sont supérieurs à ceux enregistrés par Zeghad et Merghem, (2013) dans la région de Constantine, où ils ont enregistré des diamètres des zones d'inhibition allant de 10 à 15 mm lors de l'utilisation de l'huile essentielle de *T. vulgaris* récolté dans la même zone d'étude que la nôtre et sur la même souche de référence (*S. aureus* ATCC 25923). Dans une autre étude réalisées dans la région de Djelfa (Algérie), l'HE de *T. vulgaris* a démontré une activité antibactérienne sur *S. aureus* avec un diamètre de la zone d'inhibition de $22,33 \pm 1,15$ mm (Benabed *et al.*, 2017). Au niveau mondial, en Roumanie, l'HE de *T. vulgaris* a démontré une activité antimicrobienne importante sur trois souches de *S. aureus*, dont une souche de référence (ATCC 25923) et deux souches cliniques en donnant des diamètres d'inhibition de 40 mm, 34 mm et 26 mm respectivement (Lakis *et al.* 2012). En outre, au Liban, à des dilutions de 20% et 30%, l'huile essentielle de *T. vulgaris* a démontré une activité antibactérienne importante sur des souches de staphylocoques isolées lors de mammites bovines, avec des diamètres des zones d'inhibition supérieurs à 20 mm (Abboud *et al.*, 2015).

3.5.4. Huile essentielle de *Mentha pulegium*

Les HE de *M. pulegium* de Constantine et d'El-Tarf ont démontré des activités inhibitrices sur la croissance des staphylocoques testées. Cependant, l'HE de menthe d'El-Tarf a

démontré un effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus* plus important que celui enregistré pour l'huile de Constantine, avec des diamètres des zones d'inhibition moyennes de 16,80 mm et 12,98 mm respectivement. Cette différence dans l'action de ces deux huiles a été également observée sur la croissance des staphylocoques non-aureus (un DI moyen de 14,98 mm pour la menthe d'El-Tarf contre 11,17 mm pour celui de l'huile de Constantine).

Nos résultats sont légèrement inférieurs à ceux enregistrés par Abdelli *et al.* (2016) dans la région de Bouira (Algérie), où l'HE de *M. pulegium* a démontré une activité inhibitrice sur la croissance de *S. aureus* en donnant un diamètre de la zone d'inhibition qui est de l'ordre de 23 ± 1 mm.

Il en est de même pour, Messaoudi *et al.* (2022) dans la région de M'sila (Algérie) qui ont démontré une sensibilité élevée de la souche de référence de *S. aureus* ATCC 6538 à l'HE de *M. pulegium* avec un diamètre de la zone d'inhibition qui est de $37,33 \pm 1,15$ mm.

Cependant, nos résultats sont supérieurs que ceux enregistrés par Benabed *et al.* (2017), où l'HE de *M. pulegium* récolté dans la région de Djelfa (Algérie) a permis d'inhiber la croissance de la souche de référence de *S. aureus* ATCC 25923 avec un diamètre de la zone d'inhibition de $9,22 \pm 1,07$ mm.

Dans l'étude menée par Derwich *et al.* (2010) au Maroc, *S. aureus* était plus sensible à l'HE de menthe où le diamètre de la zone d'inhibition lors de la réalisation de l'aromatogramme a été évalué à 24 mm. Ce diamètre dépasse aussi celui ($21,4 \pm 0,8$ mm) enregistré dans le même pays (Maroc) par Ait ouazzou *et al.* (2012) suite au test d'inhibition de la croissance de *S. aureus* (CECT 239) par l'HE de *M. pulegium*.

Par rapport aux résultats précédemment cités obtenus dans les pays du nord-africain, une meilleur activité biologique de *M. pulegium* *S. aureus* (33 mm) a été enregistrée par Jebali *et al.* (2022) en Tunisie.

Tableau 23. Effet des huiles essentielles de lamiacées sur les souches du genre*Staphylococcus* (Cliniques et ATCC)

	Souches du genre <i>Staphylococcus</i>	N	Diamètre d'inhibition (moyenne)	Écart-type (SD)	Min	Max	ANOVA	
							F	Sig.
Huiles essentielle de <i>Thymus munbyanus</i> de Constantine (TMEO)	<i>S. non-aureus</i>	5	35,89	10,72	28,36	54,05	0,37	0,56
	<i>S. aureus</i>	6	41,07	16,18	26,64	71,37		
	Total	11	38,72	13,57	26,64	71,37		
Huiles essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> de Constantine (OVCEO)	<i>S. non-aureus</i>	5	36,60	3,44	32,44	40,35	0,02	0,90
	<i>S. aureus</i>	6	37,32	11,53	25,71	58,06		
	Total	11	36,99	8,45	25,71	58,06		
Huiles essentielle de <i>Mentha pulegium</i> de Constantine (MCEO)	<i>S. non-aureus</i>	5	11,17	1,61	10,18	14,00	2,03	0,19
	<i>S. aureus</i>	6	12,98	2,41	9,81	16,07		
	Total	11	12,16	2,20	9,81	16,07		
Huiles essentielle de <i>Mentha pulegium</i> d'El-Tarf (MTEO)	<i>S. non-aureus</i>	5	14,98	2,56	11,10	17,93	1,16	0,31
	<i>S. aureus</i>	6	16,80	2,96	12,82	21,41		
	Total	11	15,97	2,81	11,10	21,41		
Huiles essentielle d' <i>Origanum floribundum</i> de Guelma (OFEO)	<i>S. non-aureus</i>	9	30,44	5,81	22,00	38,00	0,19	0,67
	<i>S. aureus</i>	4	28,76	7,72	20,00	36,00		
	Total	13	29,92	6,17	20,00	38,00		

3.6. Comparaison entre les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et antibiotiques contre les souches de *Staphylococcus*

Le tableau 24 montre les résultats de la comparaison entre les effets des HE et des antibiotiques vis-à-vis des différentes souches de staphylocoques testées.

En comparant les différentes moyennes des diamètres d'inhibition, nous constatons que les HE de *Thymus munbyanus* et d'*Origanum vulgare* ont des diamètres de la zone d'inhibition (38,72 mm et 37,73 mm respectivement) supérieurs à ceux des antibiotiques testés.

Tableau 24. Comparaison entre les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et antibiotiques contre les souches de *Staphylococcus*

	Huiles essentielles					Antibiotiques					
	TM	OVC	MC	MT	OF	AMOX	HLS	P	HLG	CN	SR
N	11	10	11	11	15	19	19	19	19	19	19
DI (Moyenne)	38,72	37,73	12,16	15,97	29,67	29,53	26,95	17,58	33,89	26,21	24,68
SD	13,57	8,52	2,20	2,81	7,33	10,84	10,08	9,56	3,03	10,75	7,98
Min	26,64	25,71	9,81	11,10	16,00	12,00	0,00	0,00	30,00	0,00	0,00
Max	71,37	58,06	16,07	21,41	40,00	45,00	37,00	38,00	38,00	36,00	36,00
Significativité du test de Tukey HSD (Sig.)	TM		0,99	0,00	0,26	0,18	0,02	0,00	0,93	0,01	0,00
	OVC	0,99		0,00	0,47	0,38	0,07	0,00	0,99	0,04	0,01
	MC	0,00	0,00		0,99	0,00	0,00	0,87	0,00	0,00	0,01
	MT	0,00	0,00	0,99		0,01	0,00	0,04	0,99	0,00	0,08
	OF	0,26	0,47	0,00	0,01		0,99	0,99	0,00	0,95	0,99
	AMOX	0,18	0,38	0,00	0,00	0,99		0,99	0,00	0,91	0,99
	HLS	0,02	0,07	0,00	0,04	0,99	0,99		0,05	0,35	0,99
	P	0,00	0,00	0,87	0,99	0,00	0,00	0,05		0,00	0,09
	HLG	0,93	0,99	0,00	0,00	0,95	0,91	0,35	0,00		0,21
	CN	0,01	0,04	0,00	0,08	0,99	0,99	0,99	0,09	0,21	
	SR	0,00	0,01	0,01	0,25	0,86	0,83	0,99	0,31	0,05	0,99

TM: *Thymus munbyanus*; OVC: *Origanum vulgare* de Constantine; MC: Menthe de Constantine; MT: Menthe d'El Tarf; OF: *Origanum floribundum*; AMOX : Amoxicilline (25 µg/disc) ; HLS : Streptomycine (300 µg/disc) ; P : Pénicilline G (10 unités/disc) ; HLG : Gentamicine (120 µg/disc) ; CN : Céfalexine (120 µg/disc) ; SR : Spiramycine (100 µg/disc)

3.7. Concentrations minimales inhibitrices

La figure ci-dessous montre les concentrations minimales inhibitrices de la croissance des différentes souches (cliniques et de référence) de staphylocoques étudiées pour les quatre huiles essentielles testées, à savoir, l'HE de thym, de menthe et d'origan (*vulgare* et *floribundum*). Les CMI les plus élevées ont été obtenues pour l'HE de menthe sur les deux souches de référence *S. aureus* ATCC 25913 et ATCC 700699 avec une CMI de 0,25% pour les deux souches. La CMI la plus basse a été obtenue pour l'HE d'origan sur la souche clinique de *S. aureus* de Souk Ahras n°1 (0,010%).

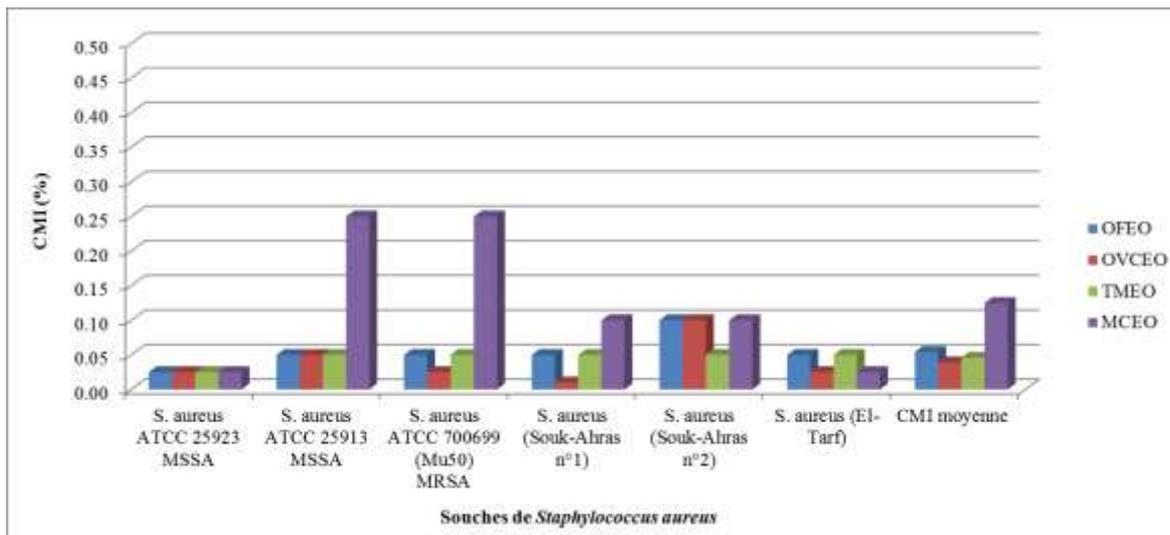


Figure 36. Concentration minimale inhibitrice de la croissance de *Staphylococcus aureus* des différentes huiles essentielles des lamiacées

3.7.1. Huile essentielle d'*Origanum floribundum*

Concernant l'HE d'*O. floribundum*, la croissance des différentes souches (cliniques et de référence) de staphylocoques a été inhibée à concentration minimale inhibitrice moyenne de l'ordre de 0,054%. Bien que cette concentration diffère entre les souches de 0,025 à 0,1%. La CMI la plus élevée (0,1%) a été relevée pour la souche clinique de Souk Ahras n°2, alors que celle la plus basse (0,025%) a été enregistrée pour la souche de référence ATCC 25923. Concernant les autres souches de *S. aureus* (ATCC 25913, ATCC 700699), une concentration de 0,05% a été relevée pour Souk Ahras (n°1) et la souche clinique d'El-Tarf.

Selon Kerbouche *et al.* (2021), l'HE d'*O. floribundum* a permis d'inhiber la croissance de *S. aureus* à une CMI plus élevée de 0,5 µl/ml.

3.7.2. Huile essentielle d'*Origanum vulgare*

Concernant l'HE d'*O. vulgare*, les résultats montrent que cette huile est capable d'inhiber la croissance des souches de staphylocoques (cliniques et de référence) testées à une concentration minimale inhibitrice moyenne de 0,039%. Toutefois, cette concentration varie de 0,01 à 0,1% en fonction des souches, où la CMI la plus basse a été obtenue pour la souche de Souk Ahras n°1 (0,01%) alors que la plus élevée a été obtenue pour la souche de Souk Ahras n°2 (0,1%).

Selon Ounaissia *et al.* (2019), l'HE d'*O. vulgare* collecté dans la région de Guelma a démontré une action inhibitrice sur la croissance des souches cliniques de *S. aureus* à une CMI comprise entre 0,314 et 0,628 mg/ml.

Aussi, selon une étude réalisée en Égypte sur l'activité antimicrobienne d'*Origanum vulgare* contre 11 micro-organismes différents, *S. aureus* a été le germe le plus sensible à l'HE et sa croissance a été inhibée à une CMI de 1,18 mg/ml (Fikry *et al.*, 2019).

Au cours d'une étude effectuée par Žitek *et al.* (2021) sur l'activité antibactérienne de l'HE d'*Origanum vulgare* sur une souche de référence de *S. aureus* ATCC 25923 similaire à la nôtre, il a été démontré une activité inhibitrice de l'origan sur la croissance de cette bactérie à une CMI de 0,147 mg/ml.

En outre, selon l'étude menée par Arámbula *et al.* (2019), l'HE d'*Origanum vulgare* utilisée arrête la croissance totale de *S. aureus* à une CMI de 15,62 mg/ml.

3.7.3. Huile essentielle de *Thymus munbyanus*

Les résultats de l'aromatogramme montrent que l'HE de *T. munbyanus* a permis d'inhiber la croissance des différentes souches de *S. aureus* à une CMI moyenne de 0,046%. Cependant, la majorité des souches ont été inhibées à une CMI de 0,05% à l'exception de la souche de référence ATCC 25923 qui a été inhibée à une CMI de 0,025%.

Selon Khadir *et al.* (2013), l'HE de *Thymus munbyanus* collecté dans la région de Tlemcen (Algérie) a montré une activité inhibitrice sur la croissance de *S. aureus* MSSA 25923 à une CMI de 0,25% (Khadir *et al.*, 2013).

Au Maroc, l'HE de *T. munbyanus* a montré une activité bactéricide vis-à-vis de *S. aureus* à une concentration minimale équivalente à 0,125 v/v (Moukhles *et al.*, 2018).

Etant donné que l'espèce de *Thymus munbyanus* est endémique au nord-africain (Algérie et Maroc), les études ayant traité les effets antibactériens de cette espèce vis-à-vis de *S. aureus* ou d'autres bactéries sont très limitées, et la majorité des travaux publiés concernent particulièrement la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce de thym.

3.7.4. Huile essentielle de *Mentha pulegium*

Les résultats de l'aromatogramme pour l'HE de *M. pulegium* montrent que cette huile a permis d'inhiber la croissance des staphylocoques à une CMI moyenne de 0,125%. Bien

que cette concentration varie selon les souches, d'une concentration minimale de 0,025 à une concentration de 0,250%.

La CMI la plus élevée (0,250%) a été enregistrée pour les deux souches de référence ATCC 25913 et ATCC 700699, tandis que la plus basse (0,025%) a été enregistrée pour la souche de référence ATCC 25923 et pour la souche clinique d'El-Tarf. Une concentration de 0,10% a été relevée pour les deux souches cliniques de Souk Ahras n°1 et n°2.

Selon Baali *et al.* (2022), qui ont étudié les effets antioxydants, antibactériens et cicatrisant de l'HE de *M. pulegium* collecté dans la région de M'sila (Algérie), l'HE de menthe pouliot a montré une activité inhibitrice importante sur la croissance des souches cliniques et de référence de *S. aureus*. La CMI la plus basse obtenue pour la souche de référence *S. aureus* ATCC 6538 était entre 0,078 et 0,15 mg/ml.

Selon Messaoudi *et al.* (2022), la croissance de *S. aureus* a été inhibée à une CMI de l'HE de *M. pulegium* de la région de M'sila (Algérie) de 1µl/ml.

En outre, Abdelli *et al.* (2016) ont trouvé que l'HE de menthe pouliot de la région de Bouira (Algérie) exerce une action inhibitrice sur la croissance de *S. aureus* à une CMI de 1,25 µl/ml et une CMB de 2,5 µl/ml.

Cependant, Selon Jebali *et al.* (2022), l'HE de *M. pulegium* collecté en Tunisie dans deux régions différentes (Bizerte et Kef) a permis d'inhiber la croissance de *S. aureus* à une CMI de 40 et 160 µg/ml respectivement.

Aussi, au Maroc, la CMI de menthe qui permis d'inhiber toute croissance de *S. aureus* a été de 0,12 mg/ml (Derwich *et al.*, 2010). Cette concentration dépasse largement celle obtenue récemment (1,406 µg/ml) par Aimad *et al.* (2021) dans le même pays.

4. Conclusion

Cette étude réalisée afin d'étudier pour tester l'effet antibactérien de quatre huiles essentielles (*Origanum floribundum*, *Origanum vulgare*, *Thymus* et *Mentha*) et de certains antibiotiques sur des bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* impliquées dans les mammites chez les vaches laitières, a permis de constater un effet antimicrobien des huiles essentielles sur les bactéries testées avec un effet plus prépondérant pour l'HE de *Thymus munbyanus* et d'*Origanum vulgare* permettant d'inhiber la croissance de *S. aureus*.

Ainsi, l'huile essentielle de *Thymus munbyanus* a permis d'inhiber la croissance des souches de staphylocoques testées en donnant un diamètre de la zone d'inhibition supérieur à celui provoqué par tous les antibiotiques testés.

Par conséquent, et à cause des résistances bactériennes aux antibiotiques qui deviennent de plus en plus inquiétantes, les huiles essentielle de lamiacées (*Thymus* et *Origanum*) constituent une alternative intéressante aux antibiotiques pour le traitement des mammites bovines staphylococciques et toutes les infections dont ces bactéries sont incriminées.

CHAPITRE III : Essai *in vivo* des huiles essentielles d'*Origanum* dans le traitement des mammites chez la vache laitière

1. Introduction

Les mammites des sont les affections les plus répandues dans les élevages de bovins laitiers dans tous les pays du monde, et le contrôle de cette pathologie passe par l'utilisation des antibiotiques. Cependant, la forte utilisation des antibiotiques pose actuellement d'énormes problèmes d'antibiorésistance et de résidus d'antibiotiques dans le lait. Dans ce même sens, nous avons essayé de tester l'effet des huiles essentielles d'une plante aromatique qui est l'*Origanum* sur les mammites des vaches laitières.

2. Matériel et méthodes

2.1. Origine de l'huile essentielle

L'huile essentielle utilisée dans cette étude a été obtenue après extraction à la vapeur d'eau des parties aériennes séchées (feuilles et fleurs) d'*Origanum vulgare subsp. Glandulosum (desf.)*, une plante médicinale aromatique endémique de l'Algérie (Sari *et al.*, 2006). Le matériel végétal a été récolté en pleine période de floraison en juin 2019 dans les montagnes de Amoucha situées dans la province de Sétif à l'est de l'Algérie. L'identification taxonomique du spécimen d'origan a été réalisée par le Dr Samia LAKEHEL de l'université de Badji Mokhtar de Annaba, Algérie.

2.2. Caractérisation de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* utilisée dans l'essai clinique

La composition chimique de l'huile essentielle d'origan utilisée dans l'essai clinique a été identifiée par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG-SM). Les analyses chromatographiques ont été réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse HP 6890 couplé à un spectromètre de masse HP 5973 (Agilent, CA, USA) en utilisant une colonne capillaire HP-5MS (30 m × 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm).

Les spectres CG-SM ont été obtenus en utilisant les conditions suivantes :

Le volume d'huile essentielle injecté était de 1 µl en mode splitless ; la température d'injection était de 250°C; l'hélium était le gaz porteur à un débit de 0,5 ml/min ; programme de température du four (60°C pendant 8 min, augmenté à raison de 2°C/min

jusqu'à 250°C, puis maintenu à 250°C pendant 10 min). La base de données du spectre de masse utilisée pour l'identification des composants d'huile essentielle était Wiley 7N et NIST 02 (National Institute of Standards and Technology, USA).

2.3. Efficacité in vitro de plusieurs dilutions d'huiles essentielles d'origan sur des souches témoins de référence

Afin d'évaluer l'efficacité de l'huile essentielle d'origan à inhiber la croissance des bactéries, des souches de référence témoins ont été utilisées. Les souches utilisées sont *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 (Mu50) appliqué à la découverte de médicaments a été utilisé comme contrôle de référence pour les souches résistantes à la méthicilline (SARM), et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 appliqué à l'examen des produits laitiers et des tests de sensibilité au disque ont été impliqués pour contrôler les souches sensibles à la méthicilline (MSSA). Elles ont été cultivées après étalement sur la gélose Chapman et ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Après leur croissance, quelques colonies bactériennes bien isolées ont été prélevées et diluées dans du sérum physiologique stérile, puis homogénéisées jusqu'à l'obtention d'une opacité équivalente à 0,5 unité de l'échelle McFarland. Ensuite, 1 mL de l'inoculum a été déposée et ensemencée sur toute la surface de la gélose Mueller Hinton (MH) préalablement versée dans une boîte de Pétri.

La sensibilité des souches de référence à l'huile essentielle d'origan (HEO) a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (aromatogramme). Cette HEO a été diluée dans une huile végétale (HV) (utilisée à la fois pour les tests *in vitro* et *in vivo*) aux concentrations habituelles (1%), recommandées (5%) et doubles recommandées (10%) pour les applications topiques (Franchomme *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2015). A cet effet, des disques de papier de 6 mm de diamètre imprégnés de 10 µl de chacune des trois doses mentionnées ci-dessus (1%, 5% et 10%) ont été utilisés selon la méthode de diffusion de disque sur milieu gélosé pour l'évaluation de l'activité des agents antimicrobiens topiques comme décrit par Glasser *et al.* (2010).

L'expérimentation a été répétée pour plusieurs doses et les données ont été présentées sous forme de moyenne et de plage des diamètres de la zone d'inhibition. Une valeur seuil de 8 mm a été utilisée pour classer les bactéries testées comme sensibles à l'agent antimicrobien topique (Holder et Boyce, 1994). De plus, le diluant de l'huile végétale seule sans l'huile essentielle d'origan a été utilisé comme contrôle positif. Un disque imprégné de 10 µl d'huile végétale pure (100%) a été appliqué sur la gélose MH pour vérifier la sensibilité

des souches testées au véhicule de l'huile essentielle. En outre, un test de contrôle de la diffusion a été réalisé en utilisant du diméthylsulfoxyde (DMSO) comme véhicule de l'huile essentielle aux mêmes concentrations testées.

2.4. Essai *in vivo* de l'huile essentielle d'*Origan*

2.4.1. Zone d'étude

L'essai clinique a été réalisé en mars 2020 dans une ferme laitière pilote située dans la province de Constantine (Figure 25) au nord-est de l'Algérie ($36^{\circ} 16' 17,1''$ N $6^{\circ} 40' 11,9''$ E). Cette ferme a été choisie en fonction de son prévalence en mammites subcliniques que nous avons précédemment évaluée (Hamlaoui *et al.*, 2019).



Figure 37. Localisation de la zone d'étude dans la wilaya de Constantine (Commune d'El Khroub).

2.4.2. Animaux

Les vaches ayant participé à l'étude ont été sélectionnées sur la base de leurs scores au test du CMT (California Mastitis Test). Ces femelles sont de race Prim'Holstein, et sont âgées de deux (02) à six (06) ans, et ont été en lactation (période post-partum) et non gestantes. Elles n'avaient auparavant reçues aucun traitement à base d'antibiotiques.

2.4.3. Dose de l'huile essentielle

Chez les vaches sélectionnées, la dose recommandée de la solution huileuse d'origan à usage topique (5%) (Franchomme *et al.*, 2001) a été appliquée deux fois par jour, après la traite du matin et celle du soir, par massage cutané sur les quartiers sélectionnés pendant trois jours consécutifs.



Figure 38. Application de l'HE d'origan par massage cutané mammaire (Originale, 2021).

2.4.4. Échantillonnage

Au total, 20 échantillons de lait cru ont été prélevés individuellement sur 10 quartiers mammaires, 05 atteints (score de cellules somatiques élevé) et 05 sains (score de cellules somatiques normal). Ils ont été prélevés sur deux reprises, 10 échantillons avant l'application de l'huile essentielle d'origan (j0) et 10 échantillons 03 jours après son application (j4), en gardant à chaque fois les mêmes quartiers de provenance pour chaque échantillon. Les prélèvements ont été effectués de manière aseptique, en respectant les règles d'hygiène requises pour les analyses microbiologiques, dans des tubes stériles étiquetés avec des codes liant l'échantillon au quartier mammaire d'origine. Les échantillons ont été conservés au froid jusqu'à l'acheminement au laboratoire d'analyse et de contrôle de qualité.

2.5. Analyse du lait cru

2.5.1. Test du CMT (California Mastitis Test)

Pour cibler le quartier du lait individuel avec des cellules somatiques, le test du CMT pour la détection des mammites subcliniques a été réalisé avant la traite du matin, avant l'application de l'huile essentielle et à la fin de l'essai. Des scores CMT allant de 0 (négatif) à 4 (fortement positif) ont été enregistrés selon l'interprétation des résultats des tests décrite par Levesque, (2004).

2.5.2. Analyses microbiologiques :

Des analyses microbiologiques répétées (n=5 unités) ont été réalisées pour chaque échantillon dans un laboratoire de contrôle de qualité en suivant les techniques décrites dans le journal officiel de la république algérienne pour le dénombrement de :

- La flore mésophile aérobie totale à 30°C (FMAT) : sur milieu agar, avec incubation à 30°C pendant 72 heures.
- Les staphylocoques à coagulase positive (SCP) en étalant 1 ml de lait cru sur la gélose Baird Parker avec incubation à 37± 1°C pendant 24 à 48 heures.
- Les coliformes thermotolérants : en utilisant la gélose lactosée avec incubation à 30 ± 1°C pendant 24± 2 heures.
- Salmonella : sur la gélose Hektoen avec conservation à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- *Listeria monocytogenes* : avec la gélose Oxford, l'incubation a été réalisée à 37°C pendant 18 à 24 heures.

2.6. Analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel IBM SPSS statistics 26. La comparaison des valeurs cytologiques et microbiologiques avec les critères standards acceptés a été faite par un test « t » de Student. Le test Z utilisant la correction de Bonferroni a été réalisé pour comparer la prévalence entre les catégories des groupes constitués selon les niveaux de FMAT et de SCP et le moment du traitement (avant ou après).

Le modèle linéaire a été appliqué pour mettre en évidence l'effet fixe du facteur temps reflétant les effets de l'huile essentielle d'origan sur la cytologie (score du CMT et ASC) et des paramètres microbiologiques (nombre de bactéries et proportion dans la flore

mésophile totale). Ces paramètres ont été considérés comme des variables dépendantes. De plus, le test t de comparaison par paires a été utilisé pour comparer les résultats des quartiers affectés et sains avant et après le traitement. Un seuil de significativité de 0.05 a été retenu pour tous les tests.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation de l'huile essentielle d'Origan

Les résultats de l'analyse chromatographique (Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse) de l'huile essentielle d'origan ont montré que le carvacrol était le composé majoritaire de notre huile (39,27%) suivi du thymol avec un pourcentage de 25,83% (Tableau 25 et figure 39). Cette composition est similaire à celles reportées dans d'autres études ultérieures réalisées dans la région de Sétif (même zone de provenance de notre huile essentielle) sur la même espèce *O. vulgare L. subsp. Glandulosum*, et qui ont montré la présence de 04 composés majeurs, Thymol, Carvacrol, p-cymène et γ -terpinène avec la majorité des échantillons appartenant aux deux chémotypes, carvacrol et/ou thymol (Sari *et al.*, 2006; Khalfi *et al.*, 2008). La prédominance du carvacrol enregistrée a été décrite dans une étude récente sur des échantillons de la même espèce collectés dans la région de Bougaa à Sétif avec un pourcentage de 26,29% (Ali *et al.*, 2020). Compte tenu du caractère endémique de cette plante en Afrique du Nord, une étude dans la Phyto-région méditerranéenne, au Nord-Est de la Tunisie, a montré que le carvacrol avec une valeur allant de 61,08 à 83,37 % était également le composé principal de cette espèce d'origanum (Béjaoui *et al.*, 2013). En revanche, dans la même région, d'après les données publiées en 2020 (Nabti *et al.*, 2020), le carvacrol était présent en faible pourcentage (2,8%) avec le thymol comme chémotype (56,3%) dans la composition chimique de l'huile extraite de la même espèce. Cependant, ces auteurs (Nabti *et al.*, 2020) ont trouvé une dominance du carvacrol (59,6%) dans une région limitrophe de la nôtre (Bordj-Bou Arreridj) pour l'huile de l'espèce étudiée.

3.2. Effet *in vitro* de l'huile essentielle d'origan sur des souches témoins de référence

Les résultats de l'aromatogramme (Tableau 26) ont montré que les diamètres d'inhibition les plus élevés ont été obtenus avec la solubilisation de l'huile essentielle dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour les deux souches ATCC MU 50 et ATCC 25923, pour

une concentration de 10 % avec un diamètre d'inhibition de 31,72 mm et 17,42 mm respectivement.

L'efficacité de cette huile sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été également trouvée par Bouhaddouda *et al.* (2016) qui ont obtenu un diamètre d'inhibition élevé de $51,83 \pm 2,56$ mm en utilisant 5 μ l d'huile essentielle non diluée d'*O. vulgare* L. *ssp. glandulosum* (Desf.) Ietswaart collecté dans la province de Guelma (nord-est de l'Algérie) avec du para-cymène (25,615%), du thymol (23,129%) et du carvacrol (20,321%) comme composants principaux en utilisant la méthode de diffusion du disque sur gélose.

Il apparaît que l'efficacité de l'huile essentielle est dépendante de la capacité de diffusion du véhicule (DMSO ou huile végétale). Pour les deux véhicules, les souches MRSA étaient plus sensibles à l'HE d'origan que la souche MSSA avec un plus grand diamètre obtenu à une concentration de 10 %. La concentration de 5% semblait être la dilution limite parmi celles testées permettant un effet inhibiteur.

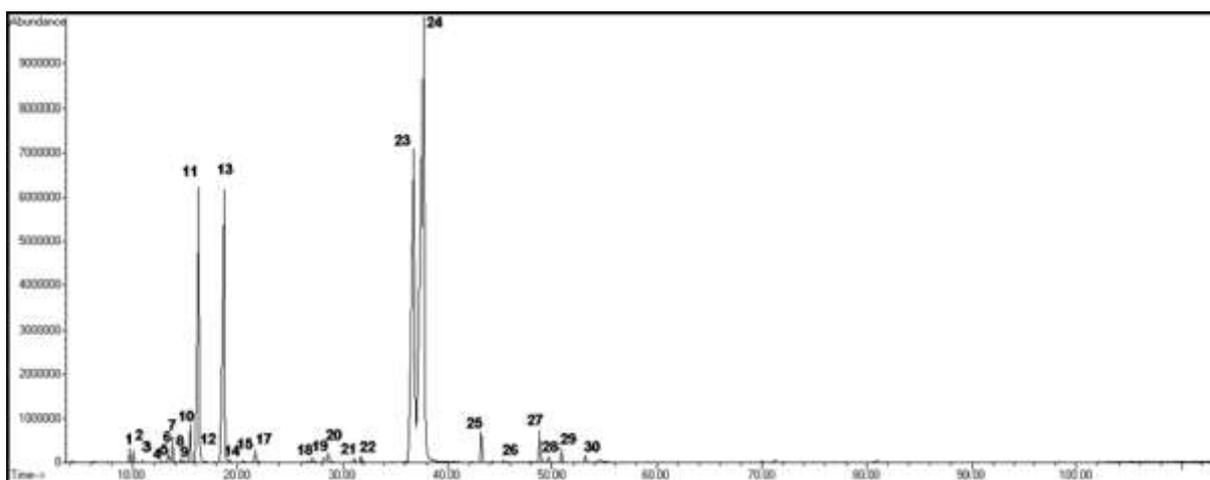


Figure 39. CPG-SM et pics des différents composés de l'huile essentielle d'origan

Tableau 25. Composition chimique de l'huile essentielle d'origan testée.

N° Pic	Composés	Temps de rétention (min)	Zone de pic percentage (%)
1	β -Thujene	9,72	0,31
2	α -Pinene	10,10	0,29
3	Camphene	10,96	0,04
4	β -Pinene	12,69	0,06
5	Octen-3-ol	13,33	0,26
6	3-Heptanone	13,49	0,17
7	β -Myrcene	13,77	0,72
8	α -Phellandrene	14,57	0,11
9	3-Carene	14,92	0,04
10	α -Terpinene	15,45	1,27
11	p-Cymene	16,29	12,27
12	D-Limonene	16,39	0,68
13	γ -Terpinene	18,74	13,58
14	2-Hepten-4-ol	19,23	0,08
15	(+)-4-Carene	20,49	0,05
16	nd	21,48	0,03
17	Linalool	21,73	0,51
18	Terpinen-4-ol	27,11	0,25
19	α -Terpineol	28,25	0,15
20	Estragole	28,65	0,31
21	Thymol methyl ether	31,11	0,13
22	Isothymol methyl ether	31,74	0,24
23	Thymol	36,80	25,83
24	Carvacrol	37,72	39,27
25	Caryophyllene	43,20	1,11
26	α -Caryophyllene	45,31	0,03
27	β -Bisabolene	48,84	1,01
28	β -Sesquiphellandrene	49,68	0,22
29	α -Bisabolene (Z)	50,81	0,41
30	Caryophyllene oxide	53,11	0,28
	Not-identified compounds		2,7
	Total identified compounds		97,30

Aucun disque témoin imprégné de l'huile végétale seule n'a inhibé la croissance des deux souches de référence. Concernant le seuil de sensibilité de 8 mm utilisé pour tester l'effet antimicrobien des solutions à usage topique (Holder et Boyce, 1994), l'effet inhibiteur n'a été obtenu qu'avec l'huile essentielle d'origan diluée à 10 % dans l'huile végétale.

La sensibilité de la souche ATCC 700699 à l'huile essentielle d'*origanum vulgare* diluée à 10% a été également trouvée dans une étude récente de Cabrera-Contreras *et al.* (2020). Ces auteurs ont noté l'absence de croissance de cette souche (SARM) lorsqu'elle a été ensemencée sur milieu de culture en mélange avec de l'huile essentielle non diluée ou diluée dans de l'huile de coco à 10 %, 1 %, 0,5 % et 0,25 % (Cabrera-Contreras *et al.*, 2020). Cependant, ce test d'activité antibactérienne adopté, qui est différent de notre méthode de diffusion sur gélose, n'a pas permis de calculer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre d'inhibition.

Tableau 26. Effet inhibiteur de l'huile essentielle d'origan sur les souches témoins de référence à plusieurs dilutions

Souches de référence	Véhicule d'HEO	Diamètre (mm) d'inhibition (moyenne ± SD) des dilutions de l'HEO		
		1%	5%	10%
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 700699™)	HV	3,65 ± 5,16	7,03 ± 0,06	8,84 ± 0,21*
	DMSO	9,22	25,91	31,72
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™)	HV	3,13 ± 4,43	7,36 ± 0,02	8,37 ± 0,83*
	DMSO	7,31	8,58	17,42

* Présence d'un effet inhibiteur de l'huile essentielle sur les souches de références,

DMSO : Diméthyl sulfoide, HV : Huile végétale

L'utilisation de la méthode de dilution en milieu gélosé a permis à Nostro *et al.* (2004) pour confirmer la sensibilité des souches MRSA et MSSA, y compris ATCC 25923, à l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* au thymol (24%) et au carvacrol (14%). Leur CMI était de 0.125 après dilution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Les résultats des tests *in vitro* sont en accord avec ceux des auteurs mentionnés ci-dessus et confirment l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle d'origan contre les souches témoins. Pour une évaluation plus poussée *in vitro* de l'efficacité d'une solution topique ou d'une pommade contenant de l'huile essentielle, nous suggérons que le choix de la valeur seuil du diamètre d'inhibition prenne en considération la nature du diluant, le diamètre du disque ou du puits et la dose à imprégner sur le disque ou à déposer dans le puits.

3.3. Qualité microbiologique des échantillons du lait cru

Le présent essai a révélé la présence de mammites subcliniques détectées par le test du CMT sans la présence à des niveaux critiques d'agents pathogènes majeurs souvent recherchés dans le contrôle de qualité. Ces résultats sont probablement l'expression de dommages dus aux germes mineurs qui n'ont pas fait l'objet de ce contrôle. Ceux-ci sont principalement représentés par les staphylocoques à coagulase négative (SCN) (par exemple *Staphylococcus chromogenes*) qui provoquent une augmentation des concentrations des cellules somatiques (CCS) mais qui n'ont pas d'effet sur la composition et la production du lait (Pyörälä et Taponen, 2009; Tomazi *et al.*, 2015).

Ces résultats ont également été cités par Bradley *et al.* (2007) en Grande-Bretagne et au Pays de Galles qui ont trouvé l'absence d'agents pathogènes majeurs dans 39 % des échantillons provenant d'une mammité subclinique et par Sampimon *et al.* (2009) aux Pays-Bas avec une incidence de 20,8 % dans des échantillons de lait avec un nombre élevé de cellules somatiques supérieur à 250 000 cellules/ml.

Dans la présente étude, la numération des cellules somatiques a été subjectivement évaluée par le test du CMT qui ne reflétait pas avec précision l'état de l'immunité cellulaire qui aurait pu être mieux contrôlée si un compteur automatisé avait été utilisé, bien qu'en Algérie la numération cellulaire ne soit pas encore prise en compte dans la réglementation en vigueur comme un critère de contrôle de la qualité du lait cru commercialisé.

L'analyse microbiologique des échantillons du lait cru a montré la présence de bactéries mésophiles aérobies totales (BMAT) et de staphylocoques à coagulase positive (SCP) dans tous les échantillons sans que leur nombre n'atteigne ou dépasse les limites requises par l'état algérien (Ministère algérien du commerce, 2017). Cependant, une absence totale de coliformes, de *Listeria monocytogenese* et de *Salmonella* dans tous les échantillons, que ce soit au début ou à la fin de l'essai, a été notée.

Par rapport aux normes algériennes (Ministère algérien du commerce, 2017), la qualité hygiénique de tous les échantillons du lait analysés été satisfaisante au regard du critère limite de dénombrement des germes pathogènes majeurs indépendamment du moment du prélèvement, avant ou après l'application de l'huile essentielle.

Sur la base des résultats globaux de l'analyse microbiologique (tableau 14), une diminution significative ($P < 0,05$) du nombre de BMAT après trois jours d'application de l'huile essentielle à partir de valeurs comprises entre 10^4 UFC/ml et 10^5 UFC/ml (90 % des

échantillons) à des valeurs comprises entre 10^2 UFC/ml et 10^3 UFC/ml (70 % des échantillons) a été observée.

En accord avec la présente découverte, la supplémentation dans le mélange concentré pour vaches laitières Holstein en bonne santé avec une dose individuelle (2,5 et 5 g/tête/jour) d'une autre espèce d'origan (*O. majorana*), mélangé avec du clou de girofle et du genévrier dans des proportions égales en tant que mélange d'huiles essentielles a amélioré le profil microbien du lait pendant la période du post-traitement par une réduction de 20,7 et 17,9 % du nombre total des bactéries du lait (BMAT), respectivement, par rapport au groupe témoin (Al-Suwaiegh *et al.*, 2020).

Tableau 27. Prévalence des niveaux de numération des bactéries dans les échantillons de lait cru avant et après l'application de l'huile essentielle d'origan.

Bactéries	Comptage des bactéries (CFU/ml)	Prévalence (%) par unité d'échantillons	
		Avant	Après
Total Mesophilic Aerobic Bacteria (TMAB) at 30 °C Limit*: 3×10^5 CFU/ml	$[10^2, 10^3 [$	0 ^a (0/50)	70 ^b (35/50)
	$[10^3, 10^4 [$	10 ^a (5/50)	30 ^b (15/50)
	$[10^4, 10^5 [$	90 ^a (45/50)	0 ^b (0/50)
	$> 10^5$	0 (0/50)	0 (0/50)
Coagulase-positive staphylococci (CPS) Limit*: 100 CFU/ml	Absence	20 ^a (10/50)	40 ^b (20/50)
	$[1, 50]$	62 ^a (31/50)	80 ^a (30/50)
	$]50, 80 [$	10 ^a (5/50)	0 ^b (0/50)
	$[80, 100 [$	8 ^a (4/50)	0 ^b (0/50)
	> 100	0 (0/50)	0 (0/50)
Coliformes thermotolérants Limit*: 5×10^2 CFU/ml	Absence	100 (50/50)	100 (50/50)
<i>Listeria monocytogenes</i> Limit*: 100 CFU/ml	Absence	100 (50/50)	100 (50/50)
<i>Salmonella</i> Limit*: Absence in 25 ml	Absence	100 (50/50)	100 (50/50)

Pour les staphylocoques à coagulase positive, il y a une absence significative dans 40% des échantillons de composants unitaires ($P < 0,05$) après application de l'huile essentielle avec maintien d'une population comptant de 1 UFC/ml à 50 UFC/ml dans 60 % des échantillons avant ou après traitement ($P > 0,05$).

Concernant les autres bactéries (Coliformes, *Listeria* et *Salmonella*), une absence totale de ces bactéries a été observée dans tous les échantillons de lait avant et après l'application de l'huile essentielle. Par conséquent, l'effet de cette huile sur ces germes ne sera pas retenu

pour la suite de la discussion bien que d'autres auteurs (Özkalp *et al.*, 2010) ont observé in vitro une activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan avec des CMI différentes contre *E. coli* (250 µg/ml), *Listeria monocytogenes* (250 µg/ml) et *Salmonella enteritidis* (128 µg/ml).

3.4. Effet in vivo de l'huile essentielle d'origan sur le nombre de bactéries mésophiles aérobies totales (BMAT)

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) avant et après l'application de la solution huileuse montre qu'il y a une diminution significative ($P < 0,001$) du nombre de bactéries dans tous les échantillons du lait prélevés. Ces résultats sont valables à la fois pour les quartiers mammaires affectés et sains qui ont montré des comptages inférieurs à la valeur limite de 3×10^5 UFC/ml (tableau 28). La comparaison du nombre moyen de BMAT montre qu'il y a une diminution significative ($P < 0,01$) de 13920,00 UFC/ml à 649,94 UFC/ml pour le groupe sain et de 17040,00 à 1780,00 UFC/ml pour les quartiers atteints ($P < 0,05$) à la fin de l'essai (tableau 28). Ces changements confirment l'effet significatif ($P < 0,01$) de l'HE sur le nombre moyen global de BMAT de tous les échantillons. Cette importante activité antibactérienne a été testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque sur six souches standards de bactéries Gram-positives et Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*). Ces souches ont montré un degré de sensibilité assez similaire aux huiles essentielles d'*O. vulgare* avec des valeurs de CMI de 31,25 µg/ml à 125,00 µg/ml (Sari *et al.*, 2006). Récemment, l'activité antimicrobienne d'*Origanum vulgare* a été revue par Alagawany *et al.* (2020). Elle a été attribuée à la richesse particulière de son huile en composés phénoliques. Parmi plusieurs composés, le carvacrol, le citral, le thymol et le trans-cinnamaldéhyde étaient efficaces à faible CMI contre la majorité des bactéries causant la mammité (Gupta *et al.*, 2020). Le carvacrol est le principal composé de l'huile utilisée dans notre essai. Il a été connu par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis comme une substance aromatisante sûre lorsqu'il a été utilisé dans ou sur des aliments pour les conserver (Commission européenne, 1999).

Ce composé et le thymol étaient les deux composés phénoliques souvent présents comme composés majeurs dans l'huile d'origan, en particulier celle collectée dans notre zone d'étude comme décrit ci-dessus. Ainsi, l'activité bactéricide du carvacrol a été observée *in vitro* sur plusieurs bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus*

aureus, *Lactobacillus plantarum*, et *Bacillus subtilis*) avec une CMI variant selon les bactéries, de 5 mg par boîte de Pétri pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* à 20mg pour *Lactobacillus plantarum*. Cette activité a été liée à l'hydrophobie et à la structure chimique de ce composé, dont la présence d'un groupe hydroxyle libre et d'un système délocalisé permet l'échange de protons (Ben Arfa *et al.*, 2006).

3.5. Effet in vivo de l'huile essentielle d'origan sur le nombre de staphylocoques à coagulase positive (SCP)

Le comptage des staphylocoques à coagulase positive a montré des valeurs inférieures aux limites autorisées et qui ont diminué après l'application de l'huile essentielle, quel que soit l'état des quartiers, sains ou atteints. Une diminution statistiquement significative n'a été trouvée que pour une unité de l'échantillon ($p = 0,02$). Un effet non significatif ($P > 0,05$) de l'HE d'origan à la fin de l'essai sur le nombre moyen de staphylocoques dans les prélèvements des quartiers sains et atteints a été enregistré (tableau 28) malgré une diminution globale de 34,80 UFC/ml à 18,80 UFC /ml et de 34,00 UFC/ml à 20,80 UFC/ml pour les quartiers sains et atteints respectivement.

L'efficacité de l'HE d'*Origanum vulgare* avec le carvacrol (92 %) a été observée au Brésil (Dal Pozzo *et al.*, 2011) sur des souches à coagulase positive de *Staphylococcus spp* isolées de mammites bovines quel que soit leur profil de résistance aux antibiotiques (tétracycline, pénicilline, érythromycine, ceftiofur, ampicilline, céphalothine et oxacilline) utilisés dans le traitement de la mammites avec des CMI inférieures à celles obtenues avec l'utilisation du composé majoritaire pur carvacrol (99,5 %). Son activité antibactérienne a été démontrée *in vitro* aux États-Unis sur *Staphylococcus aureus* isolé de mammites bovines cliniques avec une CMI de 0,5 % et une concentration minimale bactéricide (CMB) de 1,2 % (Baskaran *et al.*, 2009). À une concentration de 98 %, le carvacrol avait une forte activité antimicrobienne sur *Staphylococcus aureus*, y compris des souches résistantes à la méthicilline (MRSA) isolées du lait de vache de tank avec une CMI de 0,058 à 0,234 mg/ml évaluée par la méthode de microdilution et des zones d'inhibition allant de 19 à 45 mm (Keyvan et Tutun, 2019). Cette sensibilité des souches MRSA au carvacrol explique celle enregistrée par le test de contrôle *in vitro* dans notre étude.

Tableau 28. Prévalence des niveaux de numération des bactéries dans les échantillons de lait cru avant et après l'application de l'huile essentielle d'origan

Variables	Statut des quartiers	Période	Moyenne	SD	Effets fixes temporels	
					F	Sig.
Moyenne FMAT (CFU/ml)	Sain	Avant	13 920,00*	4 520,18	95,14	0,00
		Après	694,00*	320,44		
	Affecté	Avant	17 040,00*	4 879,34		
		Après	1 780,00*	1 463,56		
Moyenne SCP (CFU/ml)	Sain	Avant	34,80*	23,69	2,48	0,13
		Après	18,80*	19,01		
	Affecté	Avant	34,00*	29,02		
		Après	20,80*	19,42		
RATIO SCP/FMAT	Sain	Avant	0,003	0,002	3,23	0,09
		Après	0,057	0,093		
	Affecté	Avant	0,002	0,001		
		Après	0,022	0,031		

3.6. Effet de l'huile essentielle d'origan sur le rapport du nombre de SCP par les BMAT

Aucun changement significatif dans la proportion des staphylocoques par rapport aux BMAT n'a été noté (tableau 28). Cependant, une augmentation des ratios interprétée comme une augmentation de la proportion de staphylocoques par rapport aux BMAT dans les groupes sains et atteints a été enregistrée à la fin de l'expérimentation. L'absence de significativité de l'effet de cette huile sur le ratio global moyen ($P > 0,05$) suggère qu'il n'y a pas eu de changement significatif dans l'équilibre de la flore laitière entre le début et la fin de l'essai (tableau 28). Cette constatation semble s'expliquer par la présence de multiples facteurs déterminant le nombre de SCP et leur proportion dans la flore laitière. Des enquêtes sur 27 élevages laitiers en France (Michel *et al.*, 2001) ont montré que le niveau des populations microbiennes et la proportion entre la flore d'intérêt technologique et la flore d'altération sont influencés par les pratiques d'hygiène du matériel de traite et l'hygiène de la mamelle avant et après la traite. Ces mesures ont eu peu d'influence sur les SCP qui sont très souvent présents en nombres non négligeables soit dans des échantillons de lait à faible taux de flore mésophile aérobie ($1,2 \times 10^3$ UFC/ml) où plus de 50% du lait contient au moins 100 UFC /ml, ou dans des laits à plus haut niveau de flore mésophile

($1,5 \times 10^4$ UFC/ml) qui ont 37% des échantillons à moins de 100 UFC/ml. Il a été suggéré que la proportion de staphylocoques est influencée par plusieurs facteurs tels que l'état de santé du troupeau et, en particulier, la présence ou l'absence de vaches atteintes de mammite récurrente (Michel *et al.*, 2001).

4. Conclusion

Cette étude réalisée *in vivo* et renforcée par un test de contrôle *in vitro*, a permis de démontrer un effet antibactérien de la solution huileuse topique contenant de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* avec du carvacrol comme composé prédominant sur les indicateurs de la qualité hygiénique microbiologique du lait (BMAT) et de la mammite causée par des bactéries (SCP). Elle a également montré la capacité de cette huile à préserver l'équilibre proportionnel de la population bactérienne dans le lait. Nous suggérons pour des études ultérieures de prendre en considération l'émergence de germes mineurs et le potentiel de récurrence des infections mammaires dues à des germes résistants aux antibiotiques. De telles recherches pourraient aider à évaluer le rapport bénéfice-risque de l'aromathérapie dans le secteur laitier et contribuer au concept « One Health ou une seule santé ».

Conclusion générale

Les mammites des vaches laitières sont des affections très répandues dans les élevages laitiers de la région d'étude et la période du tarissement représente une période critique et propice pour le développement de ces affections. L'enquête effectuée auprès des vétérinaires praticiens du nord algérien sur la gestion de la période sèche par les éleveurs des exploitations laitières a montré de grandes défaillances dans la conduite de cette période, les pratiques zootechniques conseillées durant cette période sont loin d'être respectées dans l'ensemble avec l'absence de rations adaptées aux besoins des vaches durant cette phase. L'utilisation abusive anarchique et non raisonnée des antibiotiques durant cette période et principalement les bêta-lactamines est une pratique courante dans cette région. Par ailleurs, l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des différentes maladies animales et plus particulièrement des mammites bovines n'est pas une pratique courante. Cependant, la majorité des vétérinaires interrogés accepte de remplacer les antibiotiques par un autre moyen pour le traitement des mammites bovines dont le remplacement des antibiotiques par les HE (aromathérapie). Notre étude *in vitro* a mis en évidence la richesse des HE d'*Origanum* et de *Thymus* récoltées des régions montagneuses de l'Est algérien en composés phénoliques prédominés surtout par le thymol et le carvacrol. Ces huiles ont démontrées *in vitro* une activité antibactérienne importante vis-à-vis des différentes souches de staphylocoques (cliniques et de référence) avec des CMI différentes dont la plus importante est celle de l'HE d'*Origanum* en tenant compte du rendement en huile de cette lamiacée.

L'application *in vivo* de l'HE d'*Origanum* par massage cutané mammaire sur des vaches ayant des mammites subcliniques a démontré une activité antibactérienne importante caractérisée par la diminution du nombre de bactéries mésophiles aérobies totales (BMAT) à 30°C et des Staphylocoques à Coagulase Positive (SCP) dans le lait cru de vache.

Ces résultats confirment, dans un contexte de conduite d'élevage mal maîtrisée, l'intérêt de l'utilisation de l'aromathérapie dans la préservation de l'état de santé de la mamelle sans altérer l'équilibre de sa flore bactérienne interne lors d'une période sèche caractérisée physiologiquement par des modifications critiques des statuts hormonal, métabolique et immunologique de la vache tarie.

Recommandations

À la lumière de la présente étude, des recommandations ont été formulées à savoir :

- Sensibilisation des éleveurs sur l'importance de la bonne gestion zootechnique de la période du tarissement et le bien-être des vaches laitières durant cette période.
- Vulgariser institutionnellement les vétérinaires et les éleveurs sur l'intérêt de l'aromathérapie, de l'homéopathie, et d'utiliser des produits de scellement (obturateurs) pour trayons chez les vaches tarées ainsi que d'autres agents alternatifs antimicrobiens dans l'amélioration de la santé du pis.
- Actualiser les données épidémiologiques sur les staphylocoques émergents ayant changés leur profil d'antibiorésistance par la création de nouveaux réseaux régionaux et le renforcement de ceux qui sont actifs actuellement.
- Projeter des recherches sur l'effet des huiles essentielles sur les gènes de résistance des staphylocoques autochtones.
- Continuer les essais cliniques sur les effets thérapeutiques des huiles essentielles contre les mammites en prenant en considération leur toxicité et l'établissement de la limite maximale des résidus (LMR) des HE dans le lait notamment de leurs composés majoritaires.
- Mettre en place au niveau national d'un cadre réglementaire des essais cliniques sur les médicaments à base de plantes impliquant la notion de pharmacopée vétérinaire.
- Évaluer le rapport bénéfice-risque de l'aromathérapie dans une stratégie globale de lutte contre l'antibiorésistance au niveau du secteur laitier visant le concept « One Health ou une seule santé ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abboud, M., El Rammouz, R., Jammal, B., & Sleiman, M. (2015). In vitro and in vivo antimicrobial activity of two essential oils *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* against bovine Staphylococcus and Streptococcus mastitis pathogen. *Middle East J. Agric. Res.*, *4*, 975-983.
2. Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A., & Maachi, R. (2016). Algerian Mentha pulegium L. leaves essential oil : Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, *94*, 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.042>
3. Abdelli, W. (2017). *Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de Juniperus phoenicea et de Thymus vulgaris* [Phdthesis]. <https://www.theses-algerie.com>
4. Achek, R., Hotzel, H., Cantekin, Z., Nabi, I., Hamdi, T. M., Neubauer, H., & El-Adawy, H. (2018). Emerging of antimicrobial resistance in staphylococci isolated from clinical and food samples in Algeria. *BMC Research Notes*, *11*(1), 663. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3762-2>
5. AFNOR. (1986). *Huiles essentielles : Recueil de normes françaises*. AFNOR. <https://books.google.dz/books?id=hXghAAAACAAJ>
6. Agnihotri, V. K., Agarwal, S. G., Dhar, P. L., Thappa, R. K., Baleshwar, Kapahi, B. K., Saxena, R. K., & Qazi, G. N. (2005). Essential oil composition of Mentha pulegium L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour and Fragrance Journal*, *20*(6), 607-610. <https://doi.org/10.1002/ffj.1497>
7. Ahmad, A., Khan, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L. A., & Manzoor, N. (2011). Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *30*(1), 41-50. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1050-8>
8. Aimad, A., Sanae, R., Anas, F., Abdelfattah, E. M., Bourhia, M., Mohammad Salamatullah, A., Alzaharani, A., Alyahya, H. K., Albadr, N. A., Abdelkrim, A., El Barnossi, A., & Noureddine, E. (2021). Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Insecticidal Properties of Essential Oil from Mentha pulegium L. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, *2021*, 1108133. <https://doi.org/10.1155/2021/1108133>
9. Ait ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., García, C., Herrera, A., Pagán, R., & Conchello, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of Mentha pulegium, Juniperus phoenicea, and Cyperus longus essential oils from Morocco. *Food Research International - FOOD RES INT*, *45*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.004>
10. Alagawany, M., El-Hack, M. E. A., Farag, M. R., Shaheen, H. M., Abdel-Latif, M. A., Noreldin, A. E., & Khafaga, A. F. (2020). The Applications of and Its Derivatives in Human, Ruminant and Fish Nutrition – A Review. *Annals of Animal Science*, *20*(2), 389-407. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0004>
11. Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T. (2016). Prevalence, Molecular Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Milk and Dairy Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, *13*(3), 156-162. <https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2038>
12. Aldujaily, A., Al-Alo, K., & Mhs, M. (2019). *Hematology, bacteriology and antibiotic resistance in milk of water buffalo with subclinical mastitis*.
13. Alekseeva, M., Zagorcheva, T., Atanassov, I., & Rusanov, K. (2020). *Origanum vulgare L. – a review on genetic diversity, cultivation, biological activities and perspectives for molecular breeding*. 15.

14. Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy : A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 601-611. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
15. Ali, H., Al-Khalifa, A. R., Aouf, A., Boukhebt, H., & Farouk, A. (2020). Effect of nanoencapsulation on volatile constituents, and antioxidant and anticancer activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil. *Scientific Reports*, 10(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59686-w>
16. Allain, M. (2011). *Étude descriptive de l'identification des bactéries du lait dans un élevage à l'aide de la bactériologie, des comptages cellulaires de tank (cct) et des comptages cellulaires individuels (cci)* [Phdthesis]. École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
17. Al-Maqtari, Q. A., Rehman, A., Mahdi, A. A., Al-Ansi, W., Wei, M., Yanyu, Z., Phyto, H. M., Galeboe, O., & Yao, W. (2021). Application of essential oils as preservatives in food systems : Challenges and future perspectives—a review. *Phytochemistry Reviews*, 1-38.
18. Al-Suwaiegh, S. B., Morshedy, S. A., Mansour, A. T., Ahmed, M. H., Zahran, S. M., Alnemr, T. M., & Sallam, S. M. A. (2020). Effect of an Essential Oil Blend on Dairy Cow Performance during Treatment and Post-Treatment Periods. *Sustainability*, 12(21), 9123. <https://doi.org/10.3390/su12219123>
19. Alves-Barroco, C., Roma-Rodrigues, C., Raposo, L. R., Brás, C., Diniz, M., Caço, J., Costa, P. M., Santos-Sanches, I., & Fernandes, A. R. (2019). *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolated from milk of the bovine udder as emerging pathogens : In vitro and in vivo infection of human cells and zebrafish as biological models. *MicrobiologyOpen*, 8(1), e00623. <https://doi.org/10.1002/mbo3.623>
20. Alwafa, R. A., Mudalal, S., & Mauriello, G. (2021). *Origanum syriacum* L. (Za'atar), from Raw to Go : A Review. *Plants*, 10(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/plants10051001>
21. Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Guedira, A., & Chaouch, A. (2011). Activité antioxydante et composition chimique des huiles essentielles de quatre espèces de thym du Maroc. *Acta Botanica Gallica*, 158(4), 513-523. <https://doi.org/10.1080/12538078.2011.10516292>
22. Amazian, K., Rossello, J., Castella, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L., Abdelmoumène, T., Fabry, J., & Membres du réseau NosoMed. (2010). [Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region]. *Eastern Mediterranean Health Journal = La Revue De Sante De La Mediterranee Orientale = Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit*, 16(10), 1070-1078.
23. Amrouni, S., Touati, M., Hadeif, Y., & Abdelghani, D. (2014). Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase. *Phytothérapie*, 12. <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0842-x>
24. Andersen, J. B., Madsen, T. G., Larsen, T., Ingvarsen, K. L., & Nielsen, M. O. (2005). The Effects of Dry Period versus Continuous Lactation on Metabolic Status and Performance in Periparturient Cows. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3530-3541. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73038-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73038-1)
25. Anderson, L. L., Hard, D. L., Carpenter, L. S., Awotwi, E. K., Diekman, M. A., Trenkle, A. H., & Cho, S.-J. (1999). Pregnancy, parturition, and lactation in hypophyseal stalk-transected beef heifers. *Journal of Endocrinology*.
26. Angelini, P., Pagiotti, R., Menghini, A., & Vianello, B. (2006). Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. *Annals of Microbiology*, 56(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1007/BF03174972>
27. Angoujard, P., Yves, M. (2015). *Enquête sur le diagnostic et le traitement des mammites de la vache laitière par les vétérinaires de terrain en France en 2015*. Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC). [Thèse.].
28. Anses. (2011, septembre). *Staphylococcus aureus et entérotoxines staphylococciques*. 4.

29. Anses. (2017). *Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire Partie 1 : Revue des méthodes et inventaire des données* (Saisine n° 2015-SA-0162; p. 210). Maisons-Alfort.
30. Anžlovar, S., Baričević, D., Ambrožič Avguštin, J., & Dolenc Koče, J. (2014). Essential Oil of Common Thyme as a Natural Antimicrobial Food Additive. *Food Technology and Biotechnology*, 52(2), 263-268.
31. Aprotosoai, A., Gille, E., Spac, A., Goncariuc, M., Hancianu, M., & Stanescu, U. (2010). Chemical composition of essential oils from leaves and twigs with leaves of two new varieties of common sage (*Salvia officinalis* L.). *Planta Medica*, 76(12), P055. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1264353>
32. Arámbula, C. I., Diaz, C. E., & Garcia, M. I. (2019). Performance, chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* and *Origanum vulgare*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1386(1), 012059. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1386/1/012059>
33. Armorini, S., Yeatts, J. E., Mullen, K. A. E., Mason, S. E., Mehmeti, E., Anderson, K. L., Washburn, S. P., & Baynes, R. E. (2016). Development of a HS-SPME-GC-MS/MS Method for the Quantitation of Thymol and Carvacrol in Bovine Matrices and To Determine Residue Depletion in Milk and Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41), 7856-7865. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02899>
34. Arnal, P., Benoît, Guy. (2003). *Sources et caractere enterotoxinogene des staphylocoques en élevage ovin laitier*. Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE.
35. Baali, F., Boumerfeg, S., Boudjelal, A., Denaro, M., Ginestra, G., Baghiani, A., Righi, N., Deghima, A., Benbacha, F., Smeriglio, A., & Trombetta, D. (2022). Wound-healing activity of Algerian *Lavandula stoechas* and *Mentha pulegium* extracts: From traditional use to scientific validation. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(2), 427-439. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1869117>
36. Bahmani, M., Taherikalani, M., Khaksarian, M., Soroush, S., Ashrafi, B., & Heydari, R. (2019). Phytochemical Profiles and Antibacterial Activities of Hydroalcoholic Extracts of *Origanum vulgare* and *Hypericum perforatum* and Carvacrol and Hypericin as a Promising Anti-*Staphylococcus aureus*. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 19(11), 923-932. <https://doi.org/10.2174/1389557519666190121124317>
37. Bakkali, Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
38. Ballet, M. (2020). *Impact de l'ajout d'antibiotiques dans les ciments orthopediques sur la prevention de la formation de biofilm au cours d'infections sur prothese articulaire à Staphylococcus aureus*. Université Claude Bernard - Lyon 1.
39. Banerjee, A. (2013). *Plant Materials (BOT300) Term Paper*.
40. Bangar, Y. C., Singh, B., Dohare, A. K., & Verma, M. R. (2015). A systematic review and meta-analysis of prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in India. *Tropical Animal Health and Production*, 47(2), 291-297. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0718-y>
41. Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., & Sarmiento, B. (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents : A review. *Journal of Essential Oil Research*, 32(4), 279-295. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1746698>
42. Barhoumi, M. (2020). Comparative study of the chemical properties and composition of the *Mentha pulegium* L. Of Algerian origin and that of Tunisian origin. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 6(1), 030-036.
43. Barkema, H. W., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. (2006). Invited Review : The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877-1895. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1)
44. Bartkiene, E., Ruzauskas, M., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Zavistanaviciute, P., Starkute, V., Zokaityte, E., Lele, V., Dauksiene, A., Grashorn, M., Hoelzle, L. E., Mendybayeva, A., Ryshyanova,

- R., & Gruzauskas, R. (2020). Study of the antibiotic residues in poultry meat in some of the EU countries and selection of the best compositions of lactic acid bacteria and essential oils against *Salmonella enterica*. *Poultry Science*, 99(8), 4065-4076. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.002>
45. Basch, E., Ulbricht, C., Hammerness, P., Bevins, A., & Sollars, D. (2004). Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Thymol. *Journal of herbal pharmacotherapy*, 4, 49-67. https://doi.org/10.1300/J157v04n01_07
46. Baser, K. H. C., Kürkçioğlu, M., Houmani, Z., & Abed, L. (2000). Composition of the Essential Oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 12(6), 753-756. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712208>
47. Baskaran, S. A., Kazmer, G. W., Hinckley, L., Andrew, S. M., & Venkitanarayanan, K. (2009). Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1423-1429. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1384>
48. Baumgartner, M., Hulínová Štromerová, N., Bzdil, J., & Siegwalt, G. (2018). *Susceptibility and Resistance of Selected Pathogens of the Mammary Gland of Cattle from Austria and Czech Republic in 2017*.
49. Beghidja, N., Bouslimani, N., Benayache, F., Benayache, S., & Chalchat, J. C. (2007). Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the East of Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4), 481-483. <https://doi.org/10.1007/s10600-007-0170-6>
50. Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *Glandulosum* Desf. At Different Phenological Stages. *Journal of Medicinal Food*, 16(12), 1115-1120. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0079>
51. Belmalha, S., El Idrissi, M., Amechrouq, A., & Echchgadda, G. (2015). Caractérisation chimiques de certaines espèces de thym Marocain du Moyen Atlas (région de Midelt). *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 3(2), 43-52.
52. Beltrán, J. M., & Esteban, M. (2016). Properties and Applications of Plants of *Origanum* Sp. Genus. *SM Journal of Biology*, 2, 1006.
53. Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 149-154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>
54. Benabed, H. K., Gourine, N., Ouinten, M., Bombarda, I., & Yousfi, M. (2017). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Three Algerian Lamiaceae Species. *Current Nutrition & Food Science*, 13(2), 97-109.
55. Benazzouz, A. (2012). *Étude et analyse des plantes médicinales Algérienne : Mentha pulegium, Mentha rotundifolia et Mentha spicata L.* [Mémoire de Master]. Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
56. Benchabane, O., Hazzit, M., Baaliouamer, A., & Mouhouche, F. (2012). Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Ferula vesicertensis* Coss. Et Dur. And *Thymus munbyanus* Desf. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(5), 774-781. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644119>
57. Bendif, H., Adouni, K., Miara, M. D., Baranauskienė, R., Kraujalis, P., Venskutonis, P. R., Nabavi, S. M., & Maggi, F. (2018). Essential oils (EOs), pressurized liquid extracts (PLE) and carbon dioxide supercritical fluid extracts (SFE-CO₂) from Algerian *Thymus munbyanus* as valuable sources of antioxidants to be used on an industrial level. *Food Chemistry*, 260, 289-298. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.108>
58. Berhe, G., Wasihun, A. G., Kassaye, E., & Gebreselasie, K. (2020). Milk-borne bacterial health hazards in milk produced for commercial purpose in Tigray, northern Ethiopia. *BMC Public Health*, 20(1), 894. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09016-6>

59. Bernier-Dodier, P., Girard, C. L., Talbot, B. G., & Lacasse, P. (2011). Effect of dry period management on mammary gland function and its endocrine regulation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4922-4936. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4116>
60. Berry, E. A., & Hillerton, J. E. (2002). The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 85(1), 112-121. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74059-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74059-9)
61. Bertulat, S., Fischer-Tenhagen, C., & Heuwieser, W. (2015). A survey of drying-off practices on commercial dairy farms in northern Germany and a comparison to science-based recommendations. *Vet Rec Open*. 2015; 2:1–10. doi.org/10.1136/vetreco-2014-000068.
62. Bertulat, S., Fischer-Tenhagen, C., Suthar, V., Möstl, E., Isaka, N., & Heuwieser, W. (2013). Measurement of fecal glucocorticoid metabolites and evaluation of udder characteristics to estimate stress after sudden dry-off in dairy cows with different milk yields. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3774-3787. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6425>
63. Besombes, C. (2008). *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques : Applications généralisées* [Phdthesis]. Université de La Rochelle.
64. Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety : Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
65. Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). *Mastitis Control in Dairy Herds: Vol. 2nd Edition* (CABI). <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781845935504/>
66. Bolte, J., Zhang, Y., Wente, N., Mahmmod, Y. S., Svennesen, L., & Krömker, V. (2020). Comparison of phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns associated with *Staphylococcus aureus* mastitis in German and Danish dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3554-3564. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17765>
67. Bora, L., Avram, S., Pavel, I. Z., Muntean, D., Liga, S., Buda, V., Gurgus, D., & Danciu, C. (2022). An Up-To-Date Review Regarding Cutaneous Benefits of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *Antibiotics*, 11(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050549>
68. Bouchard, D. (2013). *Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à Staphylococcus aureus*. Université de Rennes 1.
69. Bouhaddouda, N., Aouadi, S., & Labiod, R. (2016). *Evaluation of chemical composition and biological activities of essential oil and methanolic extract of Origanum vulgare L. ssp. Glandulosum (DESF.) Ietswaart from Algeria*. 8, 104-112.
70. Bouiller, K., Bertrand, X., Hocquet, D., & Chirouze, C. (2020). Human Infection of Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* CC398: A Review. *Microorganisms*, 8(11), E1737. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111737>
71. Boukhechem, S., Mimoune, N., Ghozlane, M. K., Moula, N., & Kaidi, R. (2019). Status, Characterization and Typology of Dairy Cattle Farms in Northern Algeria. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 76(2), Art. 2. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:2019.0022>
72. Boulaghmen, F., Chaouia, C., Hazzit, M., Nouas, M., & Saidi, F. (2018). Composition chimique et activité antimicrobienne d'huile essentielle extraite de *Thymus guyonii* de Noe d'Aflou – Algérie. *Agrobiologia*, 8(1), 853-862.
73. Bourachot, M. (2017). *Traitement des mammites chez la vache laitière : l'aromathérapie, état des lieux et perspectives*. Université Claude-Bernard - Lyon I.
74. Bouyahya, A., Abrini, J., Edaoudi, F., Et-Touys, A., Bakri, Y., & Dakka, N. (2016). *Origanum compactum* Benth: A Review on Phytochemistry and Pharmacological Properties. *Medicinal & Aromatic Plants*, 05. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000252>

- 75.Brada, M., Bezzina, M., Marlier, M., Carlier, A., & Lognay, G. (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *BASE*. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=322&lang=es>
- 76.Brada, M., Saadi, A., Wathelet, J. P., & Lognay, G. (2012). The Essential Oils of *Origanum majorana* L. and *Origanum floribundum* Munby in Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *15*(3), 497-502. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644078>
- 77.Bradley, A. J., Breen, J. E., Payne, B., Williams, P., & Green, M. J. (2010). The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination. *Journal of Dairy Science*, *93*(4), 1566-1577. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2725>
- 78.Bradley, A. J., & Green, M. J. (2004). The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *20*(3), 547-568. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.010>
- 79.Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *The Veterinary Record*, *160*(8), 253-257. <https://doi.org/10.1136/vr.160.8.253>
- 80.Braga, P. A., Gonçalves, J. L., Barreiro, J. R., Ferreira, C. R., Tomazi, T., Eberlin, M. N., & Santos, M. V. (2018). Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *38*, 586-594.
- 81.Breen, J., hudson, C., Green, M. T., & Bradley, A. (2011). Combination therapy for mastitis in dairy herds : Evidence and research. *Vet Times*. *2011*; *41*:8...12-8...12., 7.
- 82.Brielle, R. (2016). *Étude fonctionnelle d'un système toxine-antitoxine de type I exprimé par Staphylococcus aureus et d'ARN régulateurs associés aux ribosomes bactériens* [Phdthesis, Université Rennes 1]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01691695>
- 83.Britten, J. E., Rood, K. A., & Wilson, D. J. (2021). Comparison of Bovine Mammary Involution and Intramammary Infections Following Intramammary Treatment with Casein Hydrolysate and Other Conventional Treatments at Dry-Off. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, *11*(8), 2360. <https://doi.org/10.3390/ani11082360>
- 84.Brunton, L. A., Duncan, D., Coldham, N. G., Snow, L. C., & Jones, J. R. (2012). A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *The Veterinary Record*, *171*(12), 296. <https://doi.org/10.1136/vr.100924>
- 85.Bude, S. A., & Mengesha, A. K. (2021). *Isolation and Identification of Staphylococcus Aureus from Dairy Farms in Bishoftu Town, Ethiopia* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-311125/v1>
- 86.Burke, N., & Adley, C. C. (2021). Prevalence of intramammary antibiotic usage in dairy farming. *Journal of Dairy Research*, *88*(2), 176-178. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000431>
- 87.Burt, S. (2004). Essential oils : Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- 88.Buttin, L. (2020). *Le traitement selectif au tarissement de la vache laitiere : enjeux, interets, état des pratiques a l'etranger et en France*. Vetagro Sup Campus Veterinaire de Lyon.
- 89.Cabrera-Contreras, R., Morelos-Ramírez, R., Quiróz-Ríos, J. P., & Muñoz-Quiróz, D. (2020). Antibacterial Effects of Oregano Essential Oil (OEO) and Its Potential Applications. *Microbiology Research Journal International*, 19-25. <https://doi.org/10.9734/mrji/2020/v30i430209>
- 90.Caillaud, M.-A. (2013). *Étude de l'espèce Origanum vulgare L.* [Université de Nantes]. https://nanopdf.com/download/these-pour-le-diplome-detat-de-docteur-en-pharmacie-2_pdf
- 91.Cainaud, E. (2005). *Les mammites subcliniques chez la chevre : detection et mesures de lutte. Étude dans des elevages de la Drôme*. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
- 92.Candelaria-Deñas, S., Serrano-Parrales, R., Ávila-Romero, M., Meraz-Martínez, S., Orozco-Martínez, J., Ávila-Acevedo, J. G., García-Bores, A. M., Cespedes-Acuña, C. L., Peñalosa-Castro, I.,

- & Hernandez-Delgado, T. (2021, mars 12). Evaluation of the Antimicrobial Activity of Some Components of the Essential Oils of Plants Used in the Traditional Medicine of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Puebla, México. *antibiotics*. *Antibiotics* 2021, 10, 295. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030295>
93. Caputo, L., Cornara, L., Raimondo, F. M., De Feo, V., Vanin, S., Denaro, M., Trombetta, D., & Smeriglio, A. (2021). *Mentha pulegium* L. : A Plant Underestimated for Its Toxicity to Be Recovered from the Perspective of the Circular Economy. *Molecules*, 26(8), 2154. <https://doi.org/10.3390/molecules26082154>
94. Casiglia, S., Bruno, M., Fontana, G., & Senatore, F. (2017). Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* Growing Wild in Sicily and its Activity on Microorganisms Affecting Historical Art Crafts. *Natural Product Communications*, 12(8), 1934578X1701200840. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200840>
95. Chalchat, J.-C., Gorunovic, M. S., Maksimovic, Z. A., & Petrovic, S. D. (2000). Essential Oil of Wild Growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 598-600. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712166>
96. Charton, C. (2017). *Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites*. 251.
97. Cheng, J., Qu, W., Barkema, H. W., Nobrega, D. B., Gao, J., Liu, G., De Buck, J., Kastelic, J. P., Sun, H., & Han, B. (2019). Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2416-2426. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15135>
98. Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis : Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699-1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
99. Chikhouné, A. (2007). *Huiles essentielles de thym et d'origan* [Thesis, INA]. <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/238>
100. Chikhouné, A., Stouvenel, L., Iguer-ouada, M., Hazzit, M., Schmitt, A., Loes, P., Wolf, J., Kamel, A., Auger, J., Vaiman, D., & Toure, A. (2015). In-vitro effects of *Thymus munbyanus* essential oil and thymol on human sperm motility and function. *Reproductive BioMedicine Online*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.011>
101. Cho, B.-W., Cha, C.-N., Lee, S.-M., Kim, M.-J., Park, J.-Y., Yoo, C.-Y., Son, S.-E., Kim, S., & Lee, H.-J. (2015). Therapeutic effect of oregano essential oil on subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Veterinary Research*, 55(4), 253-257. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2015.55.4.253>
102. Christophe, M. (2018). *Évaluation d'une grille notant les pratiques au tarissement et de leur impact sur l'incidence des maladies métaboliques du post-partum à l'aide d'une enquête en élevage*. Campus Veterinaire de Lyon.
103. Clerentin, R. (2014). *La gestion du tarissement de la secretion lactee chez la vache laitiere*. Vetagro Sup Campus Veterinaire de Lyon.
104. Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020, novembre 26). Epidemiology and Classification of Mastitis. *animals*. *Animals* 2020, 10, 2212; doi:10.3390/ani10122212
105. Commission européenne. (1999). *Commission decision of 23 February 1999 adopting a register of flavouring substances used in or on foodstuffs drawn up in application of regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council on 28 October 1996*. 1999/217/EC. *Official Journal, L084, 1-137*.
106. Cook, N., Wilkinson, A., Gajewski, K., Weigel, D., Sharp, P., & Pionek, D. (2004). *The Prevention of New Intramammary Infections during the Dry Period when using an Internal Teat Sealant in conjunction with a Dry Cow Antibiotic*.
107. Corre, C. (2018). *L'utilisation de l'aromathérapie dans les élevages français : État des lieux, efficacité et limites*. 22.

108. Costa, A., De Marchi, M., Sagrafoli, D., Lanzi, H., Amatiste, S., Boselli, C., & Giacinti, G. (2021). Milk Somatic Cell Count and Polymorphonuclear Cells in Healthy Quarters of Cows That Underwent Blanket and Selective Dry Therapy: An Italian Case Study. *Veterinary Sciences*, 8(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/vetsci8120298>
109. Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C., & Basu, C. (2019). Therapeutic and Medicinal Uses of Terpenes. In N. Joshee, S. A. Dhekney, & P. Parajuli (Éds.), *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy* (p. 333-359). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15
110. Crispie, F., Flynn, J., Ross, R. P., Hill, C., & Meaney, W. J. (2004). Dry cow therapy with a non-antibiotic intramammary teat seal—A review. *Irish Veterinary Journal*, 57(7), 412. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-57-7-412>
111. Cuntzmann, A. (2017). *Neoscytalidium dimidiatum et huiles essentielles: Vers une nouvelle piste thérapeutique?* [Phdthesis, Université de Lorraine]. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/BUPHA_T_2017_CUNTZMANN_ANAELLE.pdf
112. Dal Pozzo, M., Santurio, D. F., Rossatto, L., Vargas, A. C., Alves, S. H., Loreto, E. S., & Viegas, J. (2011). Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp. Isolated from bovine mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63, 1229-1232. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000500026>
113. Daoudi-Merbah, F., Hazzit, M., & Dahmani-Megrerouche, M. (2016). Influence of Morphological Variability and Habitat on the Chemical Composition of Essential Oils of an Algerian Endemic *Origanum* Species (*Origanum floribundum* Munby). *Chemistry & Biodiversity*, 13(8), 1088-1094. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500509>
114. Darwish, W. S., Eldaly, E. A., El-Abbasy, M. T., Ikenaka, Y., Nakayama, S., & Ishizuka, M. (2013). Antibiotic residues in food: The African scenario. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 61 Suppl, S13-22.
115. Dauqan, E. M. A., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/JABB.2017.50203>
116. David, M. (2019). *Le thymol – Sources, propriétés et applications*. Université de Limoges.
117. De Matos, G. (2013). *Contribution à la maîtrise du risque lié à Staphylococcus aureus en filière fermière de fromage de chèvre au lait cru en Corse*. Campus Veterinaire de Lyon.
118. Debeche, E. H., Ghozlane, F., & Madani, T. (2018). Importance de certains résidus d'antibiotiques dans le lait de vache en Algérie. Cas de la wilaya de M'sila. *Mars*, 1(500), 248.
119. de Cássia da Silveira E Sá, R., Andrade, L. N., Dos Reis Barreto de Oliveira, R., & de Sousa, D. P. (2014). A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(2), 1459-1480. <https://doi.org/10.3390/molecules19021459>
120. de Matos, S. P., Lucca, L. G., & Koester, L. S. (2019). Essential oils in nanostructured systems: Challenges in preparation and analytical methods. *Talanta*, 195, 204-214. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.029>
121. Derwich, E., Benzyane, Z., & Boukir, A. (2010). GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6, 191-198.
122. Derwich, E., Benzyane, Z., Manar, A., Boukir, A., & Taouil, R. (2010). Phytochemical analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* from Morocco. *American Eurasian Journal of Scientific Research* .5(2), 120-129., 10.
123. Deschepper, R. (2017). *Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie* [Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie]. Université Aix-Marseille.
124. Desobry, S., Belin, L., Bretagne, D., Degobert, S., Estevez, A., Fouin, M., Kieffer, F., Laurent, N., Loubet, I., Renaud, A., & Voisin, S. (2016). *Les émulsions d'huiles essentielles pour la santé animale*. 67.

125. de Vasconcelos, L. C., Sampaio, F. C., Albuquerque, A. de J. dos R., & Vasconcelos, L. C. de S. (2014). Cell viability of *Candida albicans* against the antifungal activity of thymol. *Brazilian Dental Journal*, 25(4), 277-281. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300052>
126. Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.-É., Tristan, A., & Vandenesch, F. (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*—Les points-clés en 2010. *médecine/sciences*, 26(11), Art. 11. <https://doi.org/10.1051/medsci/20102611943>
127. Duse, Karin Persson-Waller, & Karl Pedersen. (2021). Microbial Aetiology, Antibiotic Susceptibility and Pathogen-Specific Risk Factors for Udder Pathogens from Clinical Mastitis in Dairy Cows. *animals*, 11(7), 2113.
128. El amrani, S., Sanae, L., Ez zoubi, Y., Evrendilek, G. A., Mouhcine, F., Hicham, K., Rabia, B., & Abdelhakim, E. O. L. (2022). Combined antibacterial effect of *Origanum compactum* and *Mentha piperita* (Lamiaceae) essential oils against ATCC *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Vegetos*, 35(1), 74-82. <https://doi.org/10.1007/s42535-021-00276-0>
129. El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E. H., Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils : From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
130. El Harrak, K. (2021). *La résistance bactérienne aux antibiotiques : Apparition et stratégies de lutte* [Phdthesis, Université Mohammed V de Rabat faculte de medecine et de pharmacie]. <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/18890/M0232021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
131. Enger, B. (2020). *Blanket, Selective, or No Dry Cow Therapy : Which Should I Choose? 2*.
132. Escobar, A., Pe´rez, M., Romanelli, G., Blustein, G., & Escobar, A. (2020). Thymol bioactivity : A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>
133. Fagundes, H., Barchesi, L., Nader Filho, A., Ferreira, L. M., & Oliveira, C. A. F. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 376-380. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000200018>
134. Falcone, P., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2005). A Study on the Antimicrobial Activity of Thymol Intended as a Natural Preservative. *Journal of Food Protection*, 68(8), 1664-1670.
135. FAO. (2012). Algérie : Etat actuel des ressources génétiques forestières. In FAO (Éd.), *Etat des Ressources Génétiques Forestières dans le Monde* (p. 58).
136. Ferme, D., Avgustin, G., & Kamel, C. (2007). Effets d'une supplémentation à base d'extrait d'ail (*Allium sativa*) et de cinnamaldéhyde sur la présence de résidus chez la vache laitière. *Renc. Rech. Ruminants*, 2007, 14.
137. Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2018). *Application of Essential Oils in Food Systems*. Mdpi AG.
138. Figueredo, G. (2007). *Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne* [Phdthesis]. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II.
139. Fikry, S., Khalil, N., & Salama, O. (2019). Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. *AMB Express*, 9(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0764-y>
140. Fleming. (2014). *Toxi-infections alimentaires (TIAC) en région Rhone-Alpes : bilan et analyse des causes. gestion opérationnelle d'une suspicion de TIAC par une direction départementale de la (cohesion sociale et de la) protection des populations (DD(CS)PP) : exemple dans le département de la Loire*. Université Claude-Bernard - Lyon I.
141. Fontanay, S., Mougenot, M.-E., & Duval, R. E. (2015). Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, 2(2), 109-118.

142. Franchomme, P., Jollois, R., & Penoel, D. (2001). L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques. In *Édition Roger Jollois*.
143. Fratini, F., Casella, S., Leonardi, M., Pisseri, F., Ebani, V. V., Pistelli, L., & Pistelli, L. (2014). Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia*, *96*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.04.003>
144. Fratini, F., Mancini, S., Turchi, B., Friscia, E., Pistelli, L., Giusti, G., & Cerri, D. (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*, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.005>
145. Freu, G., Tomazi, T., Monteiro, C. P., Barcelos, M. M., Alves, B. G., & Santos, M. V. D. (2020). Internal Teat Sealant Administered at Drying off Reduces Intramammary Infections during the Dry and Early Lactation Periods of Dairy Cows. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, *10*(9), E1522. <https://doi.org/10.3390/ani10091522>
146. Fujiwara, M., Haskell, M. J., Macrae, A. I., & Rutherford, K. M. D. (2018). Survey of dry cow management on UK commercial dairy farms. *The Veterinary Record*, *183*(9), 297. <https://doi.org/10.1136/vr.104755>
147. Gann, L. (2013). Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Components Against Lactic Acid Bacteria. *Masters Theses*. https://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/2604
148. García-Ispuerto, I., López-Gatius, F., Almería, S., Yáñez, J., Santolaria, P., Serrano, B., Bech-Sàbat, G., Nogareda, C., Sulon, J., de Sousa, N. M., & Beckers, J. F. (2009). Factors affecting plasma prolactin concentrations throughout gestation in high producing dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, *36*(2), 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2008.10.004>
149. García-Salinas, S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G., & Irusta, S. (2018). Evaluation of the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Different Components of Natural Origin Present in Essential Oils. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, *23*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061399>
150. Gay, E., Bord, S., Boichard, D., & Barnouin, J. (2002). Modalités de traitement des mammites cliniques en élevage bovin laitier en France. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants. 2002; 9. Rencontres Recherches Ruminants, Paris, FRA, 2002-12-04-2002-12-05*, 37-40. <http://prodinra.inra.fr/ft/6B93B7C6-ED86-486E-A9C1-4DDB16205489>
151. Ghasemi Pirbalouti, A., Emami Bistghani, Z., & Malekpoor, F. (2016). An overview on genus *Thymus*. *Journal of Herbal Drugs, Vol. 6, No. 2: 93-100*.
152. Gherardi, G., Bonaventura, G., & Savini, V. (2018). Staphylococcal Taxonomy. In *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* (p. 1-10). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00001-7>
153. Giannenas, I., Skoufos, J., Giannakopoulos, C., Wiemann, M., Gortzi, O., Lalas, S., & Kyriazakis, I. (2011). Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, *94*(11), 5569-5577. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4096>
154. Giordani, R., Hadeif, Y., & Kaloustian, J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, *79*(3), 199-203. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.11.004>
155. Glasser, J. S., Guymon, C. H., Mende, K., Wolf, S. E., Hospenthal, D. R., & Murray, C. K. (2010). Activity of topical antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria recovered from burn patients. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, *36*(8), 1172-1184. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2010.05.013>
156. Godden, S., Rapnicki, P., Stewart, S., Fetrow, J., Johnson, A., Bey, R., & Farnsworth, R. (2003). Effectiveness of an internal teat seal in the prevention of new intramammary infections during the dry and early-lactation periods in dairy cows when used with a dry cow intramammary antibiotic. *Journal of Dairy Science*, *86*(12), 3899-3911. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73998-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73998-8)

157. Goodner, K. L., Mahattanatawee, K., Plotto, A., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2006). Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC–MS/GC–O. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.006>
158. Gott, P. N., Rajala-Schultz, P. J., Schuenemann, G. M., Proudfoot, K. L., & Hogan, J. S. (2017). Effect of gradual or abrupt cessation of milking at dry off on milk yield and somatic cell score in the subsequent lactation. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 2080–2089. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11444>
159. Grbović, F., Stanković, M. S., Čurčić, M., Đorđević, N., Šeklić, D., Topuzović, M., & Marković, S. (2013). In Vitro Cytotoxic Activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Plants*, 2(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/plants2030371>
160. Gruet, P., Maincent, P., Berthelot, X., & Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3), 245–259. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00160-0)
161. Grummer, R. R., & Rastani, R. R. (2004). Why Reevaluate Dry Period Length? *Journal of Dairy Science*, 87, E77–E85. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70063-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70063-6)
162. Guiadeur, M., Ballot, N., Bellenot, D., Hardit, V., Sulpice, P., Martin, G., Lamarle, F., Philibert, A., Jouet, L., Fauriat, A., & David, V. (2020). AROMAM Evaluation en élevage de l'efficacité d'un mélange d'huiles essentielles pour le soin des mammites cliniques chez la vache laitière. *Renc. Rech. Ruminants*, 2020, 25, 4.
163. Guinoiseau, E. (2010). *Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : Séparation, identification et mode d'action* [Université de Corse]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00595051>
164. Gumus, R., Ercan, N., & Imik, H. (2017). The Effect of Thyme Essential Oil (*Thymus Vulgaris*) Added to Quail Diets on Performance, Some Blood Parameters, and the Antioxidative Metabolism of the Serum and Liver Tissues. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 19(2), 297–304. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0403>
165. Gundelach, Y., Kalscheuer, E., Hamann, H., & Hoedemaker, M. (2011). Risk factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics. *Journal of Veterinary Science*, 12(3), 227–233. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.3.227>
166. Gupta, R., Kumar, S., & Khurana, R. (2020). *ESSENTIAL OILS AND MASTITIS IN DAIRY ANIMALS: A REVIEW*. 59, 1–9.
167. Hadi, M., Hameed, I., & Adnan, I. (2017). *Mentha pulegium*: Medicinal uses, Anti-Hepatic, Antibacterial, Antioxidant effect and Analysis of Bioactive Natural Compounds: A Review. *Research J. Pharm. and Tech.*, 10. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00648.5>
168. Hadjadj, N., & Hazzit, M. (2020). Analysis and Antioxidant Activity of Essential Oils and Methanol Extracts of *Origanum floribundum* Munby. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(1), 85–96. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1729867>
169. Haidara, W. (2010). *Pneumopathie nécrasante à Staphylococcus aureus producteur de Leucocidine de Panton et Valentine d'origine communautaire à propos d'un cas clinique* [Thesis]. <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/handle/123456789/1953>
170. Hailemariam, G., & Emire, S. (2013). Antioxidant Activity and Preservative Effect of Thyme (*Thymus schimperi* R.). *British Journal of Applied Science and Technology*, volume 3, 1311–1326. <https://doi.org/10.9734/BJAST/2014/4563>
171. Halasa, T., Østerås, O., Hogeveen, H., van Werven, T., & Nielsen, M. (2009). Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3134–3149. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1740>
172. Halder, D., Barik, B., Dasgupta, R. K., & Deb Roy, S. (2018). AROMA THERAPY: AN ART OF HEALING. *Indian Research Journal of Pharmacy and Science*, 5, 1540–1558. <https://doi.org/10.21276/irjps.2018.5.3.2>

173. Hallier, A., Noirot, V., Medina, B., Leboeuf, L., & Cavret, S. (2013). Development of a method to determine essential oil residues in cow milk. *Journal of Dairy Science*, *96*(3), 1447-1454. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6152>
174. Hamlaoui, M. W., Hadeif, A., Meklati, F., Alleg, M., & Ghouila, B. (2021). In vivo effect of *Origanum vulgare* essential oil on microbiological quality of raw milk from subclinical mastitis affected cows. *The Journal Agriculture and Forestry*, *67*, 83-98. <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.67.3.07>
175. Hamlaoui, M. W., Hadeif, A., Meklati, F. R., & Bital, I. (2021). DRY COW ANTIMICROBIALS USE TO CONTROL MASTITIS IN NORTHERN ALGERIA. *SPERMOVA*, *11*(2), 144-158. <https://doi.org/10.18548/aspe/0009.20>
176. Hamlaoui, M. W., Kayoueche, F. Z., Benmakhlof, A., Badache, A., & Haouar, L. (2019). Influence de quelques paramètres intrinsèques liés à l'animal sur la fréquence des mammites subcliniques des vaches laitières. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, *7*(3). https://www.agrimaroc.org/index.php/Actes_IAPH2/article/view/734
177. Hanzen, Ch. (2016). *Les lactocytes forment des petits amas cellulaires et le niveau de sécrétion est réduit à quelques millilitres. A ce moment, le pis possède une bonne résistance aux nouvelles infections bactériennes, grâce à la fermeture du canal du trayon et à l'accumulation des agents antimicrobiens.* Université de Liège Faculté de Médecine Vétérinaire Service de Thériogenologie des animaux de production.
178. Harris, L., Foster, S., & Richards, R. (2002). An introduction to staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying s. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials : Review. *European Cells and Materials*, *4*, 39-60. <https://doi.org/10.22203/eCM.v004a04>
179. Hassani, A., Sehari, N., Sehari, M., Bouchenafa, N., Labdelli, F., & Kouadria, M. (2017). Étude des propriétés insecticides et bactéricides de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. dans la lutte contre les ravageurs des semences et denrées stockées. *Revue Écologie-Environnement (13) : 2017*, 7.
180. Haydar, H., & Reem Rabie, M. S. (2019). *The Effectiveness of Amoxicillin and Cefalexin in Two Species from Staphylococcus and Bacillus Isolated from Bovine Mastitis in Sudan. 1*, 1-5.
181. Hazzit, M., & Baaliouamer, A. (2009). Composition of the Essential Oils of the Leaves and Flowers of *Thymus palleescens* de Noé and *Origanum floribundum* Munby From Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, *21*(3), 267-270. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700166>
182. Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2006). Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(17), 6314-6321. <https://doi.org/10.1021/jf0606104>
183. Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A. R., Faleiro, M. L., & Miguel, M. G. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, *116*(3), 714-721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.018>
184. Heinen, J. (2019). *Le tarissement sélectif des vaches laitières : Comment procéder en Belgique?* 58.
185. Heni, S., Boughendjioua, H., Saida, M., Bennadja, S., & Abdelghani, D. (2020). Use of *Origanum vulgare* Essential Oil as an Antibacterial Additive in the Preservation of Minced Meat. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1-9. <https://doi.org/10.9734/JPRI/2020/v32i3230927>
186. Hennekinne, J.-A. (2010). *Innovative approaches to improve staphylococcal food poisoning characterization.* 184.
187. Higham, L. E., Deakin, A., Tivey, E., Porteus, V., Ridgway, S., & Rayner, A. C. (2018). A survey of dairy cow farmers in the United Kingdom: Knowledge, attitudes and practices surrounding antimicrobial use and resistance. *The Veterinary Record*, *183*(24), 746. <https://doi.org/10.1136/vr.104986>

188. Hoeij, R. van. (2017). *Metabolic status, lactation persistency, and udder health of dairy cows after different dry period lengths*. <https://doi.org/10.18174/424484>
189. Holder, I. A., & Boyce, S. T. (1994). Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, 20(5), 426-429. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(94\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0305-4179(94)90035-3)
190. Holko, I., Tančin, V., Vrškova, M., & Tvarožková, K. (2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. *Journal of Dairy Research*, 86(4), 436-439. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000694>
191. Holley, R., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273-292. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006>
192. Houicher, A., Abdelkader, B., & Ozogul, F. (2020). *Effects of spearmint and pennyroyal essential oils on the growth of Staphylococcus aureus inoculated in chocolate mousse during chilled storage and abused temperature*. 59, 332-340.
193. Hovinen, M., & Pyörälä, S. (2011). Invited review : Udder health of dairy cows in automatic milking. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 547-562. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3556>
194. Huey, S., Kavanagh, M., Regan, A., Dean, M., McKernan, C., McCoy, F., Ryan, E. G., Caballero-Villalobos, J., & McAloon, C. I. (2021). Engaging with selective dry cow therapy : Understanding the barriers and facilitators perceived by Irish farmers. *Irish Veterinary Journal*, 74(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13620-021-00207-0>
195. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. (2012). Essential Oils in Food Preservation : Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00012>
196. Ietswaart, J. H. (1980). *A taxonomic revision of the Genus Origanum (Labiatae)*. Martinus Nijhoff Publishers bv.
197. INPN. (2022). *Thymus vulgaris L., 1753—Thym commun, Farigoule*. Inventaire National du Patrimoine Naturel. https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/126582
198. Institut pasteur. (2017, avril 24). *Résistance aux antibiotiques*. Institut Pasteur, Paris, France. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/resistance-aux-antibiotiques>
199. Irshad, M., Subhani, M. A., Ali, S., & Hussain, A. (2020). *Biological Importance of Essential Oils*. BoD – Books on Demand.
200. Isman, M. B., Miresmailli, S., & Machial, C. (2011). Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 10(2), 197-204. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4>
201. Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J., & Stankiewicz, M. (2017). Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(1), 34. <https://doi.org/10.3390/molecules23010034>
202. Jannot, A. (2015). *Enquête en élevage laitier sur la conduite et la préparation au vêlage des vaches taries*. Université Claude-Bernard - Lyon I.
203. Jansen, J., van den Borne, B. H. P., Renes, R. J., van Schaik, G., Lam, T. J. G. M., & Leeuwis, C. (2009). Explaining mastitis incidence in Dutch dairy farming : The influence of farmers' attitudes and behaviour. *Preventive Veterinary Medicine*, 92(3), 210-223. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.08.015>
204. Jarlier, V. (2019). La transmission croisée dans la résistance aux antibiotiques : Son contrôle dans les hôpitaux français. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 203(3), 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.banm.2019.04.001>

205. Javid, F., Taku, A., Bhat, M. A., Badroo, G. A., Mudasir, M., & Sofi, T. A. (2018). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on coagulase gene. *Veterinary World*, *11*(4), 423-430. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.423-430>
206. Jebali, J., Ghazghazi, H., Aouadhi, C., ELBini-Dhouib, I., Ben Salem, R., Srairi-Abid, N., Marrakchi, N., & Rigane, G. (2022). Tunisian Native *Mentha pulegium* L. Extracts : Phytochemical Composition and Biological Activities. *Molecules*, *27*(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/molecules27010314>
207. Jemaa, M. B., Falleh, H., Neves, M. A., Isoda, H., Nakajima, M., & Ksouri, R. (2017). Quality preservation of deliberately contaminated milk using thyme free and nanoemulsified essential oils. *Food chemistry*, *217*, 726-734.
208. Jeune, D. (2011). *PRATIQUES DE MEDECINES ALTERNATIVES EN ELEVAGE BOVIN FRANCAIS* [UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I]. http://www2.vetagro-sup.fr/bib/fondoc/th_sout/dl.php?file=2011lyon086.pdf
209. Jugreet, B. S., Suroowan, S., Rengasamy, R. R. K., & Mahomoodally, M. F. (2020). Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, *101*, 89- 105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.025>
210. Jung, H.-R., & Lee, Y. J. (2022). Characterization of Virulence Factors in Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus* from Bulk Tank Milk. *animals*.
211. Juven, B. j., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, *76*(6), 626-631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x>
212. Kabelitz, T., Aubry, E., Vorst, K. van, Amon, T., & Fulde, M. (2021). *The Role of Streptococcus spp. In Bovine Mastitis*.
213. Kabera, F., Roy, J.-P., Afifi, M., Godden, S., Stryhn, H., Sanchez, J., & Dufour, S. (2021). Comparing Blanket vs. Selective Dry Cow Treatment Approaches for Elimination and Prevention of Intramammary Infections During the Dry Period : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2021.688450>
214. Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., & Benlabeled, K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, *15*, 129-133. <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2005.03.006>
215. Kammerer, M., Guenic, M. L., Roussel, P., Linclau, O., Tainturier, D., Larrat, M., & Bareille, N. (2008). *Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles*. 6.
216. Kang, J., Liu, L., Wu, X., Sun, Y., & Liu, Z. (2018). Effect of thyme essential oil against *Bacillus cereus* planktonic growth and biofilm formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(23), 10209-10218. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9401-y>
217. Kashif et al., M. (2016). Control of Mastitis through dry cow therapy : A review. *Veterinaria*, *4*.
218. Kayitsinga, J., Schewe, R. L., Contreras, G. A., & Erskine, R. J. (2017). Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States : The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. *Journal of Dairy Science*, *100*(2), 1388-1407. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11708>
219. Kebbal, S., Djamila, B.-A., Ismail, G., & Christian, H. (2020). *Étude descriptive des facteurs de risque des mammites et caractéristiques managériales des exploitations laitières de la wilaya de Blida*. *Revue Agrobiologia*, *10*(1), 1975-85.
220. Kerbouche, L., Hazzit, M., Baaliouamer, A., & Akretche, S. (2021). Distillation time effecting on the composition of *Origanum floribundum* essential oils and their antioxidant and antimicrobial activities. *Zeitschrift für Naturforschung C*, *76*, 153-160. <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0102>
221. Kerbouche, L., Hazzit, M., Ferhat, M.-A., Baaliouamer, A., & Miguel, M. (2015). Biological Activities of Essential Oils and Ethanol Extracts of *Teucrium polium* subsp. *Capitatum* (L.) Briq. And

- Origanum floribundum* Munby. *Journal of essential oil-bearing plants JEOP*, 18. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935065>
222. Keyvan, E., & Tutun, H. (2019). Effects of Carvacrol on *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk. *Medycyna weterynaryjna*, 75, 238-241. <https://doi.org/10.21521/mw.6211>
223. Khadir, A., Mourad, B., Fethi, B., Chafika, B., Djamel-Eddine, A., Alin, M., Julien, P., Jymy, D., & Jean, C. (2013). Evaluation of the MRSA sensitivity to essential oils obtained from four Algerian medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(7), 018-024.
224. Khalfi, O., Sahraoui, N., Bentahar, F., & Boutekedjiret, C. (2008). Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (Desf.) essential oil from Algeria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9), 1562-1566. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3251>
225. Khan, M., & Khan, A. (2006). Basic facts of mastitis in dairy animals : A review. *Pakistan veterinary journal*, 26(4), 204.
226. Kindahl, H., Kornmatitsuk, B., Königsson, K., & Gustafsson, H. (2002). Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 321-328. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(02\)00167-4](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(02)00167-4)
227. Kivanç, M., Akgül, A., & Doğan, A. (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. *International Journal of Food Microbiology*, 13(1), 81-85. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90140-k](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90140-k)
228. Kok, A., Chen, J., Kemp, B., & Knegsel, A. T. M. van. (2019). Review : Dry period length in dairy cows and consequences for metabolism and welfare and customised management strategies. *Animal*, 13(S1), s42-s51. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001174>
229. Kokkini, S., & Vokou, D. (1989). *Carvacrol-rich Plants in Greece*.
230. Kovačević, Z., Kladar, N., Čabarkapa, I., Radinović, M., Maletić, M., Erdeljan, M., & Božin, B. (2021). New Perspective of *Origanum vulgare* L. and *Satureja montana* L. Essential Oils as Bovine Mastitis Treatment Alternatives. *Antibiotics*, 10(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121460>
231. Kovačević, Z., Radinović, M., Čabarkapa, I., Kladar, N., & Božin, B. (2021). Natural Agents against Bovine Mastitis Pathogens. *Antibiotics*, 10(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020205>
232. Koyama, S., & Heinbockel, T. (2020). The Effects of Essential Oils and Terpenes in Relation to Their Routes of Intake and Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 36. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms21051558>
233. Krigas, N., Lazari, D., Maloupa, E., & Stikoudi, M. (2015). Introducing Dittany of Crete (*Origanum dictamnus* L.) to gastronomy : A new culinary concept for a traditionally used medicinal plant. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(2), 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2015.02.001>
234. Krisch, J., Tserennadmid, R., & Vágvölgyi, C. (2011). Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage. *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Essential-oils-against-yeasts-and-moulds-causing-Krisch-Tserennadmid/b738947ac5b406d6b182b95e7f94dcc43e73f3b1>
235. Król, B., & Kiełtyka-Dadasiewicz, A. (2015). Yield and herb quality of thyme (*Thymus vulgaris* L.) depending on harvest time. *Turkish Journal of Field Crops*, 20, 78-84. <https://doi.org/10.17557/.89347>
236. Kromker, Friederike Reinecke, Jan-Hendrik Paduch, & Nils Grabowski. (2014). Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clinical Microbiology: Open Access*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000157>
237. Krömker, V., & Leimbach, S. (2017). Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 52 Suppl 3, 21-29. <https://doi.org/10.1111/rda.13032>

238. Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, A. A., Gouri, A., Hadeif, Y., & Benakhla, A. (2017). Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. Against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(2), 245-249. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.03.004>
239. Kuipers, A., Koops, W. J., & Wemmenhove, H. (2016). Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1632-1648. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8428>
240. Lakis, Z., Mihele, D., Nicorescu, I., Vulturescu, V., & Udeanu, D. I. (2012). The antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Origanum syriacum* essential oils on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Candida albicans*. *Farmacia*, 60(6), 857-865.
241. Larsen, M., Franchi, G. A., Herskin, M. S., Foldager, L., Larsen, M. L. V., Hernández-Castellano, L. E., Sørensen, M. T., & Jensen, M. B. (2021). Effects of feeding level, milking frequency, and single injection of cabergoline on feed intake, milk yield, milk leakage, and clinical udder characteristics during dry-off in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104(10), 11108-11125. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20289>
242. Lefevre, C., Kammerer, M., Le Guenic, M., Roussel, P., Alby, C., Linclau, O., Cartaud, G., Tainturier, D., Larrat, M., & Bareille, N. (2009). Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles. *Innovations Agronomiques*, 4, 79-83.
243. Lehmann, J. (2016). *Extended lactation in Danish dairy production*.
244. Leila, D., Ouided, S., & Youcef, H. (2020). Evaluation of the antibacterial activity of three essential oils extracted from plants used in traditional medicine in Algeria (*Salvia officinalis* L, *Melissa officinalis* L and *Origanum vulgare* L). *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 12(1), Art. 1. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2020.12.1.0183>
245. Leite de Souza, E. (2021). Insights into the current evidence on the effects of essential oils toward beneficial microorganisms in foods with a special emphasis to lactic acid bacteria – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.011>
246. Levesque, P. (2004). *Less mastitis better milk*. Institut de technologie agroalimentaire.
247. Liu, G., Ding, L., Han, B., Piepers, S., Naqvi, S. A., Barkema, H. W., Ali, T., De Vliegher, S., Xu, S., & Gao, J. (2018). Characteristics of *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis Exposed to Subminimum Inhibitory Concentrations of Cefalotin or Ceftazidime. *BioMed Research International*, 2018, e4301628. <https://doi.org/10.1155/2018/4301628>
248. Lonergan, P. (2015). New insights into the function of progesterone in early pregnancy. *Animal Frontiers*, 5(1), 12-17. <https://doi.org/10.2527/af.2015-0003>
249. Lopes, T. S., Fussieger, C., Rizzo, F. A., Silveira, S., Lunge, V. R., Streck, A. F., Lopes, T. S., Fussieger, C., Rizzo, F. A., Silveira, S., Lunge, V. R., & Streck, A. F. (2022). Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 42. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6958>
250. Lozano, C., Gharsa, H., Ben Slama, K., Zarazaga, M., & Torres, C. (2016). *Staphylococcus aureus* in Animals and Food : Methicillin Resistance, Prevalence and Population Structure. A Review in the African Continent. *Microorganisms*, 4(1), 12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010012>
251. Luís, Â., & Domingues, F. (2021, octobre 18). Screening of the Potential Bioactivities of Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) Essential Oil. *antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101266>
252. Lundberg, Å., Nyman, A.-K., Aspán, A., Börjesson, S., Unnerstad, H. E., & Waller, K. P. (2016). Udder infections with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* at calving in dairy herds with suboptimal udder health. *Journal of Dairy Science*, 99(3), 2102-2117. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9487>
253. Mahfouf, N. (2018). *Étude de l'espèce Origanum vulgare L.* [These de doctorat, Université Chadli Benjedid - El Tarf (Algérie)]. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01894678>

254. Mamache, B., Sabrina, R., & Toufik, M. (2011). Antibacterial susceptibility profiles of sub-clinical mastitis pathogens isolated from cows in Batna and Setif Governorates (East of Algeria). *Veterinary World*, 4, 6. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2011.537-541>
255. Mansour, M., Aline, B., Bouba, G., Marie Chantal, N. E., Calixte Didier, M., Benoit, K., & Desire M, A. D. (2020). Epidemiology Survey of Antibiotics Use in Hospitals and Veterinarian Practices in Northern Regions of Cameroon. *International Journal For Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 07(02), 9-16. <https://doi.org/10.31033/ijrasb.7.2.2>
256. Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Gortzi, O., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol : A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
257. Marisa, H., Jouy, E., Madec, J.-Y., & Laurent, F. (s. d.). Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) : Un partage entre l'Homme et l'animal ? *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 53/Spécial Antibiotiques et Antibiorésistances*.
258. Marouf, A., & Tremblin, G. (2016). *Abrégé de biochimie appliquée - Nouvelle édition - Abderrazak Marouf, Gérard Tremblin (EAN13 : 9782759819089) | La boutique EDP Sciences : e-librairie, vente en ligne de livres et ebooks scientifiques*. EDP Sciences. <https://laboutique.edpsciences.fr/produit/809/9782759819089/abrege-de-biochimie-appliquee>
259. Martins, T. (2020). *Les huiles essentielles antibactériennes, exemple du thym (thymus)* [Phdthesis, UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE UFR DE PHAR]. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03230057>
260. Masson, H. (2016). *Enquête sur le traitement des mammites cliniques en agriculture biologique en Bretagne, Utilisation de l'aromathérapie* [Phdthesis]. Ecole nationale vétérinaire de Nantes.
261. Matallah, A. M., Bouayad, L., Boudjellaba, S., Mebkhou, F., Hamdi, T. M., & Ramdani-Bougoussa, N. (2019). Staphylococcus aureus isolated from selected dairies of Algeria : Prevalence and susceptibility to antibiotics. *Veterinary World*, 12(2), 205-210. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.205-210>
262. Mbindyo, C. M., Gitao, G. C., & Mulei, C. M. (2020). Prevalence, Etiology, and Risk Factors of Mastitis in Dairy Cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. *Veterinary Medicine International*, 2020, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2020/8831172>
263. McDougall, S. (2003). Management factors associated with the incidence of clinical mastitis over the non-lactation period and bulk tank somatic cell count during the subsequent lactation. *New Zealand Veterinary Journal*, 51(2), 63-72. <https://doi.org/10.1080/00480169.2003.36342>
264. McPhee, C. S., Anderson, K. L., Yeatts, J. L., Mason, S. E., Barlow, B. M., & Baynes, R. E. (2011). Hot topic : Milk and plasma disposition of thymol following intramammary administration of a phytoceutical mastitis treatment. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1738-1743. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3988>
265. Meklati, F. R., Meribai, A., Yezli, N., & Ben-Mahdi, M. H. (2020). State of play of the dairy sector in Algeria : Between objectives and dependencies: an overview. *CABI Reviews*, 15(027), 1-8.
266. Meklati, F. R., Panara, A., Hadeif, A., Meribai, A., Ben-Mahdi, M. H., Dasenaki, M. E., & Thomaidis, N. S. (2022). Comparative Assessment of Antibiotic Residues Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and a Rapid Screening Test in Raw Milk Collected from the North-Central Algerian Dairies. *Toxics*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/toxics10010019>
267. Melkina, O. E., Plyuta, V. A., Khmel, I. A., & Zavilgelsky, G. B. (2021, mai 29). The Mode of Action of Cyclic Monoterpenes (-)-Limonene and (+)- α -Pinene on Bacterial Cells. *biomolecules*. *Biomolecules* 2021, 11, 806. <https://doi.org/10.3390/biom11060806>
268. Meskini, Z., Rechidi-sidhoum, N., Bounaama, K., Dahou, A. E., & Homrani, A. (2021). Management practices on dairy cattle breeding farms in northwest of Algeria. *Anim. Sci. Biotechnol.*, 54, 237-242.

269. Messaoudi, M., Rebiai, A., Sawicka, B., Atanassova, M., Ouakouak, H., Larkem, I., Egbuna, C., Awuchi, C. G., Boubekeur, S., Ferhat, M. A., Begaa, S., & Benchikha, N. (2022). Effect of Extraction Methods on Polyphenols, Flavonoids, Mineral Elements, and Biological Activities of Essential Oil and Extracts of *Mentha pulegium* L. *Molecules*, 27(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/molecules27010011>
270. Michel, V., Hauwuy, A., & Chamba, J. (2001). La flore microbienne de laits crus de vache : Diversité et influence des conditions de production. *Lait*, 81, 575-592. <https://doi.org/10.1051/lait:2001151>
271. Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils : A Short Review. *Molecules*, 15(12), 9252-9287. <https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
272. Mihai, A. L., & Popa, M. (2013). Essential oils utilization in food industry—A literature review. *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Essential-oils-utilization-in-food-industry-a-Mihai-Popa/ace240bdccca2529bf613242ca17eae2971a5505>
273. Ministère algérien du commerce. (2017). *Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires*. Journal Officiel de La République Algérienne, 39, 11-32. <https://www.joradp.dz/FTP/JO-FRANCAIS/2017/F2017039.pdf>
274. Mnayer, D. (2014). *Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens*. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.
275. Mombeini, T., Mombeini, M., & Aghayi, M. (2009). Evaluation of pharmacological effects of *Origanum* genus (*Origanum* spp.). *Journal of Medicinal Plants*, 8(29), 18-189.
276. Monistero, V., Barberio, A., Biscarini, F., Cremonesi, P., Castiglioni, B., Graber, H. U., Bottini, E., Ceballos-Marquez, A., Kroemker, V., Petzer, I. M., Pollera, C., Santisteban, C., Veiga Dos Santos, M., Bronzo, V., Piccinini, R., Re, G., Cocchi, M., & Moroni, P. (2020). Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3431-3446. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17141>
277. Moroh, J.-L. A. (2013). *Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides** [Université de Bretagne occidentale - Brest]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00935393/document>
278. Mossa, A. (2016). Green Pesticides : Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. *Journal of Environmental Science and Technology*, 9, 354-378. <https://doi.org/10.3923/jest.2016.354.378>
279. Motyl, T., Gajewska, M., Zarzynska, J., Sobolewska, A., & Gajkowska, B. (2007). Regulation of Autophagy in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Autophagy*, 3(5), 484-486. <https://doi.org/10.4161/auto.4491>
280. Moukhles, A., Mansour, A., Ellaghdach, A., & Abrini, J. (2018). Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the pure essential oils and essential oils extracted from their corresponding hydrolats from different wild varieties of Moroccan thyme. *J. Mater. Env. Sci*, 9, 235-244.
281. Mullen, K. a. E., Anderson, K. L., & Washburn, S. P. (2014). Effect of 2 herbal intramammary products on milk quantity and quality compared with conventional and no dry cow therapy. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3509-3522. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7460>
282. Mullen, K. A. E., Lee, A. R., Lyman, R. L., Mason, S. E., Washburn, S. P., & Anderson, K. L. (2014). Short communication : An in vitro assessment of the antibacterial activity of plant-derived oils. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5587-5591. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7806>
283. Nabti, L. Z., Sahli, F., Laouar, H., Olowo-okere, A., Nkuimi Wandjou, J. G., & Maggi, F. (2020). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. Against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Antibiotics*, 9(1), 29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010029>

284. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & Feo, V. D. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
285. Ndahetuye, J. B., Persson, Y., Nyman, A.-K., Tukei, M., Ongol, M. P., & Båge, R. (2019). Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 2037-2044. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01905-2>
286. Neculai-Valeanu, A. S., Ariton, A. M., Mădescu, B. M., Rîmbu, C. M., & Creangă, Ș. (2021). Nanomaterials and Essential Oils as Candidates for Developing Novel Treatment Options for Bovine Mastitis. *Animals*, 11(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3390/ani11061625>
287. Nehme, R., Andrés, S., Pereira, R., Ben Jemaa, M., Bouhallab, S., Cecilian, F., López, S., Rahai, F., Riadh, K., Pereira, D., & Abdennebi-Najar, L. (2021). Essential Oils in Livestock : From Health to Food Quality. *Antioxidants*, 10, 330. <https://doi.org/10.3390/antiox10020330>
288. Netopilova, M., Houdkova, M., Urbanova, K., Rondevaldova, J., & Kokoska, L. (2021). Validation of Qualitative Broth Volatilization Checkerboard Method for Testing of Essential Oils : Dual-Column GC-FID/MS Analysis and In Vitro Combinatory Antimicrobial Effect of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* against *Staphylococcus aureus* in Liquid and Vapor Phases. *Plants*, 10(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/plants10020393>
289. Newman, K. A., Rajala-Schultz, P. J., Lakritz, J., & DeGraves, F. J. (2009). Lactoferrin concentrations in bovine milk prior to dry-off. *Journal of Dairy Research*, 76(4), 426-432. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990033>
290. Newton, H. T., Green, M. J., Benchaoui, H., Cracknell, V., Rowan, T., & Bradley, A. J. (2008). Comparison of the efficacy of cloxacillin alone and cloxacillin combined with an internal teat sealant for dry-cow therapy. *Veterinary Record*, 162(21), 678-683. <https://doi.org/10.1136/vr.162.21.678>
291. Nieto, G. (2020). A Review on Applications and Uses of Thymus in the Food Industry. *Plants*, 9, 961. <https://doi.org/10.3390/plants9080961>
292. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*.
293. Noireterre, P. (2006). *Suivis de comptages cellulaires et d'examen bacteriologiques lors de mammites cliniques chez la vache laitiere. Étude experimentale au centre d'elevage Lucien Bizet de Poisy*. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
294. Nonnemann, B., Lyhs, U., Svennesen, L., Kristensen, K. A., Klaas, I. C., & Pedersen, K. (2019). Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2515-2524. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15424>
295. Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Sudano Roccaro, A., & Alonzo, V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2), 191-195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00890-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00890-5)
296. Odensten, M. (2006). *Drying Off the Dairy Cow Effects on Metabolism and Udder Health*.
297. O'Hara, E. A. (2019). *The effect of dry period length on milk production, health and fertility in two cow breeds*. 78.
298. Oliveira, J. L. T. M. de, Diniz, M. de F. M., Lima, E. de O., Souza, E. L. de, Trajano, V. N., & Santos, B. H. C. (2009). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 45-50. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000100006>
299. Oliver, J. P., Gooch, C. A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J. J., Sassoubre, L., Crossette, E. M., & Aga, D. S. (2020). Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1051-1071. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16778>

300. O'Rourke, D. (2009). Nutrition and udder health in dairy cows: A review. *Irish Veterinary Journal*, 62(4), S15. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S15>
301. Ouakli, N., Djamilia, B.-A., Nadia, D., Abdelkrim, Y., & Rachid, K. (2022). Staphylococcal Subclinical Mastitis in Dairy Cows in Blida Region (Algeria). *Journal of Veterinary Medical Research*, 0. <https://doi.org/10.21608/jvmr.2022.120689.1047>
302. Ouis, N. (2015). *Étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil* [Thèse de Doctorat]. Université Oran 1 Algérie.
303. Ouknin, M., Romane, A., Costa, J., Ponthiaux, P., & Majidi, L. (2018). Anticorrosion properties of *Thymus munbyanus* Boiss & Reut. *Moroccan Journal of Chemistry*, 6(3), Art. 3. <https://doi.org/10.48317/IMIST.PRSM/morjchem-v6i3.11024>
304. Ounaissia, K., Mahfouf, N., Bennadja, S., Abdelghani, D., & Hichem, N. (2019). Extraction and Antistaphylococcal Study of the Essential Oil of *Origanum vulgare* L. (Guelma-Algeria). *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 3, 123-131. <https://doi.org/10.29329/ijjaar.2019.188.12>
305. Özkalp, B., Sevgi, F., Özcan, M., & Özcan, M. (2010). The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 8.
306. Patience, G. S., Karirekinyana, G., Galli, F., Patience, N. A., Kubwabo, C., Collin, G., Bizimana, J. C., & Boffito, D. C. (2018). Sustainable manufacture of insect repellents derived from *Nepeta cataria*. *Scientific Reports*, 8(1), 2235. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18141-z>
307. Paduch, R., Kandefér-Szerszeń, M., Trytek, M., & Fiedurek, J. (2007). Terpenes: Substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 55(5), 315-327. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>
308. Pantosti, A., Sanchini, A., & Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2(3), 323-334. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.3.323>
309. Paşca, C., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Matei, I. A., Bonta, V., Paşca, I., Chirilă, F., Cîmpean, A., & Iosif Fiţ, N. (2020). Efficacy of natural formulations in bovine mastitis pathology: Alternative solution to antibiotic treatment. *Journal of Veterinary Research*, 64(4), 523-529. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0067>
310. Pascoli, L., Chiaradia, V., Mucignat, G., & Santini, G. (1986). Identification of staphylococci by the API Staph, Sceptor, Rosco and simplified lyogroup systems. *European Journal of Clinical Microbiology*, 5(6), 669-671. <https://doi.org/10.1007/BF02013298>
311. Pasiás, I. N., Ntakoulas, D. D., Raptopoulou, K., Gardeli, C., & Proestos, C. (2021). Chemical Composition of Essential Oils of Aromatic and Medicinal Herbs Cultivated in Greece—Benefits and Drawbacks. *Foods*, 10(10), Art. 10. <https://doi.org/10.3390/foods10102354>
312. Pattamanont, P., Marcondes, M., & De Vries, A. (2020). Advantages and Disadvantages of Various Dry-off Methods for Dairy Cows. *EDIS*, 2020(5), 6. <https://doi.org/10.32473/edis-an360-2020>
313. Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 9(8), 721-726. <https://doi.org/10.1078/094471102321621322>
314. Pérez, S., Zavala, M., G. L., & Ramos-Lopez, M. (2011). Anti-inflammatory Activity of Some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 23, 38-44. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700480>
315. Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K., & Jones, G. M. (2010). *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. 7.
316. Petzer, I.-M., Lourens, D. C., van der Schans, T. J., Watermeyer, J. C., van Reenen, R., Rautenbach, G. H., & Thompson, P. (2009). Intramammary infection rate during the dry period in cows that received blanket dry cow therapy: Efficacy of 6 different dry-cow intra-mammary

- antimicrobial products. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80(1), 23-30. <https://doi.org/10.4102/jsava.v80i1.164>
317. Pezeshki, A., Capuco, A. V., De Spiegeleer, B., Peelman, L., Stevens, M., Collier, R. J., & Burvenich, C. (2010). REVIEW ARTICLE : An integrated view on how the management of the dry period length of lactating cows could affect mammary biology and defence. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(5), e7-e30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.00991.x>
318. Pezeshki, A., Mehrzad, J., Ghorbani, G. R., Rahmani, H. R., Collier, R. J., & Burvenich, C. (2007). Effects of Short Dry Periods on Performance and Metabolic Status in Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5531-5541. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0359>
319. Pezzani, R., Vitalini, S., & Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: An update. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1253-1268. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9535-z>
320. Piochon, M. (2008). *Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse*. Université du Québec.
321. Piotr, S., Magdalena, Z., Joanna, P., Barbara, K., & Sławomir, M. (2018). Essential oils as potential anti-staphylococcal agents. *Acta Veterinaria*, 68(1), 95-107. <https://doi.org/10.2478/acve-2018-0008>
322. Popović, V., Savić, M., & Katić, B. (2010). ORIGANO *Origanum vulgare* L. – svojstva, proizvodnja i promet. *Industrija, 2010 - scindeks.ceon.rs*, 17.
323. Porcherie, A., Cunha, P., Trotureau, A., Roussel, P., Gilbert, F. B., Rainard, P., & Germon, P. (2012). Répertoire of *Escherichia coli* agonists sensed by innate immunity receptors of the bovine udder and mammary epithelial cells. *Veterinary Research*, 43(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-14>
324. Prasanth Reddy, V., Kandisa, R. V., Varsha, P., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* Traditional Uses and Pharmacological Properties. *Medicinal & Aromatic Plants, vol 3 issu 4*. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000167>
325. Pyörälä, S., & Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2), 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>
326. Rajala-Schultz, P. J., Gott, P. N., Proudfoot, K. L., & Schuenemann, G. M. (2018). Effect of milk cessation method at dry-off on behavioral activity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3261-3270. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13588>
327. Rattez, C. (2017). *Les mammites subcliniques en élevage bovin laitier : Antibiothérapie et alternatives*. 231.
328. Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250-264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
329. Reddy, D. (2019). *Essential Oils Extracted from Medicinal Plants and Their Applications* (p. 237-283). https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7_9
330. Reiner. (2010, novembre 11). Catalase Test Protocol. *American Society For Microbiology*, 9.
331. Remy, D. (2010). *Les mammites*. France Agricole Editions, Paris, France, 259 p.
332. Reyher, K. K., Haine, D., Dohoo, I. R., & Revie, C. W. (2012). Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens—A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6483-6502. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5594>
333. Richter, J., & Schellenberg, I. (2007). Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(6), 2207-2217. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-1045-6>

334. Ríos, J.-L. (2016). Chapter 1 - Essential Oils : What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In V. R. Preedy (Éd.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (p. 3-10). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00001-8>
335. Roche, J. R., Friggens, N. C., Kay, J. K., Fisher, M. W., Stafford, K. J., & Berry, D. P. (2009). Invited review : Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science*, *92*(12), 5769-5801. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
336. Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J. M., & Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *132*(2-3), 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.025>
337. Rola, J. G., Anna Czubkowska, Weronika Korpysa-Dzirba, & Jacek Osek. (2016). Occurrence of *Staphylococcus aureus* on Farms with Small Scale Production of Raw Milk Cheeses in Poland. *toxins*.
338. Roldán, L. P., Díaz, G. J., & Durringer, J. M. (2010). Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the Lamiaceae family against pathogenic and beneficial bacteria. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *23*(4), 451-461.
339. Roussel, P., Bareille, N., Serieys, F., Le Guenic, M., & Seegers, H. (2010). *Choix d'une strategie de traitement des vaches laitières au tarissement*. 6.
340. Ruegg, P. L. (2021). What Is Success? A Narrative Review of Research Evaluating Outcomes of Antibiotics Used for Treatment of Clinical Mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2021.639641>
341. Rusenova, N., & Parvanov, P. (2009). Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganism of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*, *7*.
342. Saghrouchni, H., El Barnossi, A., Salamatullah, A. M., Bourhia, M., Alzahrani, A., Alkaltham, M. S., Alyahya, H. K., Tahiri, N. E. H., Imtara, H., & Var, I. (2021, mai 15). Carvacrol : A Promising Environmentally Friendly Agent to Fight Seeds Damping-Off Diseases Induced by Fungal Species. *agronomy*. *Agronomy* 2021, *11*, 985. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050985>
343. Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., & Ozer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, *15*, 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.08.009>
344. Saidi, R., Mimoune, N., Baazizi, R., Benaïssa, M. H., Khelef, D., & Kaidi, R. (2019). Antibiotic susceptibility of *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Algeria. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *6*(2), 231-235. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f337>
345. Salehi, B., Upadhyay, S., Erdogan Orhan, I., Kumar Jugran, A., L.D. Jayaweera, S., A. Dias, D., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., C. Cho, W., & Sharifi-Rad, J. (2019). Therapeutic Potential of α - and β -Pinene : A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*, *9*(11), 738. <https://doi.org/10.3390/biom9110738>
346. Sampimon, O. C., Barkema, H. W., Berends, I. M. G. A., Sol, J., & Lam, T. J. G. M. (2009). Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Veterinary Microbiology*, *134*(1-2), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.010>
347. Sargeant, J. M., Winder, C., O'Connor, A. M., Wood, H., Glanville, J. M., Kelton, D. F., LeBlanc, S., & Duffield, T. (2018). *The efficacy of teat sealants in dairy cows at dry-off to prevent new intra-mammary infections during the dry-period or clinical mastitis during early lactation : A protocol for a systematic review*. 12.
348. Sari, M. (2018). *Étude biologique et phytochimique de l'origan *origanum vulgare* L. ssp *glandulosum* Desf. Letswaart) espèce endémique d'Algerie—Tunisie* [Thesis]. <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/2352>
349. Sari, M., Biondi, D. M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., & et al. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several

- populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal* 21(6), 890–898. doi.org/10.1002/ffj.1738
350. Sarkic, A., & Stappen, I. (2018). Essential Oils and Their Single Compounds in Cosmetics—A Critical Review. *Cosmetics*, 5(1), Art. 1. https://doi.org/10.3390/cosmetics5010011
351. Satyal, P., Murray, B. L., McFeeters, R., & Setzer, W. (2016). Essential Oil Characterization of *Thymus vulgaris* from Various Geographical Locations. *Foods*. https://doi.org/10.3390/foods5040070
352. Sauget, M. (2016). *Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : Application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales* [Phdthesis, Université de Franche-Comté]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01558289
353. Sawant, A. A., Sordillo, L. M., & Jayarao, B. M. (2005). A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2991–2999. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72979-9
354. Scherpenzeel, C. G. M., Santman-Berends, I. M. G. A., & Lam, T. J. G. M. (2018). Veterinarians' attitudes toward antimicrobial use and selective dry cow treatment in the Netherlands. *Journal of Dairy Science*, 101(7), 6336–6345. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13591
355. Seegers, H., Robert, A., Billon, D., Roussel, P., Serieys, F., Guenic, M. L., Baudet, H., Heuchel, V., & Bareille, N. (2006). *Évaluation économique de règles de traitement sélectif au tarissement selon les contextes épidémiologiques de santé des mamelles en troupeaux laitiers : Étude par simulation*. 4.
356. Serieys, F. (2007). Lactation and drying-off: New data in cattle. *Point Veterinaire*, 38, 33–38+6.
357. Sérieys, F. (2015). *Le tarissement des vaches laitières : Une période-clé pour la santé, la production et la rentabilité du troupeau / Francis Sérieys ; Filière Blanche* (2e édition.). Éditions France Agricole.
358. Sezik, E., Tümen, G., Kirimer, N., Özek, T., & Baser, K. H. C. (1993). Essential Oil Composition of Four *Origanum vulgare* Subspecies of Anatolian Origin. *Journal of Essential Oil Research*, 5(4), 425–431. https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698253
359. SFM. (2020). *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*. www.sfm-microbiologie.org
360. Shankar, R., Jyoti, Dheer, D., Singh, D., Kumar, G., Karnatak, M., & Verma, V. (2019). Thymol Chemistry: A Medicinal Toolbox. *Current Bioactive Compounds*, 15, 454–474. https://doi.org/10.2174/1573407214666180503120222
361. Sharma, S., Barkauskaite, S., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343, 128403. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403
362. Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, Mohd., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarपाल, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: A comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 107–136. https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713
363. Shelepova, O. V., Tkacheva, E. V., & Golosova, E. V. (2021). The history of the introduction of peppermint (*Mentha × piperita* L.) in Imperial Russia. *BIO Web of Conferences*, 38, 00115. https://doi.org/10.1051/bioconf/20213800115
364. Shoaib, M., Aqib, A. I., Naseer, M. A., Bhutta, Z. A., Pu, W., Tanveer, Q., Muzammil, I., Kulyar, M. F.-A., Younas, M. S., & Hammad, M. (2021). Etiology of Bovine Mastitis. In *Mastitis in Dairy Cattle, Sheep and Goats*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.98543
365. Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., Johnson, R., & Du, Z. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 296–305. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02789.x
366. Skaria, B. P. (2007). *Aromatic Plants*. New India Publishing.

367. Skoufogianni, E., Solomou, A. D., & Danalatos, N. G. (2019). Ecology, Cultivation and Utilization of the Aromatic Greek Oregano (*Origanum vulgare* L.): A Review. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3), Art. 3. <https://doi.org/10.15835/nbha47311296>
368. Soni, N., Nirav, & Soni, R. (2012). TO STUDY THE HERBALISM OF THYME LEAVES. *International Journal of Pharmacy and Industrial Research*, 2, 252-258.
369. Ssajjakambwe, P., Bahizi, G., Setumba, C., Kisaka, S. M. B., Vudriko, P., Atuheire, C., Kabasa, J. D., & Kaneene, J. B. (2017). Milk Hygiene in Rural Southwestern Uganda : Prevalence of Mastitis and Antimicrobial Resistance Profiles of Bacterial Contaminants of Milk and Milk Products. *Veterinary Medicine International*, 2017, 8710758. <https://doi.org/10.1155/2017/8710758>
370. Stark, L. (2013). *Staphylococcus aureus—Aspects of pathogenesis and molecular epidemiology*. 81.
371. Steeneveld, W., De Prado-Taranilla, A., Krogh, K., & Hogeveen, H. (2019). The economic impact of drying off cows with a dry-off facilitator (cabergoline) compared with 2 methods of gradual cessation of lactation for European dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 7483-7493. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16068>
372. Sumon, S. M. M. R., Haider, M. G., Islam, M. A., Siddikl, S. H. M. F., & Karim, M. R. (2018). *Prevalence and antibiogram profile of staphylococcus aureus isolated from milk samples of lactating cows with subclinical mastitis in gazipur, bangladesh*. <http://publications.bsmrau.edu.bd/handle/123456789/1320>
373. Sumon, S. M. M. R., Parvin, Mst. S., Ehsan, Md. A., & Islam, Md. T. (2020). Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. *Veterinary World*, 13(8), 1709-1713. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1709-1713>
374. Suntres, Z., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2013). The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
375. Sztachañska, M., Barański, W., Janowski, T., Pogorzelska, J., & Zduńczyk, S. (2016). Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(1), 119-124. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0015>
376. Tamendjari, S., Bouzebda, F. A., Chaib, L., Aggad, H., Ramdani, M., & Bouzebda, Z. (2021). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw cow and goat milk produced in the Tialet and Souk Ahras areas of Algeria. *Veterinary World*, 14(7), 1929-1934. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1929-1934>
377. Tavakol, M., & Dennick, R. (2011). Making sense of Cronbach's alpha. *International Journal of Medical Education*, 2, 53-55. <https://doi.org/10.5116/ijme.4dfb.8dfd>
378. Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2022). *Staphylococcus Aureus*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
379. Tefiani, C., Riazi, A., Fatma, Y., Smail, A., Gago, C., Faleiro, M. L., Pedro, L., Barroso, J., Figueiredo, A. C., Megías, C., Cortés Giraldo, I., Vioque, J., & Miguel, M. (2015). *Ammoides pusilla* (Apiaceae) and *Thymus munbyanus* (Lamiaceae) from Algeria essential oils : Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Essential Oil Research*, 27, 1-9. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1006739>
380. Teklemariam, A. D., Nigussie, H., Tassew, A., Feleke, A., & Sisay, T. (2015). Isolation and phenotypic characterization of *Streptococcus uberis* from mastitic cows in and around Batu town, Ethiopia. . . Vol., 3, 14.
381. Titouche, Y., Hakem, A., Houali, K., Meheut, T., Vingadassalon, N., Ruiz-Ripa, L., Salmi, D., Chergui, A., Chenouf, N., Hennekinne, J. A., Torres, C., & Auvray, F. (2019). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6876-6884. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16208>

382. Tomazi, T., Gonçalves, J. L., Barreiro, J. R., Arcari, M. A., & dos Santos, M. V. (2015). Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3071-3078. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8466>
383. Trajkovska, B., Kochoski, L., Hajrulai-Musliu, Z., Uzunov, R., & Davkov, F. (2021). *Changes in the lactoferrin concentration at drying off period*. 8.
384. Triaux, zélie. (2019). *Développement des méthodes d'extraction et d'analyse de molécules terpéniques à action anti-inflammatoire*. Université de Strasbourg.
385. Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of Essential Oils : A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
386. Tzima, K., Makris, D., Nikiforidis, C. V., & Mourtzinou, I. (2015, mai). Potential use of Rosemary, Propolis and Thyme as Natural Food Preservatives. *Journal of Nutrition and Health*.
387. Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
388. USDA APHIS. (2008). *Dairy 2007, Part III, Reference of dairy cattle health and management practices in the United States, 2007*. <https://naldc.nal.usda.gov/catalog/46188>
389. Useni, B. A., Muller, C. J. C., & Cruywagen, C. W. (2014). Milk production of dairy cows as affected by the length of the preceding dry period. *South African Journal of Animal Science*, 44(5), 21-24.
390. Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A.-M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>
391. van Kneegsel, A. T. M., Remmelink, G. J., Jorjong, S., Fievez, V., & Kemp, B. (2014). Effect of dry period length and dietary energy source on energy balance, milk yield, and milk composition of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1499-1512. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7391>
392. Verdeguer, M., Sánchez-Moreiras, A. M., & Araniti, F. (2020). Phytotoxic Effects and Mechanism of Action of Essential Oils and Terpenoids. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(11), E1571. <https://doi.org/10.3390/plants9111571>
393. Vilar, M. J., Hovinen, M., Simojoki, H., & Rajala-Schultz, P. J. (2018). Short communication : Drying-off practices and use of dry cow therapy in Finnish dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 7487-7493. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14742>
394. Vilar, M. J., & Rajala-Schultz, P. J. (2020). Dry-off and dairy cow udder health and welfare : Effects of different milk cessation methods. *The Veterinary Journal*, 262, 105503. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105503>
395. Villard, S. (2017). *Les infections mammaires chez la vache laitière. Demarche dans le cadre du diagnostic collectif*. Campus Veterinaire de Lyon.
396. Walczak, M., Michalska-Sionkowska, M., Olkiewicz, D., Tarnawska, P., & Warzyńska, O. (2021, mai 6). Potential of Carvacrol and Thymol in Reducing Biofilm Formation on Technical Surfaces. *molecules*. *Molecules* 2021, 26, 2723. <https://doi.org/10.3390/molecules26092723>
397. Wald, R., Hess, C., Urbantke, V., Wittek, T., & Baumgartner, M. (2019). Characterization of Staphylococcus Species Isolated from Bovine Quarter Milk Samples. *Animals*, 9(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/ani9050200>
398. Wilkinson, E. L., Dann, G. M., & Smith, G. J. S. (1979). *Thyme in central Otago : A summary of studies by biology students at Dunstan High School, Alexandra*. Tussock Grasslands and Mountain Lands Institute, Lincoln College.
399. Winder, C. B., Sargeant, J. M., Kelton, D. F., Leblanc, S. J., Duffield, T. F., Glanville, J., Wood, H., Churchill, K. J., Dunn, J., Bergevin, M. d., Dawkins, K., Meadows, S., & O'Connor, A. M. (2019). Comparative efficacy of blanket versus selective dry-cow therapy : A systematic review and pairwise

- meta-analysis. *Animal Health Research Reviews*, 20(2), 217-228. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000306>
400. World Health Organization. (2017, février 27). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
401. Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2020). Epidemiological investigation of subclinical bovine mastitis in Algeria and molecular characterization of biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 283-292. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02015-9>
402. Zaatout, N., Ayachi, A., Kecha, M., & Kadlec, K. (2019). Identification of staphylococci causing mastitis in dairy cattle from Algeria and characterization of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5), 1305-1314. <https://doi.org/10.1111/jam.14402>
403. Zarrini, G., Delgosha, Z. B., Moghaddam, K. M., & Shahverdi, A. R. (2010). Post-antibacterial effect of thymol. *Pharmaceutical Biology*, 48(6), 633-636. <https://doi.org/10.3109/13880200903229098>
404. Zeghad, N., & Merghem, R. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*, 1(1), 5-11.
405. Zhao, X., Ponchon, B., Lanctôt, S., & Lacasse, P. (2019). Invited review : Accelerating mammary gland involution after drying-off in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6701-6717. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16377>
406. Žitek, T., Borjan, D., Golle, A., Knez, Ž., & Knez, M. (2021). Optimization of Extraction of Phenolic Compounds with Antimicrobial Properties from *Origanum vulgare*. *Processes*, 9(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3390/pr9061032>
407. Zobel, G., Leslie, K., Weary, D. M., & von Keyserlingk, M. a. G. (2013). Gradual cessation of milking reduces milk leakage and motivation to be milked in dairy cows at dry-off. *Journal of Dairy Science*, 96(8), 5064-5071. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6501>

Annexes

Annexe 1 : Questionnaire sur le tarissement et lutte e contre les mammites bovines

Tarissement et lutte contre les mammites bovines

Ce questionnaire élaboré par Dr. HADEF A. dans le cadre de la thèse de doctorat en sciences vétérinaires de Dr. HAMLAOUI M. W. vise la collecte d'informations sur la conduite de tarissement et le traitements des vaches tarées visant la lutte contre les mammites.

*Obligatoire

1. Adresse e-mail *

2. Commune(s) d'exercice :

3. Expérience sur terrain (en années) :

4. Taille des exploitations de bovins laitiers souvent visitées :

Vous pouvez choisir une seule réponse

Une seule réponse possible.

- < 10 vaches
- 10 à 20 vaches
- 20 à 40 vaches
- 50 vaches
- 50 à 70 vaches
- 70 à 100 vaches
- > à 100 vaches

Conduite de tarissement

5. Les vaches tarées sont-elles séparées des vaches en lactation ?

Une seule réponse possible.

- Jamais
- Rarement
- Souvent
- Toujours

6. Les vaches sont tarées :

Vous pouvez choisir une seule réponse

Une seule réponse possible.

- Brutalement *Passer à la question 8*
- Progressivement par traites intermittentes *Passer à la question 7*

Traites progressives (suite)

7. Sur combien de jours ?

Alimentation au tarissement

8. Les éleveurs distribuent-ils une ration adaptée au tarissement ?

Une seule réponse possible.

- Oui
- Non

9. Les vaches au moment de tarissement ont souvent une note d'état corporel (BCS):

Une seule réponse possible.

1 2 3 4 5

Très maigre Très obèse

Les 5 notes d'état corporel (BCS)



BCS = 1



BCS = 2



BCS = 3



BCS = 4



BCS = 5

Traitement au tarissement

10. Les éleveurs vaccinent-ils les vaches au tarissement contre certaines pathologies infectieuses ?

Une seule réponse possible.

- Jamais
 Rarement
 Souvent
 Toujours

11. Connaissez-vous des vaccins contre les mammites commercialisés en Algérie ?

Une seule réponse possible.

- Oui
 Non

12. Connaissez-vous des éleveurs qui vaccinent au tarissement les vaches contre les mammites ?

Vous pouvez choisir une seule réponse

Une seule réponse possible.

- Non
 Oui, mais ils ne sont pas nombreux
 Oui, ils sont nombreux

13. Recommandez-vous la vaccination contre les mammites ?

Une seule réponse possible.

- Oui
 Non

14. Les éleveurs demandent-ils des antibiotiques à usage hors lactation (tarissement) pour lutter contre les mammites ?

Une seule réponse possible.

- Jamais
- Rarement
- Souvent
- Toujours

15. Durant le tarissement, traitez-vous avec des antibiotiques :

Une seule réponse possible.

- Systématiquement toutes les vaches *Passer à la question 17*
- Sélectivement certaines vaches (traitement ciblé)

Sélection des vaches tarées pour traitement

16. Comment sélectionnez-vous les vaches qui recevront des antibiotiques par voie intramammaire au moment du tarissement ?

Vous pouvez choisir une ou plusieurs réponses

Table 01: Grid interpretation of CMT (after LEVESQUE, 2004.)

Grade	Signification	Description de la réaction	Interprétation (colibactérie)
	N Négatif	Le mélange demeure liquide et homogène. Le godet se vide goutte à goutte.	0 - 200 000
	T Trace +	Le mélange devient légèrement visqueux. La réaction est réversible, la viscosité tend à disparaître.	150 000 - 500 000
	1 Faiblement positif ++	Le mélange devient visqueux sans formation de gel au centre et la viscosité tend à persister. Le mélange quelque épais, se vide graduellement.	400 000 - 1 500 000
	2 Clairement positif +++	Formation d'un gel qui tend à se retrouver au centre du godet. Il y a un mouvement de rotation de la palette. Le gel recouvre le fond du godet si on agit de travers. Si on verse le mélange, la masse gélatineuse tombe et peut laisser du liquide dans le godet.	800 000 - 1 000 000
	3 Fortement positif ++++	Formation d'un gel au centre du godet qui s'adhère pas au pourtour mais au fond du godet. Si on verse le mélange, celui-ci tombe d'un coup sans laisser de liquide.	> 1 000 000

Two scores are possible(see figure 2) :

► Positive viscosity of the mixture and a precipitate even discreet.

► Negative: absence of viscosity and precipitate.

In our study using CMT / Teepol of RAIDEX.

Plusieurs réponses possibles.

- CMT "N" négatif
- CMT "T" trace
- CMT "1" faiblement positif
- CMT "2" clairement positif avec score élevé
- CMT "3" fortement positif
- Signes cliniques de mammite (grumeaux dans le lait, nodules, ...)
- Après analyse bactériologique du lait
- Historique des mammites (cas antécédents, Récidives)

Autre : _____

Antibiothérapie au tarissement

17. Commencez-vous le traitement par antibiotiques :

Vous pouvez choisir une seule réponse

Une seule réponse possible.

- Une semaine avant le tarissement
- Au premier jour de tarissement
- Durant la première semaine de tarissement

18. Administrez-vous les antibiotiques par :

Vous pouvez choisir une seule réponse

Une seule réponse possible.

- Infusion intramammaire (IMM) uniquement
- Infusion IMM en association avec la voie générale même en absence de mammite clinique
- Infusion IMM en association avec la voie générale si présence de mammite clinique
- Infusion IMM en association avec la voie générale si présence de mammite clinique avec atteinte de l'état général

19. Quelle spécialité antibiotique intramammaire utilisez-vous souvent au tarissement ?

Vous pouvez choisir une ou plusieurs réponses

Plusieurs réponses possibles.

- Rilixine HL®
- Cpraviv®
- Facel HL®
- Céfovet HL®
- Virbactan®
- Orbenin HL®
- Cloxine HL®
- Orbenor HL®
- Cloxagel HL 500®
- Mastistar HL®
- Nafpenzal T®
- Fatrox®
- Speciorlac®

Autre : _____

20. Quelle spécialité antibiotique parentérale utilisez-vous souvent au tarissement ?

Vous pouvez choisir une ou plusieurs réponses

Plusieurs réponses possibles.

- Spirovet®
- Suanovil®
- Tylan 200®
- Tylaxen®
- Pharmasin®
- Stop M®
- Ubrostar®
- Pénéthaone®

Autre : _____

21. Est-ce que les trayons sont nettoyés et asséchés avant l'infusion d'antibiotiques ?

Une seule réponse possible.

- Oui
- Non

22. Utilisez-vous une insertion partielle (embout court) ?

Une seule réponse possible.

- Oui
- Non

23. Appliquez-vous un bain de trayon après l'infusion d'antibiotiques et/ou de scellant ?

Une seule réponse possible.

- Oui
- Non

Efficacité des Antibiotiques

24. Les vaches saines ayant reçu une infusion intramammaire d'antibiotiques au tarissement, présentent-elles de mammites durant le tarissement ?

Une seule réponse possible.

- Jamais
 Rarement
 Souvent
 Toujours

25. Les vaches saines ayant reçu une infusion intramammaire d'antibiotiques au tarissement, présentent-elles de mammites durant les premiers jours post-partum ?

Une seule réponse possible.

- Jamais
 Rarement
 Souvent
 Toujours

26. Les vaches atteintes de mammites au tarissement et ayant reçu une infusion d'antibiotique, présentent-elles des nouvelles infections durant le tarissement ?

Une seule réponse possible.

- Jamais
 Rarement
 Souvent
 Toujours

27. Réalisez-vous des analyses bactériologiques si les vaches présentent de récurrences ou de nouvelles infections mammaires ?

Une seule réponse possible.

- Jamais
 Rarement
 Souvent
 Toujours

Complément/alternatif aux antibiotiques au Tarissement

28. Utilisez-vous des obturateurs de trayons (barrière physique) ?

Vous pouvez choisir une seule réponse

Une seule réponse possible.

- Non
 Oui, pour remplacer les antibiotiques
 Oui, parfois pour compléter le traitement aux antibiotiques
 Oui, systématiquement comme complément aux antibiotiques

29. Acceptez-vous le remplacement des antibiotiques par un autre moyen de lutte contre les mammites

Une seule réponse possible.

- Oui
 Non

30. Les éleveurs utilisent-ils des plantes médicinales (phytothérapie) pour traiter les mammites ?

Une seule réponse possible.

- Tout à fait fréquemment
 Plutôt fréquemment
 Plutôt pas fréquemment
 Pas du tout fréquemment

31. Connaissez-vous des produits commercialisés en Algérie contenant des huiles essentielles de plantes pour lutter contre les mammites ?

Une seule réponse possible.

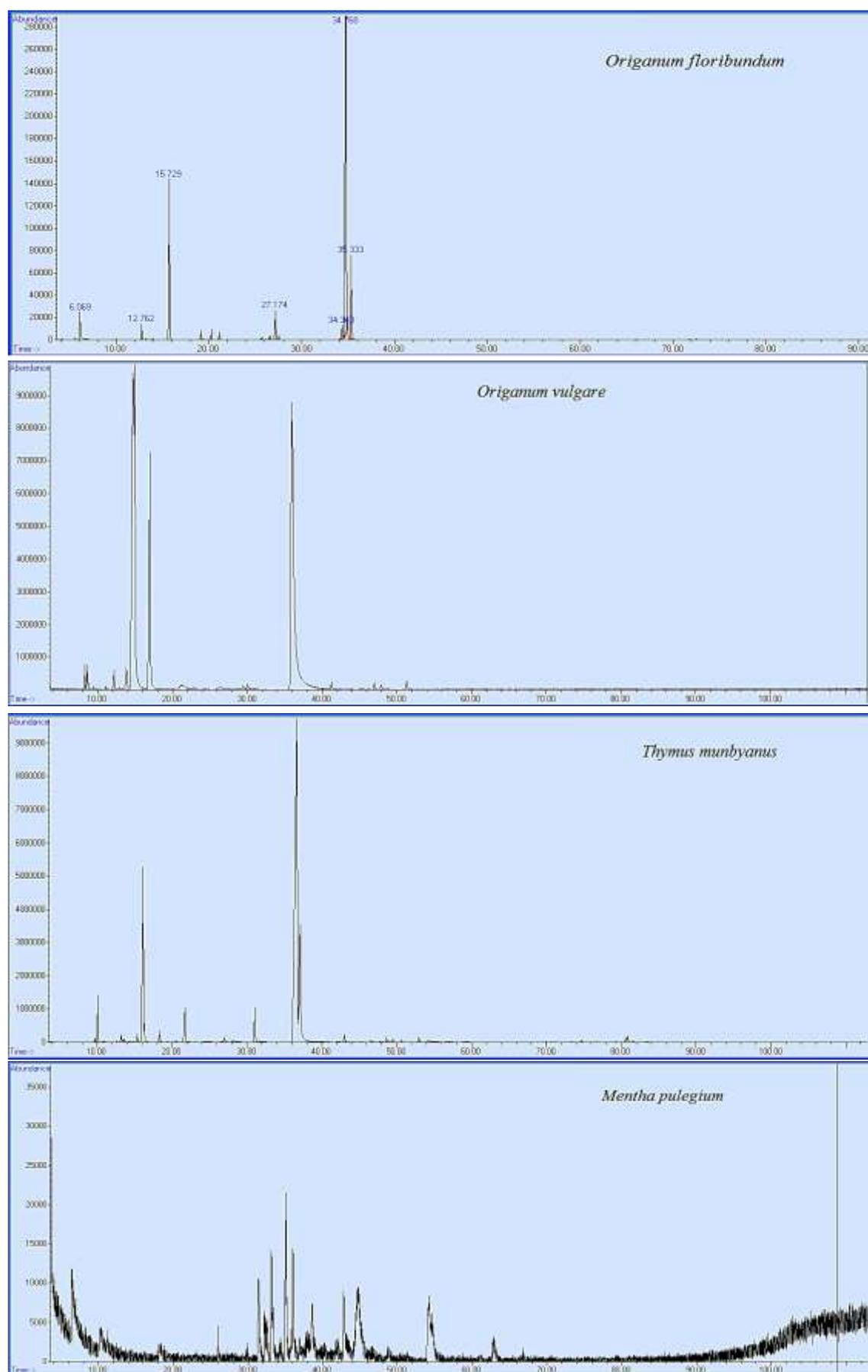
- Oui
 Non

32. Acceptez-vous l'usage des huiles essentielles de plantes médicinales "aromathérapie" pour lutter contre les mammites ?

Vous pouvez choisir une seule réponse

Une seule réponse possible.

- Oui, pour remplacer les antibioiques
 Oui, comme complément à l'antibiothérapie
 Non

Annexe 2 : Profil chromatographique des huiles essentielles de Menthe, Thym, et Origan

Publications

DRY COW ANTIMICROBIALS USE TO CONTROL MASTITIS IN NORTHERN ALGERIA

Uso de antimicrobianos en vacas secas para controlar la mastitis en el Norte de Argelia

Mohamed Walid Hamlaoui ^{1,2}, Ahmed Hadeif ^{2,3*}, Fawzi Rostane Meklati ⁴, Imane Bitat ³

¹ Institute of Veterinary Sciences, Frères Mentouri University of Constantine, El Khroub, Constantine, Algeria.

² Laboratory of Development and Control of Hospital Pharmaceutical Preparations, Faculty of Medicine, Badji Mokhtar University of Annaba, Algeria

³ Department of veterinary sciences, Faculty of nature and life sciences, University Chadli Bendjedid- El Tarf, El Tarf, Algeria.

⁴ Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), BP 384, Bou-Ismail, 42004, Tipaza, Algeria

* Corresponding author: Ahmed Hadeif, e-mail: hadeif_vet@yahoo.fr, hadeif-ahmed@univ-eltarf.dz

Recibido: 12/12/2021

Aceptado: 19/12/2021

Publicado: 31/12/2021

ABSTRACT

The control of mastitis is a crucial step in the preparation of the next lactation in dairy cows. In order to assess the practices and attitudes surrounding the use of antimicrobials at dry-off, a survey was conducted among veterinary practitioners in fifteen provinces of Northern Algeria. The results revealed that 45.95% of the farms followed by the respondents were rather small in size comprising about ten cows per farm and that a large majority of the farmers practised gradual drying off (72.97%) without adjusting the feed ration (70.27%) to this stage. Antibiotic dry cow therapy (DCT) was a common practice and selectively performed in 86.49% of cases regardless of udder health status. Cefalexin was the most infused intra-mammary (IMM) antibiotic (40.54%), while tylosin was the one favoured for parenteral administration (48.15%). Analysis of factors influencing the antibiotic DCT efficacy showed that a frequent (13.51%) occurrence of new intramammary infections (IMIs) was related to farmers' attitudes (self-medication) and the policy of blanket DCT. Although the use of a teat sealant was uncommon (71.43%) in the farming traditions, the substitution of antibiotics seems to be a plausible prospect, since the majority of participants (89.19%) agreed with the implementation of aromatherapy concept at dry-off, mainly as a complement to antibiotics. This survey gives an overview of risk practices regarding mastitis management in northern Algeria. Hence, further zootechnical, veterinary and organizational efforts need to be made to promote animal production and welfare as well as public health through improved udder health.

Keywords: Alternative therapy, Antibiotics, Dry Cow, Mastitis, Survey.

RESUMEN

El control de la mastitis es un paso crucial en la preparación de la siguiente lactación en vacas lecheras. Para evaluar las prácticas y actitudes en torno al uso de antimicrobianos en el momento del secado, se llevó a cabo una encuesta entre los veterinarios de quince provincias del norte de Argelia. Los resultados revelaron que el 45,95% de las explotaciones seguidas por los encuestados eran bastante pequeñas, con unas diez vacas por explotación, y que una gran mayoría de los agricultores practicaba el secado gradual (72,97%) sin ajustar la ración alimenticia (70,27%) a este escenario. La terapia de vacas secas (DCT) con antibióticos fue una práctica común y se realizó selectivamente en el 86,49% de los casos, independientemente del estado de salud de la ubre. La cefalexina fue el antibiótico más infundido por vía intramamaria (40,54%), mientras que la tilosina fue la preferida para la administración parenteral (48,15%). El análisis de los factores que influyen en la eficacia de la DCT mostró que la aparición frecuente (13,51%) de nuevas infecciones intramamarias (IMI) estaba relacionada con la actitud de los ganaderos (automedicación) y la política de DCT general. Aunque el uso de un sellador de pezones era infrecuente (71,43%) en las tradiciones ganaderas, la sustitución de los antibióticos parece ser una perspectiva plausible, ya que la mayoría de los participantes (89,19%) estaban de acuerdo con la aplicación del concepto de aromaterapia en el secado, principalmente como complemento de los antibióticos. Esta encuesta ofrece una visión general de las prácticas de riesgo relativas a la gestión de la mastitis en el norte de Argelia. Por lo tanto, es necesario realizar más esfuerzos zootécnicos, veterinarios y organizativos para promover la producción y el bienestar de los animales, así como la salud pública mediante la mejora de la salud de las ubres.

Palabras clave: Terapia alternativa, antibióticos, vaca seca, mastitis, encuesta.

INTRODUCTION

Drying-off practices to control mastitis differ between countries and herds, including the use of antibiotic dry cow therapy (DCT) and teat sealants (Vilar and Rajala-Schultz, 2020). The policy of antimicrobial control of mastitis in the world is an important part of the «One World, One Health» concept (Garcia et al., 2019). As a point of udder health control plans, the use of antibiotics during the dry period aims to eliminate mammary infection developed during lactation and to prevent the occurrence of new intramammary infections (IMIs) during this stage (Bradley and Green, 2001). These new IMIs and the related expenses with antibiotic treatment were considered as important determinants of the cost of mastitis during the dry period (Huijps and Hogeveen, 2007).

Mastitis management during the dry period is based on two essential practices, systematic antibiotherapy named blanket DCT and selective DCT without (Østerås et al., 1991) or with a teat sealant way (Cameron et al., 2015). DCT is an established herd management practice and, although the response to treatment is in some cases lacking or disappointing, and its use nevertheless decreases the infection level and provides an additional tool of reducing the level of exposure to uninfected cows (Blowey and Edmondson, 2010) and it remains effective in mastitis control as reported in Finnish dairy herds (Niemi et al., 2021).

The decision to dry-off cows using either antibiotherapy strategies depends also on the individual farmer's perception and dairy farms economic criterion (Huijps and Hogeveen, 2007).

In Algeria, the policy of antimicrobial control of mastitis during the dry period is not yet well defined. Given that the livestock management of dairy cows is mainly focused in the north of the country (Meklati et al., 2020), the present survey aims to characterize the practice of mastitis antimicrobial control experienced by northern Algeria veterinary practitioners during this critical reproductive stage considering the possible factors influencing the DCT efficacy.

MATERIAL AND METHODS

The questionnaire

Due to the confinement imposed in Algeria as a result of the COVID-19 pandemic and the restrictions on movement between the regions involved in this study, and in order to facilitate the proper conduct of our survey among veterinarians in northern Algeria, an online questionnaire was created via Google forms® (<https://forms.gle/ubFUz6zzYq1xNyRA8>).

The survey consists of 31 questions comprising short answers, multiple-choice, dropdown, linear scale and check box questions. The questionnaire was enriched with illustrations to provide information on two indicators, the Body Condition Score (BCS) and the California Mastitis Test (CMT).

A non-exhaustive list of marketed antibiotics for local intramammary or systemic administration to dry cows was used to define molecules frequently used by veterinarians. However, for ethical reasons, the analysis and presentation of the results were limited to the International Nonproprietary Names (INNs)

and the name of the antibiotic family without citing the trade names.

Topics addressed by the questionnaire

The technical questions focused on the following points:

- Dry period management including the feeding status
- Approaches adopted by farmer to control mastitis
- Characteristics of dry cow therapy (DCT practice);
- DCT efficacy;
- Solutions aimed to reduce the use of antibiotics through alternatives or complements to antibiotic therapy (teat sealant, phytotherapy and aromatherapy).

Target population

The target population was veterinarians practicing in mixed or rural areas only, some of whose Electronic addresses are collected from the provinces' agricultural services directorate. This selection is justified by the possibility of access to several farms by a single veterinarian and consequently, hundreds of dairy farms will be covered by this questionnaire.

Participation rate

The number of responses obtained after 18 months (first response received on 15 April 2020, last response received on 7 October 2021) was 37. All respondents completed at least 96 % of the questionnaire.

Participant's localization

The survey covered the whole of northern Algeria where 15 provinces are represented. The majority of the veterinarians who filled in the survey are located in the northeast of Algeria. Constantine, Skikda and Oum El Bouaghi are the most represented districts (Figure 1).



Figure 1. Geographic location of respondents in northern Algeria.

Statistical analysis

Responses of participants in the survey were analysed using IBM SPSS Statistics 26 software. Descriptive analysis of categorical variables involving the frequencies and confidence intervals of each category was established by the binomial nonparametric test. The estimate will be the observed proportion.

The relationship between qualitative variables categories (Dry period management, DCT practice, and DCT efficacy) was explored using the Multiple-correspondence analysis (MCA) demonstrating the results in graphical dimensions. Furthermore,

the discrimination measures were developed and the category quantification plots were applied to identify category associations.

Hierarchical Cluster analysis (HCA) was performed to classify all Responders (v1 to v37) into groups. These clusters were obtained from the two MCA dimensions object scores using the method of squared Euclidean distance. The cluster solution was selected considering the solution explained equals or exceeds 5% of the dependent variables compared to the previously applied solution. The relevant variables in the MCA discriminating the dimensions 1 and 2 were compared between and within derived clusters comprising at least two subjects using Crosstabulations.

RESULTS AND DISCUSSION

Dry period management

Table 1. Characteristics of dry period management in the herds covered by the survey participant in northern Algeria.

Dry period management	Question choices	Missing data	Frequency (n)	Estimate (%)	95% Confidence Interval	
					Lower	Upper
Herd size			37			
	< 10 cows		17	45.95	29.49	63.08
	10 to 20 cows		13	35.14	20.21	52.54
	20 to 40 cows		4	10.81	3.03	25.42
	50 to 70 cows		2	5.41	0.66	18.19
	> 100 cows		1	2.70	0.07	14.16
Separation of dry cows from lactating cows			37			
	Never		13	35.14	20.21	52.54
	Rarely		20	54.05	36.92	70.51
	Often		3	8.11	1.70	21.91
	Always		1	2.70	0.07	14.16
Drying off management			37			
	Abruptly		10	27.03	13.79	44.12
	gradual cessation		27	72.97	55.88	86.21
Milk cessation length		12	25			
	0-7 days		11	44.00	24.40	65.07
	10 days		4	16.00	4.54	36.08
	15 days		4	16.00	4.54	36.08
	20 days		3	12.00	2.55	31.22
	25 days		1	4.00	0.10	20.35
	30 days		2	8.00	0.98	26.03
Ration adapted to the dry period			37			
	No		26	70.27	53.02	84.13
	Yes		11	29.73	15.87	46.98
BCS at drying off		1	36			
	BCS = 2		4	11.11	3.11	26.06
	BCS = 3		25	69.44	51.89	83.65
	BCS = 4		5	13.89	4.67	29.50
	BCS = 5		2	5.56	0.68	18.66

Herd size

The dairy herds covered by the veterinarians who contributed to the survey vary in size, from less than 10 cows per farm (45.95%) to more than 100 cows for the largest farm (2.70%). The national milk production is ensured up to 70% by the bovine livestock, with the implementation of a semi-intensive production system (modern dairy cattle) which provides most of the production through a herd consisting of high genetic potential imported cows. On the other hand, the extensive production system (Enhanced dairy cattle) is ensured by crossbreeding between local and imported cows, distributed in small-size dairy farms (1-6 cows) as reviewed by Meklati et al. (2020). The characterization and typology of dairy farming systems studied through the survey of Boukhechem et al. (2019), involving 217 dairy farms located in northern Algeria, revealed an average of 18.6 cows/farm. The high average (35.14%) herd size (10-20 cows/farm) recorded in our findings is in agreement with these authors.

Table 2. Approaches adopted by farmer to control mastitis in surveyed area.

Dry approaches for mastitis control	Question choices	Missing data	Frequency (n)	Estimate (%)	95% Confidence Interval	
					Lower	Upper
Use of infectious diseases vaccination by farmers	Never		37			
	Rarely		10	27.03	13.79	44.12
	Often		20	54.05	36.92	70.51
	Always		6	16.22	6.19	32.01
Knowledge of marketed mastitis vaccines			1	2.70	0.07	14.16
	No		37			
	Yes		30	81.08	64.84	92.04
			7	18.92	7.96	35.16
Farmers use of Mastitis vaccination		1	36			
	No		33	91.67	77.53	98.25
	Yes, but infrequently		3	8.33	1.75	22.47
Recommendation of mastitis vaccination		1	36			
	No		14	38.89	23.14	56.54
	Yes		22	61.11	43.46	76.86
Farmers' request for intramammary antibiotics dry cow therapy			37			
	Never		5	13.51	4.54	28.77
	Rarely		16	43.24	27.10	60.51
	Often		13	35.14	20.21	52.54
	Always		3	8.11	1.70	21.91

Gradual and abrupt cessation of milking at dry-off

The results of the survey show that only 27.03% of the farmers in the study area ceased milking abruptly while 72.97% practiced a gradual drying off. This important part of breeding practices in relation to udder health remains lower than that obtained (95.65%) by Kebbal et al. (2020) from a descriptive study conducted on 92 farms located in Blida, a province in northern Algeria not covered by the present survey. This drying off management is also widespread (73%) in Germany, according to the questionnaire conducted by Bertulat et al. (2015) and filled in by 91 farmers.

Milk cessation is a crucial process to consider, mainly in high-producing animals (Gott et al., 2017). Indeed, high risks of new IMIs in the cow at the beginning of the dry period have been associated with dilation within the udder cisterns due to the high pressure exerted by the excessive accumulation of milk following abrupt drying off; especially since high producing cows undergoing this type of drying off are more susceptible to milk leakage (Vilar and Rajala-Schultz, 2020). This can be limited by a gradual decrease in milking to reduce the occurrence of IMIs during the dry period and at the early new lactation (Gott et al., 2017).

The survey shows a non-separation of dry and lactating cows in 35.14% of the farms, which is lower than the 65.22% obtained by Kebbal et al. (2020). Furthermore, the majority of farmers (70.27%) did not respect a ration adapted to the dry cows requirements, which could be explained by the fact that most farmers distributed to animals a feed ration without any formulation or nutritional strategy adapted to their real needs

and physiological state (Meskini et al., 2021). Although this, dry cows often (69.44%) had an adequate body condition score (BCS = 3), indicating the preservation of the animal's welfare in terms of feeding at this period compared to those recorded (2.73 ± 0.43) in Holstein dairy cows during the second month of the dry period in north-eastern Algeria by Hadeif et al. (2021).

Farmers' approaches to mastitis control

Farmers' request for dry cow intramammary antibiotic (self-medication)

Respondents noted that 27.03% of farmers are totally uninterested in vaccination campaigns for cattle, while 54.05% of farmers rarely participate. These campaigns, which are generally free of charge, were mainly initiated in recent years following the resurgence of cases of foot-and-mouth disease and because of the economic losses incurred (Meklati et al., 2020; Meskini et al., 2021). This recalcitrance of farmers is also reflected in the fact that a large majority of them do not vaccinate against mastitis (91.67%). This is probably explained by the lack of marketing of this type of vaccine on the veterinary medicine market, as observed by practitioners (81.08%).

The survey showed the significant presence of mastitis at dry-off on the dairy farms covered by the veterinarians interviewed since about 43.25% of the farmers request intramammary antibiotics (IMM ATB) to control mastitis at this period, nevertheless, the assessment of its prevalence through

epidemiological studies at dry-off in Algerian dairy herds has not often been published.

However, more than half (56.75%) of the respondents stated that farmers claim little or no antibiotic treatment at dry-off. This result is very close to the one noted (52.17%) by Kebbal et al. (2020). It can be explained by the abusive use of self-medication. This practice is unfortunately very frequent in emerging countries and more particularly in Africa where veterinary drugs are sold over the counter, encouraging the development of antibiotic resistance (Ssajakambwe et al., 2017; Titouche et al., 2019). These results reported in our survey reflect a marked lack of farmer training (Kebbal et al., 2020; Layada et al., 2016), compounded by insufficient veterinary awareness about the importance of managing dry-off and the use of antibiotic therapy during this period.

The dry cow therapy

The results resumed in Table 3 showed that only 13.51% of the veterinarians surveyed treat dry cows systematically regardless of their udder health status (blanket DCT), while the majority (86.49%) select cows for treatment at dry-off (selective DCT). These results are similar to those found in the survey conducted by Vilar et al. (2018) in Finnish dairy herds with a dominance of selective DCT (78%) over the use of blanket DCT. This is in contrast to what has been observed in some industrialized countries such as Germany (Bertulat et al., 2015) where 79.6% of the dairy farms studied apply the blanket antibiotic DCT.

Among respondents using selective DCT, 77.4% of treat cows for obvious clinical signs of mastitis (e.g. presence of lumps in the milk); 32.26% based on the CMT score corresponding to a somatic cell count greater than or equal to 400,000 cells/mL. Furthermore, dry cows with recurrent mastitis were in the selected group in 45.16% of cases (Figure 2). However, the use of bacteriological tests for selective therapy was low (12.9%). Field and financial considerations related to sampling and examination of milk from all dry cows may explain this poor use of bacteriological testing. The very limited use of this practice is supported by the results (31%) obtained by Bertulat et al. (2015). Conversely, in Finnish dairy farms characterized by a selective DCT, microbiological testing was the preferred method for selecting cows before treatment at the dry-off (82%), followed by other selection criteria, clinical mastitis history and high somatic cell count (Vilar et al., 2018).

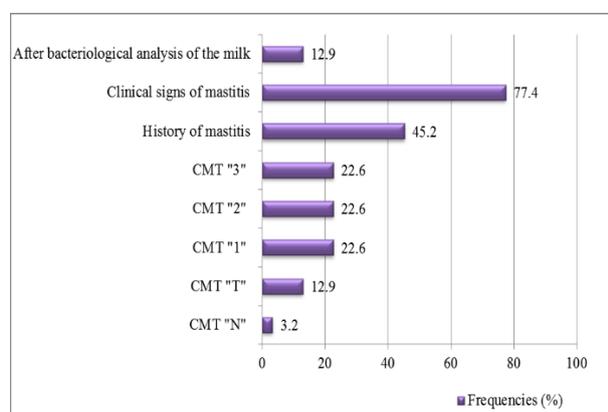


Figure 2. Selection criteria for the dry cow therapy. CMT "N": negative, CMT "T": trace, CMT "1": weakly positive, CMT "2": clearly positive with high score, CMT "3": strongly positive.

Beginning of antibiotic therapy at dry-off

The survey showed that 62.50% of the veterinarians questioned start antibiotic therapy during the first week of dry-off, while only 25% initiate it on the first day allowing them to take advantage of this approach (Table 3). In addition, 44% of the farms covered by the survey practised milk cessation length within one week (Table 1). Conceptually, according to these findings, treatment of cows at the beginning of the dry period should not result in high levels of antibiotic residues in colostrum or milk if the manufacturer's instructions and dosages were respected. However, encouraged in Algeria by their low cost, an excessive use noticed within a self-medication framework by some farmers in the lack of any veterinary supervision (Layada et al., 2016) and without the slightest respect of withdrawal periods (Titouche et al., 2013), had the effect of favouring their presence in milk with a major risk for human health as a consequence (Titouche et al., 2019). The non-separation of animals, as reported in this survey (Table 1), increases the risk of accidental entry into the milking parlour of cows under antibiotherapy resulting in contamination of the milk (Lievaart et al., 2005). Other hazardous practices conducted by some farmers demonstrated that the contaminated milk collected during antibiotic DCT was not discarded by these latter, but rather fed to calves with a risk at the animal scale but also at the end of the food chain for Humans (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al., 2017).

Applying antibiotic treatment on the day of drying off can significantly reduce the proliferation of mastitis pathogens (Krömker and Leimbach, 2017).

Intramammary and parenteral dry cow antibiotherapy

The number of veterinarians using exclusively the intramammary route for the treatment of mastitis in dry cows, even in the presence of clinical mastitis was low (18.92%), as was that of 13.51% veterinarians who combined the systemic and local routes despite the absence of clinical mastitis (Table 3). The combination of these two routes has a positive effect and can eliminate more germs than the local route alone. The association between these two modalities revealed in the present investigation seemed to be conditioned by the impairment of the general condition of the animals during clinical mastitis in 32.43% of cases. These disparities in the answers provided could be explained by differences in mastitis management from one farm to another. Indeed, few farmers initiate treatment as soon as the first symptoms appear, but rather when the signs of clinical mastitis are accompanied by a decline in the animal's general condition. This was also confirmed by the work of Kebbal et al. (2020) who noted that mastitis was a serious problem in the Algerian studied farms. However, our survey showed that the intra-mammary infusion was the preferred route alone or in combination with systemic administration and regardless of the form of the disease, which is consistent with the results of a survey conducted in France among 523 farms (Gay et al., 2002). These authors reported the use of the intramammary route in combination with the parenteral route independently of the clinical picture in less than 40% of cases. Also, in the United Kingdom, Fujiwara et al. (2018) found that a large majority (95.9%) of the surveyed farms use antibiotic dry cow intramammary tubes at dry-off including 82.2% in combination with internal and/or external sealants.

Frequency of molecules and family of antibiotics used as IMM dry cow therapy

The results revealed that 40.54% of veterinarians used exclusively cefalexin (LEX) for intramammary treatments (Figure 3), which was combined with other molecules by 24.32% of respondents. Cefalonium (CNM) is the second most used molecule through the local route (10.81%). The rate of infusion of one molecule or another varies according to the region (country) and the physiological stage (drying off or lactation). For example, in England and Wales the survey conducted by Brunton et al. (2012) in 2010/2011 at the dairy farm level showed that 96% used intramammary antibiotics at dry-off where cefalonium, a first-generation cephalosporin, was the most frequently used molecule (43%). Considering the physiological stage, dry-cow antibiotics are long-acting and are intended for animals that are not expected to produce milk. According to the survey conducted in France (between June 1999 and January 2001), the most commonly used product to treat clinical mastitis in dairy cows by the intra-mammary route was a commercial product that combined three antibiotics (tetracycline, neomycin and bacitracin) and an anti-inflammatory (prednisolone). This combination was used by 57.2% of respondents, followed by the two-antibiotic combination amoxicillin and clavulanic acid (AMC) with a frequency of 15% (Gay et al., 2002). However, the study of the prevalence of lactating intramammary (IMM) antibiotics conducted by Burke and Adley (2021) revealed that the AMC combination was preferred at the first intention in 34% of Irish dairy farmers. They also reported that aminoglycosides with formulations marketed as a combination of two products, the first one combined novobiocin, dihydrostreptomycin and neomycin; the second one contained kanamycin and cefalexin, completed the ranking with 31% and 16% respectively.

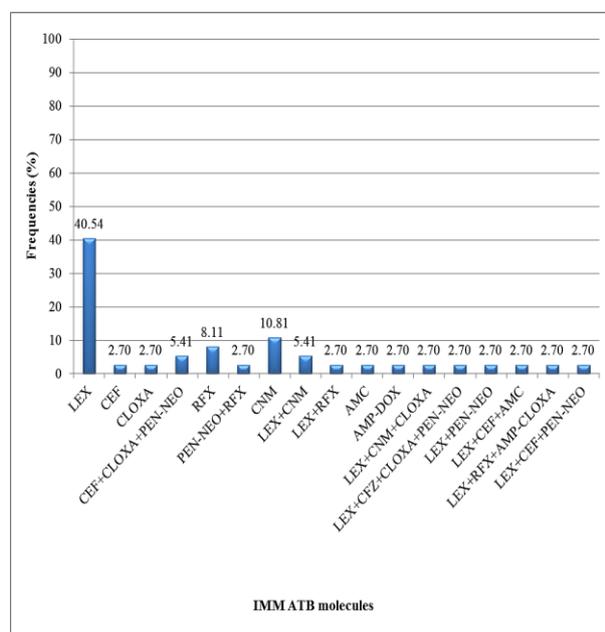


Figure 3. Molecules of intra-mammary antibiotics dry cow therapy. AMC : Amoxicilline + acide clavulanique ; AMP-CLOXA : Ampicillin+cloxacillin ; CEF- DOX : Ampicillin+Dicloxacillin ; CEF: Cefquinome; CFZ: Cefazoline; Cl: Colistine; CLOXA : Cloxacillin ; CNM: Cefalonium; LEX: Cefalexine; PEN-NEO: Benzylpenicilline + Neomycin; RFX: Rifaximin.

As shown in Figure 4, β -lactams were the most commonly used antibiotics at drying off by the veterinarians questioned with a frequency of 72.97%. Concerning the combination of two or more families of antibiotics, the results show that the combination of β -lactam and aminoglycosides was the most frequently formulated with a percentage of 10.81%. In a survey conducted in Pennsylvania (USA) on antibiotics used for the treatment of various diseases in dairy cows, beta-lactams were the most used antibiotics for the treatment of mastitis in dry cows (Sawant et al., 2005). The nature of the majority antibiotic range is largely determined by the attitudes of veterinarians and farmers. In the Netherlands, there has been an increasing trend in recent years to reduce the use of drugs by Dutch dairy veterinarians for the treatment of mastitis (Scherpenzeel et al., 2018). However, it was noted in this country from 2005 to 2012, that farmers were reluctant to reduce the use of molecules such as narrow-spectrum penicillins (narrow-spectrum) or certain combinations (Procaine benzylpenicillin-aminoglycoside) during the dry period (Kuipers et al., 2016). The latter reported low use of beta-lactams such as third and fourth generation cephalosporins (0.21% in 2005-2010 to 1.17% in 2011) against an evolution towards the penicillin-aminoglycoside combination as DCT between 2005-2010 (14.17%) and 2012 (22.91%).

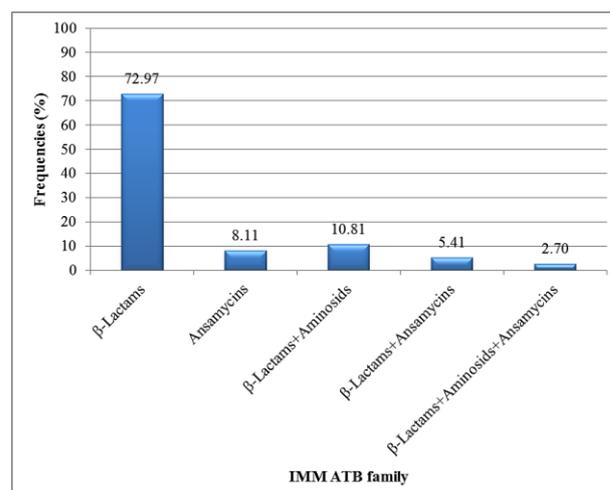


Figure 4. Family of intra-mammary antibiotics dry cow therapy.

Frequency of molecules and family of antibiotics used as parenteral dry cow therapy

Regarding parenterally administered molecules, tylosin is the most frequently used alone (48.15%) or in combination with other molecules such as spiramycin and penethamate, 11.11% and 7.41% respectively. Spiramycin, ranked second, was used alone by only 7.41% of the vets surveyed (Figure 5). These results are similar to those obtained by Brunton et al. (2012), as tylosin was most frequently (27.4%) cited by respondents using a system antibiotic, followed by the combination of dihydrostreptomycin, procaine penicillin (PEN-S) with a 20.7%. Conversely, according to a survey conducted in France, spiramycin is the most commonly used systemic antibiotic for the treatment of mastitis followed by tylosin (Gay et al., 2002). As also noted in this survey, the use of sulphadiazine-trimethoprim (SFD-T) (3.9%), amoxicillin (2.7%) and cefalexin (0.7%) was found by Brunton et al. (2012) to be rather limited.

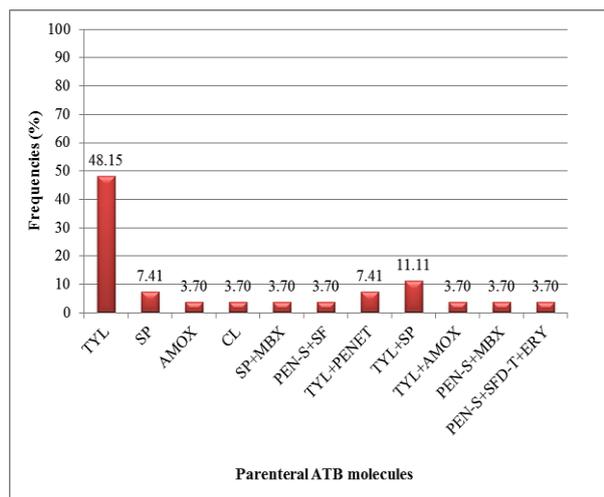


Figure 5. Molecules of parenteral antibiotics dry cow therapy. AMOX : Amoxicillin ; CL: Colistine; ERY: Erythromycin; LEX: Céfalexine; PENET: Penethmate; PEN-S: Benzylpenicillin+Dihydrostreptomycin; SF : Sulfamide ; SFD-T: Sulfadimidine- Triméthoprine ; SP: Spiramycin; TYL: Tylosine.

For antibiotics DCT administered via parenteral route, macrolides are the most frequently used family (66.67%), while the combination of a macrolide with a β -lactam was formulated by 11.11% of the practitioners surveyed (Figure 6). The combination of a systemic antibiotic, notably belonging to the macrolide family, with an antibiotic DCT has been reported by Breen et al. (2011) as a veterinarian-recommended approach to improve the success rate of treatment of an existing IML.

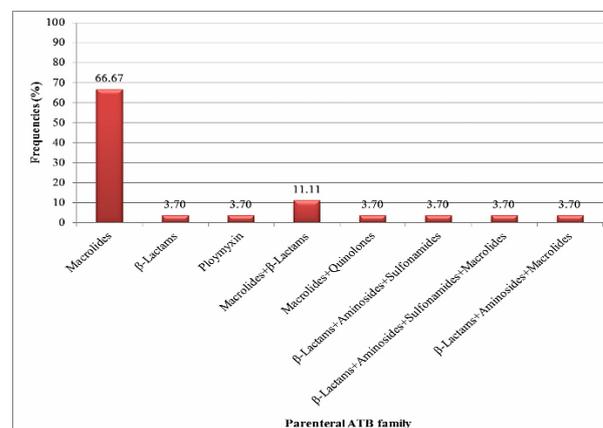


Figure 6. Family of parenteral antibiotics dry cow therapy.

Table 3. Characteristics of dry cow therapy in the herds covered by the survey participant in northern Algeria.

Dry cow therapy characteristics	Question choices	Missing data	Frequency (n)	Estimate (%)	95% Confidence Interval	
					Lower	Upper
Dry cow therapy policy	Selective therapy		37			
	Blanket therapy		32	86.49	71.23	95.46
			5	13.51	4.54	28.77
Dry cow therapy commencement	drying off first day	5	32			
	during the first week of drying off		8	25.00	11.46	43.40
	one week before the drying off		20	62.50	43.69	78.90
			4	12.50	3.51	28.99
Dry cow therapy modality	IMM Infusion + parenteral injection with or without clinical mastitis		37			
	IMM Infusion + parenteral injection if clinical mastitis		5	13.51	4.54	28.77
	IMM Infusion + parenteral injection with or without clinical mastitis with general symptoms		13	35.14	20.21	52.54
	IMM Infusion only		12	32.43	18.01	49.79
Teat cleaning and scrubbing before IMM infusion	No		7	18.92	7.96	35.16
	Yes		37			
Partial insertion at infusion	No	3	34			
	Yes		2	5.41	0.66	18.19
			35	94.59	81.81	99.34
Teat-dip after IMM infusion and or sealant use	No		34			
	Yes		24	70.59	52.52	84.90
			10	29.41	15.10	47.48
Teat-dip after IMM infusion and or sealant use	No		37			
	Yes		30	81.08	64.84	92.04
			7	18.92	7.96	35.16

Dry cow therapy practice

The results show that cleaning and scrubbing of teats before infusion of antibiotics is followed by the majority of practitioners (94.59%). However, only 29.41% of the vets took care that the tube cannula was partially inserted during treatment, while the application of a teat-dip after infusion and/or sealant use was not a regular practice (18.92%). These findings are markedly different from those recorded by McDougall (2003) involving 158 dairy herd owners in the Waikato region (New Zealand), who found that two thirds (65.8%) of them practised a partial insertion of DCT syringe cannula. Furthermore, this author noted that only 15.2% of the farmers did not perform any teat preparation before infusion of DCT, while the vast majority (82.9%) used a teat spray after infusion. The deep insertion of the syringe cannula into the teat canal can cause erosion of the keratin layer inside and thus reduce the effectiveness of the natural defences of the mammary gland. This natural barrier is of vital importance in preventing infections. In addition, some compounds (fatty acids, proteins) naturally present in the keratin layer serve to safeguard the teat canal (Gruet et al., 2001).

Dry cow therapy efficacy

DCT efficacy should always be tackled according to a holistic approach and take into account various factors related to the management of the drying-off period on the one hand and the environment of dry cows, the presence of microorganisms and the risk of emergence of bacterial resistance on the other hand (Petzer et al., 2009). It is most commonly measured by cure and incidence of new IMIs rates (Bradley et al., 2010).

Mastitis occurrence after therapy

The results of the survey indicated that healthy cows receiving an antibiotic infusion at dry-off displayed few or no mastitis cases during the dry period and in the first days postpartum (94.6% and 91.9% respectively). However, the frequent occurrence of new IMIs thereafter in cows with mastitis that had been dried off with an antibiotic infusion was assessed by 13.5% of respondents (Table 4).

According to Blowey and Edmondson (2010), when more than one out of twelve cows (8.33%) in the first four weeks of lactation or if somatic cell counts are raised (above 200 000 cells) among heifers at the time of calving and develop mastitis, it is recommended that a screening test be performed, as these results would indicate an environmental origin of infections during the dry period.

In a UK study involving four dairy herds, no clinical mastitis was observed at dry-off in dry-treated cows whereas untreated cows had a significant number of clinical mastitis cases at dry-off and calving (Berry and Hillerton, 2002). According to the investigation conducted by Godden et al. (2003), cows treated on the first day of dry-off with an antimicrobial and an internal teat sealant exhibited a lower prevalence of new IMI after calving compared to those treated with antibiotics alone.

Performance of bacteriological analyses

The results showed that bacteriological analyses after antibiotic treatment failure were performed systematically by only 5.56% of the surveyed vets while the remainder rarely (25%) or never (58.33%) carried them out. According to the investigation findings of Bertulat et al. (2015), a majority (64.9%) of the farmers revealed that antibiotic treatments undertaken during dry-off were conducted without prior bacteriological examination.

Table 4. Efficacy of dry cow therapy on occurrence and recurrence of mastitis during dry and postpartum periods.

Dry cow therapy efficacy	Question choices	Missing data	Frequency (n)	Estimate (%)	95% Confidence Interval	
					Lower	Upper
Occurrence of mastitis at dry-off in healthy cows receiving an IMM infusion of antibiotic	Never		3	8.11	1.70	21.91
	Rarely		32	86.49	71.23	95.46
	Often		2	5.41	0.66	18.19
Occurrence of mastitis during early postpartum in healthy cows receiving an IMM antibiotic infusion at drying-off	Never		6	16.22	6.19	32.01
	Rarely		28	75.68	58.80	88.23
	Often		3	8.11	1.70	21.91
Occurrence of new IMI in mastitic cow receiving an IMM antibiotic infusion at drying-off	Never		6	16.22	6.19	32.01
	Rarely		26	70.27	53.02	84.13
	Often		5	13.51	4.54	28.77
Use of bacteriological analysis in case of mastitis recurrence		1	36			
	Never		21	58.33	40.76	74.49
	Rarely		9	25.00	12.12	42.20
	Often		4	11.11	3.11	26.06
	Always		2	5.56	0.68	18.66

Factors related to the occurrence and recurrence of mastitis in dry cow infused by intramammary antibiotics (IMM ATB)

To summarize and graphically display the relationship between all variables a two-dimensional diagram (Figure 7) was created using multiple correspondence analysis (MCA). Responses in the same category are plotted close to each other but those in different categories are plotted as far apart as possible.

The two axes retained for the presentation of the data reflect a total inertia of 0.482 (48.25%) of the information contained in the data set submitted to the MCA, 25.67% by dimension 1, 22.58% by dimension 2. The Cronbach's alpha, 0.84 for dimension 1 and 0.81 for dimension 2 (Table 5) exceed the lower limit (0.70) of the acceptable values of alpha Cronbach's alpha, ranging from 0.70 to 0.95 (Tavakol and Dennick, 2011). To represent the intensity with which the variable explains each of the two axes, discrimination measures were established and resumed in Table 5.

Table 5. Contributions of variables to the discrimination measures.

Discrimination Measures		Dimension		Mean
		1	2	
Cronbach's Alpha		0.84	0.81	0.83
DCT efficacy	Dry-off occurrence	0.09	0.43	0.26
	Postpartum occurrence	0.21	0.59	0.40
	New IMI	0.34	0.03	0.18
Dry period management	Herd size	0.34	0.54	0.44
	Separation	0.08	0.10	0.09
	Management	0.01	0.06	0.04
	Milk cessation length	0.32	0.25	0.29
	Adapted Ration	0.13	0.16	0.14
Dry approaches for mastitis control	BCS	0.20	0.15	0.18
	Mastitis vaccination use by Farmers	0.14	0.04	0.09
DCT practice	Farmers' request for IMM ATB DCT	0.42	0.23	0.32
	IMM ATB type	0.69	0.80	0.74
DCT practice	Parenteral ATB type	0.73	0.29	0.51
	DCT policy	0.39	0.07	0.23
	DCT commencement	0.30	0.21	0.25
	DCT modality	0.39	0.20	0.30
	Teat cleaning before IMM	0.01	0.11	0.06
	Partial insertion	0.02	0.03	0.03
	Teat-dip after IMM	0.07	0.00	0.03
Active Total		4.88	4.29	4.58

There were no strong differentiating values allocated to each of the obtained dimensions (Table 5 and Figure 7); all discrimination measures were below 0.6 except the maximum value of 0.69 for the first dimension and 0.80 for the second dimension presented both by IMM ATB type and those of Parenteral ATB type (0.73) for the first dimension. Hierarchically, for dimension 1, Parenteral ATB type, Farmers' request for IMM ATB DCT, DCT policy, DCT modality and New IM infection were the most discriminant variables. These variables have large discrimination measures on the first dimension conversely to the second one.

It can be noted that the variables describing the DCT practices, namely Parenteral ATB type, Farmers' request for IMM ATB DCT, DCT policy and DCT modality were discriminating for the occurrence of new cases of mastitis in affected cows that treated with an intramammary infusion of ATB (New IMI).

Dimension 2 was mainly influenced by the IMM ATB type (0.80), Postpartum occurrence (0.59), Herd size (0.54) and Dry-off occurrence (0.43). Postpartum occurrence, Herd size and Dry-off occurrence have a large value on the second dimension but

a small value on the first one. However, IMM ATB type has also large value on the first dimension (0.69).

The other variables such as dry management, partial insertion, teat dip after IMM, located very close to the origin, did not discriminate at all in the first two dimensions.

From the joint plot of category points (figure 8), it appears that for the variable New IMI the categories (Never and Often) are far apart. For DCT policy, the category "Blanket" is very far from the category "selective" and yields a large negative discrimination measure along the first dimension. These two variables discriminate better the first dimension than the variables Parenteral ATB type, DCT modality and IMM request with categories that are close together.

The variables Dry off occurrence and Postpartum occurrence with categories (Never and often) that are distant discriminate the dimension 2 better than the variable herd size with categories that are approximate.

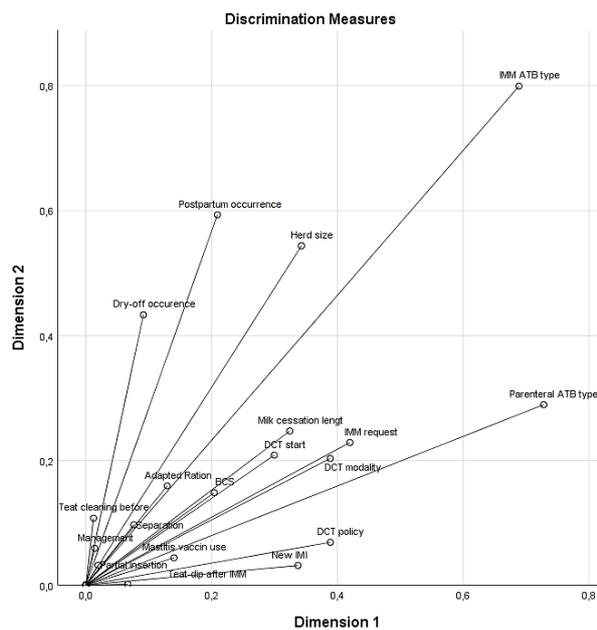


Figure 7. Discrimination measures plot using Multiple Correspondence Analysis. DCT: dry cow therapy; Dry-off occurrence: Occurrence of mastitis at dry-off in healthy cows receiving an IMM infusion of antibiotic; Postpartum occurrence: Occurrence of mastitis during early postpartum in healthy cows receiving an IMM antibiotic infusion at drying-off; New IMI: Occurrence of new IMI in mastitic cow receiving an IMM antibiotic infusion at drying-off.

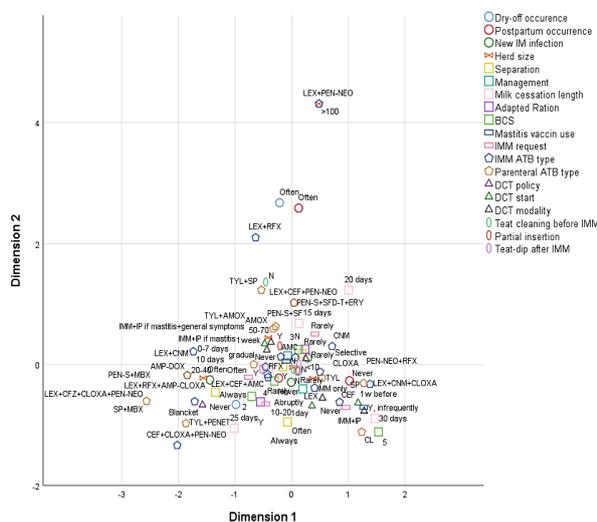


Figure 8. Contribution of the questions modalities in the discrimination measures using a two-dimensional Multiple Correspondence Analysis solution.

The use of HCA (Table 6, figure 9) to classify hierarchically the responses into clusters involving the correspondence between categories of variables revealed a notable divergence between the two clusters 1 and 2, which group together different practices including the DCT policy, blanket (66.67% of cluster 1) and selective (100% du cluster 2). These practices are associated with two divergent efficacy statuses of

intramammary infusion of antibiotic to cows with mastitis (rare observation of recurrences in 81.82 of the cases by the vets grouped in cluster 2 compared to the frequent observation of recurrences by the 50% from cluster 1).

Selective DCT has been found to increase the risk of developing intramammary infections (IMI) compared to blanket treatment (RR = 1.34, 95% CI = 1.13, 1.16), if not combined with the use of internal teat sealants (Winder et al., 2019). Similarly, a recent study showed that, in the absence of combination with internal teat sealant, selective DCT was more associated than blanket DCT with the risk of developing new IMI during the dry period and its persistence until calving (Kabera et al., 2021). The meta-regression performed by these authors revealed that the risk of developing IMI during the dry period and at calving, and the risk of developing clinical mastitis in early lactation, as well as the level of milk production and somatic cell count in early lactation did not differ between selective DCT and Blanket DCT as long as an internal teat sealant (65% bismuth subnitrate) was administered to healthy untreated quarters at dry-off. Halasa et al. (2009) reported that the selective DCT, compared to Blanket DCT, provided less protection against new IMI, but better than that observed in cows not receiving a DCT. In addition, the use of internal teat sealants can enhance protection against new IMI during drying off. Furthermore, selective DCT has the advantage of reducing the use of antibiotics during the dry period (Kabera et al., 2021).

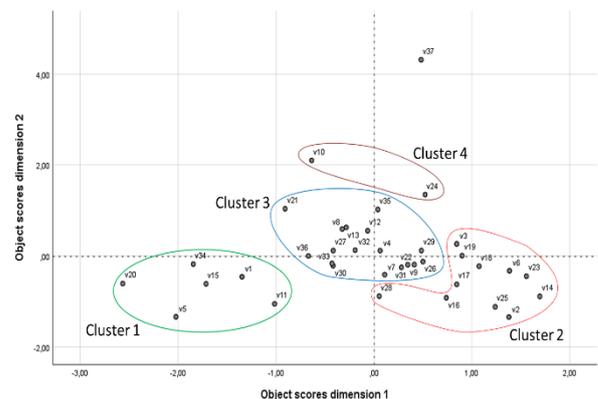


Figure 9. Clusters of objects scores labeled by respondents using ACH method.

In cluster 1, 66.7% of the veterinarians reported frequent self-medication (requesting IMM antibiotics) by farmers (Table 6). The relationship between this attitude of farmers and mastitis incidence has been reported by Kayitsinga et al. (2017) in eastern USA. These authors found that increased use of intramammary administration (IMA) of antimicrobial drugs by farmers at dry-off and the belief that "bad luck" plays a role in mastitis problems were associated with improvement in the IMA frequency for the treatment of clinical mastitis. As well, Jansen et al. (2009) suggested that mastitis incidence and variation in milk quality (somatic cell count) in Dutch dairy farms were linked to farmers' attitudes. However, the HCA did not confirm a strong relationship between the incidence of new IMI infection and mastitis during the dry period and early lactation with the other variables highlighted by MCA such as DCT modality, antibiotics molecules used as IMM and systemic treatment and herd size (Table 6, Figure 9). In German Holstein dairy cows receiving dry cow therapy, the antibiotic type and

udder tissue status was associated with the bacteriological cure rates while age and health status of the udder seemed to be the major determinants of new IMI infection and clinical mastitis during the dry period and early lactation (Gundelach et al., 2011).

In this section, the analysis of factors influencing the efficacy of antibiotic dry-off therapy (DCT) has been limited to the data acquired from intervening vets and deserves to be extended to more farms and farmers displaying self-medication to provide factual conclusions on possible risk factors for DCT inefficacy.

Table 6. Comparison of relevant variables categories within clusters in the two dimensions.

DIMENSIONS	Variables	Categories	Within clusters frequencies (%)				Total (%)
			Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	
DIMENSION 1	New IMI	Never	16.67	18.18	17.65	0.00	16.67
		Rarely	33.33	81.82	70.59	100	69.44
		Often	50.00	0.00	11.76	0.00	13.89
	Parenteral ATB type	TYL	0.00	66.67	50.00	50.00	48.15
		SP+MBX	25.00	0.00	0.00	0.00	3.70
		TYL+PENET	50.00	0.00	0.00	0.00	7.41
		TYL+SP	0.00	0.00	16.67	50.00	11.11
		PEN-S+MBX	25.00	0.00	0.00	0.00	3.70
	DCT modality	IMM+IP	0.00	45.45	0.00	0.00	13.89
		IMM+IP if mastitis	50.00	0.00	52.94	0.00	33.33
		IMM+IP if mastitis+general symptoms	33.33	9.09	41.18	100	33.33
		IMM only	16.67	45.45	5.88	0.00	19.44
	IMM request	Often	66.67	9.09	47.06	0.00	36.11
		Always	33.33	9.09	0.00	0.00	8.33
DCT policy	Selective	33.33	100	94.12	100	86.11	
	Blanket	66.67	0.00	5.88	0.00	13.89	
DIMENSION 2	Dry-off occurrence	Never	33.33	0.00	5.88	0.00	8.33
		Rarely	66.67	100	88.24	100	88.89
		Often	0.00	0.00	5.88	0.00	2.78
	Postpartum occurrence	Never	0.00	36.36	11.76	0.00	16.67
		Rarely	100	63.64	88.24	0.00	77.78
		Often	0.00	0.00	0.00	100	5.56
	Herd size	<10	16.67	63.64	52.94	0.00	47.22
		10-20	16.67	36.36	47.06	0.00	36.11
		20-40	50.00	0.00	0.00	50.00	11.11
		50-70	16.67	0.00	0.00	50.00	5.56
	IMM ATB type	LEX	16.67	63.64	41.18	0.00	41.67
		CEF	0.00	9.09	0.00	0.00	2.78
		CLOXA	0.00	0.00	5.88	0.00	2.78
		RFX	16.67	0.00	11.76	0.00	8.33
		CNM	0.00	18.18	5.88	50.00	11.11
		AMC	0.00	0.00	5.88	0.00	2.78
		AMP-DOX	16.67	0.00	0.00	0.00	2.78

Alternatives to antibiotics for dry cow therapy

Teat sealants use

A large majority of respondents (71.43%) stated that they did not use teat sealants in their practices, while only 22.86% would use it as a complement to antibiotic therapy. The finding of limited use of this preventive measure in our survey is supported by the results of Bertulat et al. (2015), as only 33.3% of the farmers replied that they had already used internal teat sealants during drying-off. However, the results are in contrast to those obtained by Fujiwara et al. (2018), as 84.9% of the investigated farms used teat sealants during dry-off, with a predominant use of internal sealants alone, by 86.3% of these farms.

A recent Brazilian study carried out by Freu et al. (2020), revealed that the combination of an internal teat sealant with dry cow antibiotic proved its effectiveness in preventing new IMI during the dry period and thus reducing the risk of clinical mastitis occurrence up to 60 days postpartum.

Herbal and essential oil use in mastitis therapy

Concerning the substitution of antibiotics by another way of fighting mastitis, the results showed that 77.78% of the veterinarians agreed with the concept of replacing these drugs by an alternative means (Table 7). Indeed, according to the investigation conducted in England, reducing antimicrobial use, as well as the choice of which molecule to adopt for a better

livestock management performance was the second most formulated response by farmers (Higham et al., 2018).

In addition, most of the participants (89.19%) were in favour of using essential oils (aromatherapy) to treat mastitis, with 35.14% replacing antibiotics and 54.05% complementing antibiotic therapy. These results indicate a growing openness to herbal use in preventing and treating mastitis, due to the promising results achieved and the benefits conferred by the absence of side effects (Hamlaoui et al., 2021; Mullen et al., 2014). Nevertheless, this questionnaire highlighted a flagrant lack of knowledge about essential oil-based products marketed in Algeria, since only 29.73% are aware of these products. Furthermore, according to the observations of the vets, the use of plants to treat mastitis was frequently employed by only 5.71% of the farmers (Table 7). In a similar observation

by Higham et al. (2018), out of 135 survey respondents, only 3% referred to natural remedies as alternatives to treatments to reduce or replace the usage of antibiotics. Several studies, nevertheless, have demonstrated the interest and effectiveness of essential oils in the treatment of mastitis in dairy cows. For their part, Neculai-Valeanu et al. (2021) noted that essential oils can be used in the treatment of mastitis in combination with other products because of their ability to cross the skin barrier and thus prove their effectiveness in the field of mastitis treatment.

In conclusion, the application of complementary medicine in the field is not widespread due to limited knowledge and unavailability of regulated preparations.

Table 7: Opportunity to apply an alternative to antibiotics in northern Algerian herds.

Alternatives to antibiotics for dry cow therapy	Question choices	Missing data	Frequency (n)	Estimate (%)	95% Confidence Interval	
					Lower	Upper
Use of a teat sealant		2	35			
	No		25	71.43	53.70	85.36
	Yes, sometimes to compliment antibiotics		8	22.86	10.42	40.14
	Yes, to replace antibiotics		1	2.86	0.07	14.92
	Yes, systematically as a compliment to antibiotics		1	2.86	0.07	14.92
Acceptance of an alternative to replace the use of antibiotics in mastitis control	No	1	36	8	22.22	10.12
	yes			28	77.78	60.85
Use of phytotherapy by farmers to control mastitis		2				
	Not at all frequently		18	51.43	33.99	68.62
	Somewhat frequently		4	11.43	3.20	26.74
	Rather infrequently		11	31.43	16.85	49.29
Information on products containing Essential Oil marketed in Algeria for mastitis control			37			
	Yes		11	29.73	15.87	46.98
Acceptance of the use of aromatherapy in mastitis control			37			
	No		4	10.81	3.03	25.42
	Yes, to compliment antibiotics		20	54.05	36.92	70.51
	Yes, to replace antibiotics		13	35.14	20.21	52.54

CONCLUSION

This survey identified significant deficiencies in the antimicrobial control of mastitis at dry-off. This concerns the non-compliance with advisable zootechnical practices during this period, which could increase the risk of occurring new IMIs. In addition, the poor adherence of farmers to apply proper management practices of antibiotic DCT underlines the urgent requirement for awareness these latter by veterinarians in the areas covered by this study. The use of teat sealants in combination with the antibiotic DCT should be promoted as effective approaches to improve the udder health. This study also highlights the importance of restricting the uncontrolled and selective use of some antibiotic drugs, mainly β -lactams,

exacerbated by farmers' attitudes such as self-medication. The separation of treated animals at drying off from those undergoing lactation would help to avoid the occurrence of antibiotic residues in the collected milk. Finally, there are some interesting prospects for using herbal and aromatherapy as a complementary or palliative approach to control mastitis and reduce antibiotic overuse.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is a part of PRFU projects (Grant N°: D00L04UN230120190001) supported by the Directorate General for Scientific Research and Technological Development (Ministry of Higher Education and Scientific Research, ALGERIA).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AH conceptualized the study. MWH, AH and IB carried out the study, AH formally analysed the data, MWH, AH and FRM interpreted the results. MWH, AH and FRM wrote the manuscript. All authors approved the final version of the paper.

REFERENCES

- Berry EA, Hillerton JE. The Effect of Selective Dry Cow Treatment on New Intramammary Infections. *J Dairy Sci.* 2002; 85:112–21. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74059-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74059-9).
- Bertulat S, Fischer-Tenhagen C, Heuwieser W. A survey of drying-off practices on commercial dairy farms in northern Germany and a comparison to science-based recommendations. *Vet Rec Open.* 2015; 2:1–10. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2014-000068>.
- Blowey RW, Edmondson P. *Mastitis Control in Dairy Herds.* 2nd ed. UK: CABI; 2010.
- Boukhechem S, Mimoune N, Ghazlane MK, Moula N, Kaidi R. Status, Characterization and Typology of Dairy Cattle Farms in Northern Algeria. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Vet Med.* 2019; 76:191. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:2019.0022>.
- Bradley AJ, Breen JE, Payne B, Williams P, Green MJ. The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination. *J Dairy Sci.* 2010; 93:1566–77. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2725>.
- Bradley AJ, Green MJ. An Investigation of the Impact of Intramammary Antibiotic Dry Cow Therapy on Clinical Coliform Mastitis. *J Dairy Sci.* 2001; 84:1632–9. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74598-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74598-5).
- Breen J, Hudson C, Green M, Bradley A. Combination therapy for mastitis in dairy herds: evidence and research. *Vet Times.* 2011; 41:8...12-8...12.
- Brunton LA, Duncan D, Coldham NG, Snow LC, Jones JR. A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Vet Rec.* 2012; 171:296. <https://doi.org/10.1136/vr.100924>.
- Burke N, Adley CC. Prevalence of intramammary antibiotic usage in dairy farming. *J Dairy Res.* 2021; 88:176–8. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000431>.
- Cameron M, Keefe GP, Roy J, Stryhn H, Dohoo IR, McKenna SL. Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. *J Dairy Sci.* 2015; 98:2427–36. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8876>.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, et al. Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. *EFSA J.* 2017; 15:e04665. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4665>.
- Freu G, Tomazi T, Monteiro CP, Barcelos MM, Alves BG, Santos M V. Internal Teat Sealant Administered at Drying off Reduces Intramammary Infections during the Dry and Early Lactation Periods of Dairy Cows. *Anim.* 2020; 10. <https://doi.org/10.3390/ani10091522>.
- Fujiwara M, Haskell MJ, Macrae AI, Rutherford KMD. Survey of dry cow management on UK commercial dairy farms. *Vet Rec.* 2018; 183:297. <https://doi.org/10.1136/vr.104755>.
- Garcia SN, Osburn BI, Cullor JS. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Heal.* 2019; 7:100086. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100086>.
- Gay E, Bord S, Boichard D, Barnouin J. Modalités de traitement des mammites cliniques en élevage bovin laitier en France. *Renc Rech Ruminants.* 2002; 9:37–40.
- Godden S, Rapnicki P, Stewart S, Fetrow J, Johnson A, Bey R, et al. Effectiveness of an Internal Teat Seal in the Prevention of New Intramammary Infections During the Dry and Early-Lactation Periods in Dairy Cows when used with a Dry Cow Intramammary Antibiotic. *J Dairy Sci.* 2003; 86:3899–911. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73998-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73998-8).
- Gott PN, Rajala-Schultz PJ, Schuenemann GM, Proudfoot KL, Hogan JS. Effect of gradual or abrupt cessation of milking at dry off on milk yield and somatic cell score in the subsequent lactation. *J Dairy Sci.* 2017; 100:2080–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11444>.
- Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kalsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50:245–59. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00160-0).
- Gundelach Y, Kalscheuer E, Hamann H, Hoedemaker M. Risk factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics. *J Vet Sci.* 2011; 12:227–33. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.3.227>.
- Hadeif A, Miroud K, Sebihi H. Relationship between retained placenta and body condition changes during the transition period in Holstein dairy cows in north-eastern Algeria. *SpermoVA.* 2021; 11:17–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.18548/aspe/0009.03>.
- Halasa T, Østerås O, Hogeveen H, van Werven T, Nielsen M. Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. part 1. Protection against new intramammary infections. *J Dairy Sci.* 2009; 92:3134–49. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1740>.
- Hamlaoui MW, Hadeif A, Meklati FR, Alleg M, Ghouila B. In vivo effect of *Origanum vulgare* essential oil on microbiological quality of raw milk from subclinical mastitis affected cows. *Agric For.* 2021; 67:83–98. <https://doi.org/10.17707/AgricForest.67.3.07>.
- Higham LE, Deakin A, Tivey E, Porteus V, Ridgway S, Rayner AC. A survey of dairy cow farmers in the United Kingdom: Knowledge, attitudes and practices surrounding antimicrobial use and resistance. *Vet Rec.* 2018. <https://doi.org/10.1136/vr.104986>.
- Huijps K, Hogeveen H. Stochastic modeling to determine the economic effects of blanket, selective, and no dry cow

- therapy. *J Dairy Sci.* 2007; 90:1225–34. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71611-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71611-9).
- Jansen J, van den Borne BHP, Renes RJ, van Schaik G, Lam TJGM, Leeuwis C. Explaining mastitis incidence in Dutch dairy farming: The influence of farmers' attitudes and behaviour. *Prev Vet Med.* 2009; 92:210–23. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.08.015>.
 - Kabera F, Roy JP, Afifi M, Godden S, Stryhn H, Sanchez J, et al. Comparing Blanket vs. Selective Dry Cow Treatment Approaches for Elimination and Prevention of Intramammary Infections During the Dry Period: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Vet Sci.* 2021; 8:1–16. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.688450>.
 - Kayitsinga J, Schewe RL, Contreras GA, Erskine RJ. Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. *J Dairy Sci.* 2017; 100:1388–407. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11708>.
 - Kebbal S, Baazize-Ammi D, Gharbi I, Hanzen C, Guetarni D. Descriptive study of mastitis risk factors and managerial characteristics of dairy farms in the wilaya of Blida. *Agrobiologia.* 2020; 10:1975–85.
 - Krömker V, Leimbach S. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52:21–9. <https://doi.org/10.1111/rda.13032>.
 - Kuipers A, Koops WJ, Wemmenhove H. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *J Dairy Sci.* 2016; 99:1632–48. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8428>.
 - Layada S, Benouareth D-E, Coucke W, Andjelkovic M. Assessment of antibiotic residues in commercial and farm milk collected in the region of Guelma (Algeria). *Int J Food Contam.* 2016; 3:19. <https://doi.org/10.1186/s40550-016-0042-6>.
 - Lievaart JJ, Noordhuizen JPTM, van Beek E, van der Beek C, van Risp A, Schenkel J, et al. The Hazard analysis critical control point's (HACCP) concept as applied to some chemical, physical and microbiological contaminants of milk on dairy farms. A prototype. *Vet Q.* 2005; 27:21–9. <https://doi.org/10.1080/01652176.2005.9695183>.
 - McDougall S. Management factors associated with the incidence of clinical mastitis over the non-lactation period and bulk tank somatic cell count during the subsequent lactation. *N Z Vet J.* 2003; 51:63–72. <https://doi.org/10.1080/00480169.2003.36342>.
 - Meklati FR, Meribai A, Yezli N, Ben-Mahdi MH. State of play of the dairy sector in Algeria: between objectives and dependencies: an overview. *CAB Rev.* 2020; 15:1–8. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR202015027>.
 - Meskini Z, Rechidi-sidhoum N, Bounaama K, Dahou AE. Management Practices on Dairy Cattle Breeding Farms in Northwest of Algeria. *Anim Sci Biotechnol.* 2021; 54:237–42.
 - Mullen KAE, Anderson KL, Washburn SP. Effect of 2 herbal intramammary products on milk quantity and quality compared with conventional and no dry cow therapy. *J Dairy Sci.* 2014; 97:3509–22. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7460>.
 - Neculai-Valeanu AS, Arition AM, Mădescu BM, Rîmbu CM, Creangă Ș. Nanomaterials and Essential Oils as Candidates for Developing Novel Treatment Options for Bovine Mastitis. *Anim.* 2021; 11. <https://doi.org/10.3390/ani11061625>.
 - Niemi RE, Hovinen M, Vilar MJ, Simojoki H, Rajala-Schultz PJ. Dry cow therapy and early lactation udder health problems—Associations and risk factors. *Prev Vet Med.* 2021; 188:105268. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105268>.
 - Østerås O, Sandvik L, Aursjø J, Gjøl GG, Jørstad A. Assessment of Strategy in Selective Dry Cow Therapy for Mastitis Control. *J Vet Med Ser B.* 1991; 38:513–22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1991.tb00905.x>.
 - Petzer IM, Lourens DC, Van Der Schans TJ, Watermeyer JC, Van Reenen R, Rautenbach GH, et al. Intramammary infection rate during the dry period in cows that received blanket dry cow therapy: Efficacy of 6 different dry-cow intra-mammary antimicrobial products. *J S Afr Vet Assoc.* 2009; 80:23–30. <https://doi.org/10.4102/jsava.v80i1.164>.
 - Sawant AA, Sordillo LM, Jayarao BM. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J Dairy Sci.* 2005; 88:2991–9. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72979-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72979-9).
 - Scherpenzeel CGM, Santman-Berends IMGA, Lam TJGM. Veterinarians' attitudes toward antimicrobial use and selective dry cow treatment in the Netherlands. *J Dairy Sci.* 2018; 101:6336–45. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13591>.
 - Ssajjakambwe P, Bahizi G, Setumba C, Kisaka SMB, Vudriko P, Atuheire C, et al. Milk Hygiene in Rural Southwestern Uganda: Prevalence of Mastitis and Antimicrobial Resistance Profiles of Bacterial Contaminants of Milk and Milk Products 2017; 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8710758>.
 - Tavakol M, Dennick R. Making sense of Cronbach's alpha. *Int J Med Educ.* 2011; 2:53–5. <https://doi.org/10.5116/ijme.4dfb.8dfd>.
 - Titouche Y, Hakem A, Houali K, Meheut T, Vingadassalon N, Ruiz-Ripa L, et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST8 in raw milk and traditional dairy products in the Tizi Ouzou area of Algeria. *J Dairy Sci.* 2019; 102:6876–84. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16208>.
 - Titouche Y, Houali K, Yabrir B, Malki O, Chergui A, Chenouf N, et al. Detection of antibiotics residues in raw milk produced in Freha area (Tizi-Ouzou), Algeria. *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca Vet Med.* 2013; 70:83–87. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-vet:70:1:9833>.
 - Vilar MJ, Hovinen M, Simojoki H, Rajala-Schultz PJ. Short communication: Drying-off practices and use of dry cow therapy in Finnish dairy herds. *J Dairy Sci.* 2018; 101:7487–93. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14742>.
 - Vilar MJ, Rajala-Schultz PJ. Dry-off and dairy cow udder health and welfare: Effects of different milk cessation

methods. *Vet J.* 2020; 262:105503.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105503>.

- Winder CB, Sargeant JM, Kelton DF, Leblanc SJ, Duffield TF, Glanville J, et al. Comparative efficacy of blanket versus selective dry-cow therapy: A systematic review and pairwise meta-analysis. *Anim Heal Res Rev.* 2019; 20:217–28.
<https://doi.org/10.1017/S1466252319000306>.

Hamlaoui, M. W., Hadeif, A., Meklati, F. R., Alleg, M., Ghouila, B. (2021): *In vivo effect of Origanum vulgare essential oil on microbiological quality of raw milk from subclinical mastitis affected cows. Agriculture and Forestry, 67 (3): 83-98*

DOI: 10.17707/AgricultForest.67.3.07

Mohamed Walid HAMLAOUI¹, Ahmed HADEF², Fawzi Rostane MEKLATI³, Meriem ALLEG⁴, Bouchra GHOUILA⁴

IN VIVO EFFECT OF *Origanum vulgare* ESSENTIAL OIL ON MICROBIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK FROM SUBCLINICAL MASTITIS AFFECTED COWS

SUMMARY

The study aims to test under in vivo condition the effect of *Origanum vulgare* essential oil (OEO) on the bacteriological quality of raw milk from cows affected by subclinical mastitis. The tested oil extracted from Algerian endemic oregano collected in Setif province (eastern Algeria) was characterised as carvacrol-chemotype using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The in vitro inhibitory effect of diluted OEO was tested on control reference strains. *Staphylococcus aureus*, ATCC 700699 methicillin-resistant seemed more susceptible to OEO than ATCC 25923 methicillin-susceptible. The in vivo trial was conducted on lactating and non-pregnant cows selected according to their California mastitis test scores. The microbiological analysis was applied for 100 units of raw milk samples collected before and three days after the twice a day topical application of OEO diluted with vegetable oil (5%). Results showed the only presence of total aerobic mesophilic bacteria (TMAB) and coagulase-positive staphylococci (CPS) in all samples with values close to the critical limit. After treatment, a significant decrease ($P < 0.001$) in the mean count of TMAB and a non-significant decrease in the number of CPS ($P > 0.05$) were noted. Results indicate that aromatherapy is a promising approach for improving udder health and raw milk microbiota.

Keywords: Carvacrol, Essential oil, Mastitis, Milk, Oregano, *Staphylococcus*

¹Mohamed Walid Hamlaoui, Institute of Veterinary Sciences, Frères Mentouri University of Constantine, El Khroub, Constantine, ALGERIA

²Ahmed Hadeif, (corresponding author: hadef_vet@yahoo.fr), Department of Veterinary Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, Chadli Bendjedid University of El Tarf, PB 73, 36000 El-Tarf, and Laboratory of Development and Control of Hospital Pharmaceutical Preparations, University of Annaba, ALGERIA

³Fawzi Rostane Meklati, Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), BP 384, Bou-Ismaïl, 42004, Tipaza, ALGERIA

⁴Meriem Alleg, Bouchra Ghouila, Department of Agronomy, University of El Tarf, ALGERIA.

Notes: The authors declare that they have no conflicts of interest. Authorship Form signed online.

Received: 30/01/2021

Accepted: 15/08/2021

INTRODUCTION

On a global scale, Algeria is a major importer of milk powder and derived products with a global bill estimated in 2018 at US\$1.40 billion, thus occupying second place behind cereals. The efforts and subsidy schemes put in place by the State over the past few decades with the aim to increase the production of raw milk and above all to encourage the emergence of a real agro-food industry (Meklati *et al.*, 2020), have come up against the difficulty posed by this raw material which remains complex and altered.

Few studies carried out in Algeria on the microbiological quality of raw milk samples taken individually on the production site have been published. The low hygienic bacteriological quality that exceeds the critical threshold was described in a study carried out on farms in the Tiaret region. The authors found the presence in the analysed samples of TMAB greater than 105 colony forming unit per millilitre (CFU/ml) (81.2%), faecal coliforms (18.06%), *Staphylococcus aureus* (81.93%) and faecal streptococci (80.64%) (Ghazi and Niar, 2011). This bacteriological quality was influenced in a study carried out in the Metidja region by the size of the dairy farm and the practice of udder disinfection (Hakem *et al.*, 2012).

Subclinical mastitis is one of the causes of the deterioration of the quality of raw milk collected from the farm often due to infections by potentially pathogenic germs, namely coagulase-positive staphylococci, enterobacteria (*E. coli*) and streptococci (FAO, 1989). However, the emergence of mastitis due to minor germs, especially coagulase-negative staphylococci, has been reported (Pyörälä and Taponen, 2009). In eastern Algeria, *Staphylococcus aureus* has been considered one of the major pathogens causing subclinical bovine mastitis (Zaatout *et al.*, 2020). It represents one of the germs often implying the use of antibiotic-based applications, but their efficacy remains low (10-30%) due to the potential of resistance of these bacteria (Gomes and Henriques, 2016). In addition to the risk to public health linked to the toxi-infectious potential of this germ, one of the consequences of this pathology is the marketing of milk with low industrial value due to the presence of antibiotic residues (Sachi *et al.*, 2019). As a result, the use of essential oils as a possible alternative therapeutic approach against mastitis to solve the problem of antibiotic resistance has been the subject of several in vitro experiments, but their properties have been very little tested in vivo on livestock (Baskaran *et al.*, 2009; Mushtaq *et al.*, 2018; Alagawany *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2020). These studies have confirmed the efficacy of the antibacterial activity of the compounds of these oils on germs isolated from mastitis milk, particularly the phenolic compounds, including carvacrol. Its use as a feed supplement compound to improve animal health was reviewed by Sharifi-Rad *et al.* (2018). This phenol is generally present in significant percentages in Lamiaceae that grow spontaneously in North Africa (Algeria, Tunisia), especially *Origanum vulgare* (Sari *et al.*, 2006; Béjaoui *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2020; Nabti *et al.*, 2020).

The present study involves an in vivo trial preceded by an in vitro test on reference control strains, a first in Algeria at our level of knowledge, in order to test the effect of the essential oil of *Origanum vulgare* on the quality and bacteriological composition of the raw milk of cows exposed to the risk of subclinical mastitis. This approach aims to contribute to the development of new therapeutic option for bovine mastitis in accordance with the “One Health” concept.

MATERIAL AND METHODS

Essential Oils origin

The essential oils used in the study were obtained after steam extraction of the dried aerial parts (leaves and flowers) of *Origanum vulgare* subsp. *Glandulosum* (Desf.), an aromatic medicinal plant endemic to Algeria (Sari *et al.*, 2006). The plant material was collected during the flowering period in June 2019 in the mountains of Amoucha located in Sétif province in eastern Algeria (Fig. 1). The taxonomic identification of oregano specimen was made by Dr Samia LAKEHEL (Badji Mohkhtar University of Annaba, Algeria).

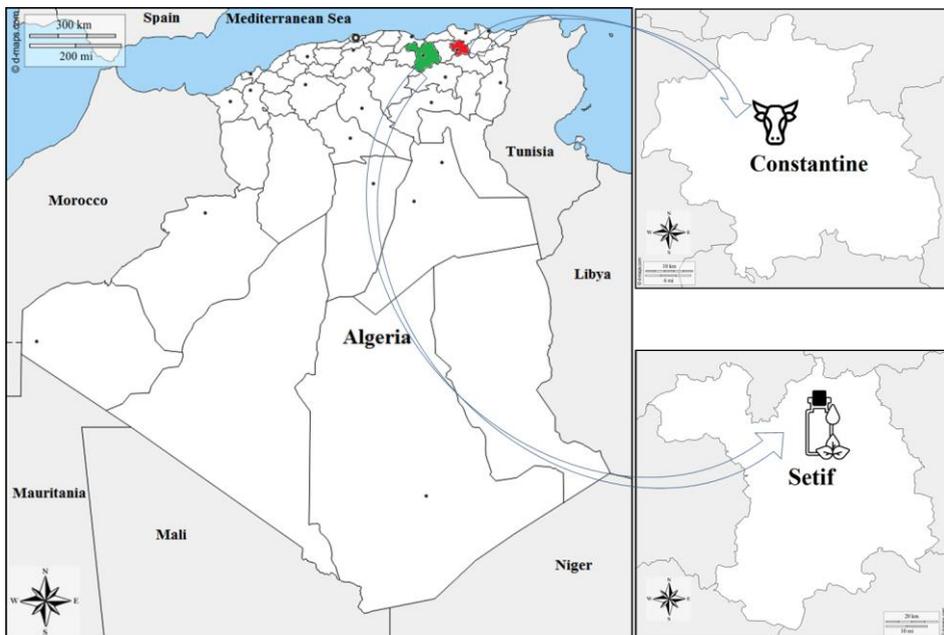


Figure 1. Location of the oregano collection region (Setif) and the study area of in vivo trial (Constantine)

Characterisation of oregano essential oil used in the clinical trial

The chemical composition of OEO to be used in the in vivo test was identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analyses were carried out on an HP 6890 gas chromatograph coupled to an HP 5973 mass

spectrometer (Agilent, CA, USA) using HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness). GC-MS spectra were obtained using the following conditions: injected essential oil volume was 1 µl in splitless mode; injection temperature was 250 °C; helium was the carrier gas at a flow rate of 0.5 ml/min; oven temperature program (60 °C for 8 min, increased at a rate of 2 °C/min to 250 °C, then held at 250 °C for 10 min). The mass spectral database used for essential oil component identification was Wiley 7N and NIST 02 (National Institute of Standards and Technology, USA).

In vitro efficacy of several dilutions of oregano essential oils on control reference strains

Control reference strains were used to evaluate the effectiveness of the oregano essential oils in inhibiting bacteria growth. *Staphylococcus aureus* ATCC 700699 (Mu50) applied in drug discovery was used as the reference control for methicillin-resistant (MRSA) strains. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 applied in the examination of dairy products and susceptibility disc testing was involved to control methicillin-susceptible (MSSA) strains. They were grown after spreading on Chapman's agar and incubated at 37 °C for 24 hours. After growing, a few well-isolated colonies of bacteria were taken and diluted in sterile physiological saline, then homogenised until an opacity equivalent to 0.5 units of the Mc Farland scale was obtained. Afterwards, 1 ml of inoculum was deposited and inoculated over the entire surface with Mueller-Hinton Agar (MHA) previously poured into a Petri dish.

The susceptibility of the reference strains to OEO diluted in the vegetable oil (VO), used both for in vitro and in vivo test, at the habitual (1%), recommended (5%) and double recommended (10%) concentrations for topical use (Franchomme *et al.*, 2001) was evaluated by measuring the diameter of the inhibition zone (aromatogram). For this purpose, 6 mm paper discs impregnated with 10 µl of each of the three doses mentioned above (1% , 5% , 10%) were used according to the disc-diffusion agar method for the evaluation of the activity of topical antimicrobial agents as described by Glasser *et al.* (2010).

The experiment was repeated for each dose and the data were presented as the mean and range of inhibition zone diameters. A threshold value of 8 mm was used to classify the bacteria tested as sensitive to the topical antimicrobial agent (Holder and Boyce, 1994). Also, the vegetal oil diluent without OEO was used as a positive control. A disc impregnated with 10 µl pure vegetable oil (100%) was applied on the MHA to check the sensitivity of the strains tested to the essential oil vehicle. Furthermore, a diffusion control test was performed using dimethyl sulfoxide (DMSO) as essential oil vehicle at the same tested concentrations.

In vivo assay of OEO effect

Study area: The clinical trial was carried out in March 2020 on a pilot dairy farm located in the province of Constantine (Figure 1) in north-eastern Algeria (36° 16' 17.1 "N 6° 40' 11.9 "E). This farm was chosen based on its

prevalence of subclinical mastitis that we have previously assessed (Hamlouli *et al.*, 2019).

Animals: The studied cows were selected from a herd of 85 dairy cows based on their California mastitis test (CMT) score. These females of Prim'Holstein breed, aged two to six years, were in lactation (post-partum period) and not pregnant. They had not previously received any antibiotic-based treatment.

Essential oil application: In the selected cows, the OEO oily solution recommended dose (Franchomme *et al.*, 2001) for topical use (5%) was applied twice a day, after morning and evening milking, by skin massage on the selected quarters for three successive days.

Sampling: A total of 20 raw milk samples were taken individually from 10 quarters, 5 affected (high somatic cells score) and 5 healthy (normal somatic cells score). They were taken twice, 10 samples before the application of the essential oil of oregano (day 0) and 10 samples 3 days later, each time keeping the same quarter of origin for each sample. The samples were taken aseptically, in compliance with the hygiene rules required for microbiological analysis, in sterile tubes labelled with a code linking it to the mammary quarter of origin. These samples were kept cold and sent to an analysis and quality control laboratory.

Raw milk analysis

CMT test: To screen the individual quarter milk for somatic cells, the CMT test was done before milking at the beginning, before the application of the essential oil, and at the end of the trial. CMT scores ranging from 0 (negative) to 4 (strong positive) were recorded according to the interpretation of test results described by Lévesque (2004).

Microbiological analyses: Repeated microbiological analyses (n= 5 units) were performed for each sample in a quality control laboratory according to the methods described in the Official Journal of the Algerian Republic for counting of: Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) on the Agar medium, with incubation at 30 °C for 72 hours. Coagulase-positive staphylococci (CPS) by plating 1 ml of raw milk on Baird Parker agar with incubation at 37° ±1 °C for 24-48 hours. Thermotolerant coliforms using lactose agar with incubation at 30 °C ± 1 °C for 24 hours ± 2 h. *Salmonella* on Hektoen agar, with storage in an oven at 37 °C for 18 to 24 hours. *Listeria monocytogenes* via Oxford agar. Incubation was carried out at 37 °C for 24 to 48 hours.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 26 software. The comparison of the cytological and microbiological values with the accepted standard criteria was made through a Student 't' test. The Z test using the Bonferroni correction was performed for comparison between prevalence of groups categories formed according to levels of TMAB and CPS counts and time of treatment (before and after).

The linear model was applied to highlight the fixed effect of the time factor reflecting the oregano essential oil effects on the cytological (CMT scores and

ASC) and microbiological parameters (bacteria count and proportion to the total mesophilic flora). These parameters were considered as dependent variables. Also, the pairwise comparison t-test was used to compare the results of the affected and healthy quarters before and after treatment. A significance threshold of 0.05 was retained for all the tests.

RESULTS AND DISCUSSION

Oregano essential oil characterisation

The result of the GC-MS analysis of *Origanum* essential oil showed that the prevalent compound is carvacrol (39.27%) followed by thymol with 25.83% (Table 1 and Figure 2). This composition is similar to those reported in subsequent studies carried out in our study area (Sétif) on the same species, *O. vulgare* L. subsp. *Glandulosum*, which showed the presence of 04 major compounds thymol, carvacrol, p-cymene and γ -terpinene with the majority of samples belonging to both chemotypes, carvacrol and/or thymol (Sari *et al.*, 2006; Khalfi *et al.*, 2008). The predominance of carvacrol recorded was described in a recent study on samples of the same species collected in the Bougaa region of Sétif with a percentage of 26.29% (Ali *et al.*, 2020). Considering the endemic character of this plant in North Africa, a study in the Mediterranean Phyto-region, North-East Tunisia, showed that carvacrol with a value ranging from 61.08 to 83.37% was also the main compound of this *Origanum* species (Béjaoui *et al.*, 2013). On the other hand, in the same region, from data published in 2020 (Nabti *et al.*, 2020), carvacrol was present in a small percentage (2.8%) with thymol as chemotype (56.3%) in the chemical composition of the oil extracted from the same species. However, these authors (Nabti *et al.*, 2020) found a dominance of carvacrol (59.6%) in a region bordering ours (Bordj-Bou Arreridj) for the oil of the species studied.

In vitro effect of oregano essential oils on control reference strains

The results of the aromatogram (Table 2) show that the highest diameters of inhibition were obtained with the solubilisation of the oil in dimethyl sulphoxide (DMSO) for the two strains ATCC MU 50 and ATCC 25923, for a concentration of 10% with a diameter of 31.72 mm and 17.42 mm respectively. The efficacy of this oil against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was also found by Bouhaddouda *et al.* (2016) who obtained a high inhibition diameter of 51.83 ± 2.56 mm using 5 μ l of undiluted essential oil of *O. vulgare* L. ssp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart collected from the province of Guelma (northeastern Algeria) with para-cymene (25.615%), thymol (23.129%), carvacrol (20.321%) as the main components using the agar disc method. It appears that the effectiveness of the essential oil is dependent on the diffusion ability of the vehicle (DMSO or vegetable oil). For both vehicles, MRSA were more susceptible to OEO than MSSA strain with a largest diameter obtained at 10% concentration. The 5% concentration seemed to be the limiting dilution among those tested allowing an inhibitory effect.

Table 1. Chemical composition of the tested oregano essential oil

Peak Number	Compounds	Time retention (min)	Peak area percentage (%)
1	β -Thujene	9.72	0.31
2	α -Pinene	10.10	0.29
3	Camphene	10.96	0.04
4	β -Pinene	12.69	0.06
5	Octen-3-ol	13.33	0.26
6	3-Heptanone	13.49	0.17
7	β -Myrcene	13.77	0.72
8	α -Phellandrene	14.57	0.11
9	3-Carene	14.92	0.04
10	α -Terpinene	15.45	1.27
11	p-Cymene	16.29	12.27
12	D-Limonene	16.39	0.68
13	γ -Terpinene	18.74	13.58
14	2-Hepten-4-ol	19.23	0.08
15	(+)-4-Carene	20.49	0.05
16	nd	21.48	0.03
17	Linalool	21.73	0.51
18	Terpinen-4-ol	27.11	0.25
19	α -Terpineol	28.25	0.15
20	Estragole	28.65	0.31
21	Thymol methyl ether	31.11	0.13
22	Isothymol methyl ether	31.74	0.24
23	Thymol	36.80	25.83
24	Carvacrol	37.72	39.27
25	Caryophyllene	43.20	1.11
26	α -Caryophyllene	45.31	0.03
27	β -Bisabolene	48.84	1.01
28	β -Sesquiphellandrene	49.68	0.22
29	α -Bisabolene (Z)	50.81	0.41
30	Caryophyllene oxide	53.11	0.28
Not-identified compounds			2.7
Total identified compounds			97.30

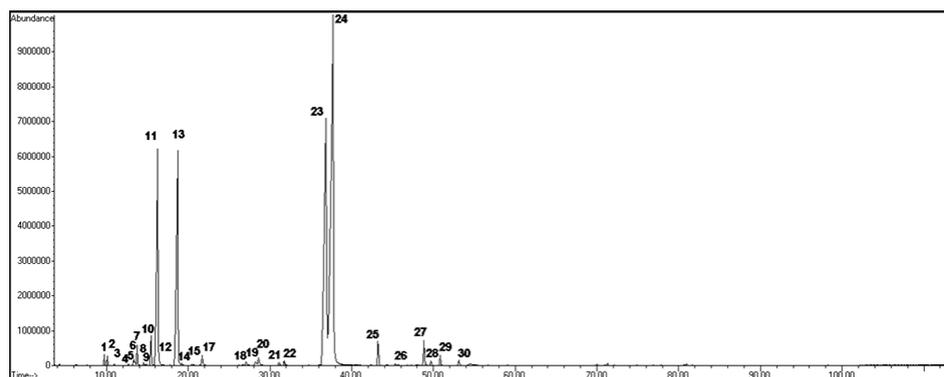


Figure 2. GC-MS Chromatograms and peak number of oregano essential oil compounds.

No control disc impregnated with vegetable oil alone inhibited the growth of the two reference strains. Regarding the 8 mm susceptibility threshold used to test the antimicrobial effect of the solutions for topical use (Holder and Boyce, 1994), The inhibiting effect was only obtained with the OEO diluted at 10% in vegetable oil. The susceptibility of ATCC 700699 strain to the essential oil of *Origanum vulgare* diluted to 10% was also found in a recent study by Cabrera-Contreras *et al.* (2020). These authors noted the absence of growth of this MRSA strain when it was inoculated on culture medium in mixture with essential oil undiluted or diluted in coconut oil at 10% , 1% , 0.5% and 0.25% (Cabrera-Contreras *et al.*, 2020). However, this adopted antibacterial activity test, which is different from our agar diffusion method, did not allow the MIC and inhibition diameter to be calculated.

Table 2. Inhibition effect of oregano essential oil on control reference strains at several dilutions

Reference strains	OEO vehicle	Diameter (mm) of inhibition (mean \pm SD) for OEO dilutions		
		1%	5%	10%
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 700699 TM)	VO	3.65 \pm 5.16	7.03 \pm 0.06	8.84 \pm 0.21*
	DMSO	9.22	25.91	31.72
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC [®] 25923 TM)	VO	3.13 \pm 4.43	7.36 \pm 0.02	8.37 \pm 0.83*
	DMSO	7.31	8.58	17.42

*: Presence of inhibition effect of essential oil on the reference strain DMSO: dimethyl sulfoxide; VO: vegetable oil

The use of the dilution method in agar medium allowed Nostro *et al.* (2004) to confirm the susceptibility of the MRSA and MSSA strains, including

ATCC 25923, to the essential oil of *Origanum vulgare* with thymol (24%) and carvacrol (14%). Their MIC was 0.125 after dilution in dimethyl sulfoxide (DMSO).

Results of in vitro test were in agreement with those of the authors mentioned above and confirm the antimicrobial efficacy of oregano oil against control strains. For further in vitro evaluation of the efficacy of topical solution or ointment containing essential oil, we suggest for the choice of the threshold value of the inhibition diameter to take into consideration the nature of the diluent, the diameter of the disc or the well and the dose to be impregnated on the disc or to be deposited in the well.

Microbiological quality in raw milk samples

The present trial revealed the occurrence of subclinical mastitis indicated by the CMT test without the presence at critical levels of major pathogens often investigated in quality control. These results are probably an expression of damage due to the minor germs that were not the subject of this control. These are mainly represented by coagulase-negative staphylococci (CNS) (e.g. *Staphylococcus chromogenes*) which cause an increase in SCCs but without effect on milk composition and production (Pyörälä and Taponen, 2009; Tomazi *et al.*, 2015). This finding was also cited by Bradley *et al.* (2007) in Great Britain and Wales who found the absence of major pathogens in 39% of samples representing subclinical mastitis and by Sampimon *et al.* (2009) in the Netherlands with an incidence of 20.8% in milk samples with a high somatic cell count greater than 250,000 cells/ml. In the present study, the somatic cell count was subjectively monitored by the CMT test which did not accurately reflect the status of cell immunity which could have been better controlled if an automated counter had been used, although in Algeria the cell count is not yet taken into account in the regulations as a criterion for the quality control of commercialised raw milk.

The microbiological analysis showed the presence of TMAB and coagulase-positive staphylococci in all the samples without their numbers reaching or exceeding the limits required by the Algerian state (Algerian Ministry of commerce, 2017). However, an absence of coliform, *Listeria monocytogenese*, and *Salmonella* in all samples, either at the beginning or the end of the trial was noted. Compared to Algerian standards (Algerian Ministry of commerce, 2017), the hygienic quality of all milk samples analysed was satisfactory regarding the limit criterion of major pathogenic germs counts independently of the sampling time, before or after the application of the essential oil.

Based on the overall results of the microbiological analysis (Table 3), a significant decrease ($P < 0.05$) in the number of TMAB after three days of essential oil application from values between 10^4 CFU/ml and 10^5 CFU/ml (90% of the samples) to values between 10^2 CFU/ml and 10^3 CFU/ml (70% of the samples) was observed. In agreement with the present finding, the supplementation in the concentrate mixture for healthy Holstein dairy cows with individual dose (2.5 and 5 g/head/day) of another oregano species (*O. majorana*),

mixed with clove and juniper in equal proportions as an essential oils blend improved the microbial profile of milk during the post-treatment period by a 20.7 and 17.9% reduction in total milk bacterial count (TMAB), respectively, compared to the control group (Al-Suwaiegh *et al.*, 2020).

For coagulase-positive staphylococci, there is a significant absence in 40% of the unit component samples ($P < 0.05$) after the application of the essential oil with the maintenance of a population counting from 1 CFU/ml to 50 CFU/ml in 60% of the samples before or after treatment ($P > 0.05$). Concerning the other bacteria (Coliforms, *Listeria* and *Salmonella*), a total absence of these bacteria was observed in all milk samples before and after the application of the essential oil. Therefore, the effect of this oil on them will not be retained for the rest of the discussion although other authors (Özkalp *et al.*, 2010) have observed in vitro an antibacterial activity of the oregano essential oil with different MICs against *E. coli* (250 µg/ml), *Listeria monocytogenes* (250 µg/ml) and *Salmonella enteritidis* (128 µg/ml).

Table 3. Prevalence of bacteria counts levels in raw milk samples before and after oregano essential oil applications

Bacteria	Counts levels (CFU/ml)	Prevalence (%) per unit component sample	
		Before	After
Total Mesophilic Aerobic Bacteria (TMAB) at 30 °C Limit*: 3×10^5 CFU/ml	$[10^2, 10^3 [$	0 ^a (0/50)	70 ^b (35/50)
	$[10^3, 10^4 [$	10 ^a (5/50)	30 ^b (15/50)
	$[10^4, 10^5 [$	90 ^a (45/50)	0 ^b (0/50)
	$> 10^5$	0 (0/50)	0 (0/50)
Coagulase-positive staphylococci (CPS) Limit*: 100 CFU/ml	Absence	20 ^a (10/50)	40 ^b (20/50)
	[1, 50]	62 ^a (31/50)	80 ^a (30/50)
]50, 80 [10 ^a (5/50)	0 ^b (0/50)
]80, 100 [8 ^a (4/50)	0 ^b (0/50)
	> 100	0 (0/50)	0 (0/50)
Coliformes thermotolerant Limit*: 5×10^2 CFU/ml	Absence	100 (50/50)	100 (50/50)
<i>Listeria monocytogenes</i> Limit*: 100 CFU/ml	Absence	100 (50/50)	100 (50/50)
<i>Salmonella</i> Limit*: Absence in 25 ml	Absence	100 (50/50)	100 (50/50)

Different superscript letters denotes a subset of TIME categories whose prevalence does differ significantly from each other at the 0.05 level using the z-test.

*: Algerian Ministry of Commerce (2017).

In vivo effect of oregano essential oil on counts of Total Mesophilic Aerobic Bacteria

Total aerobic mesophilic flora enumeration before and after the oily solution application shows that there is a most significant decrease ($P < 0.001$) in the number of bacteria in all samples. This finding is valid for both affected and healthy mammary quarters that showed counts below the limit value of 3×10^5 CFU/ml (Table 4). Comparison of the average count of the TMAB shows that there is a significant decrease ($P < 0.01$) from 13920.00 CFU/ml to 649.94 CFU/ml for healthy group and from 17040.00 to 1780.00 CFU/ml for affected quarters ($P < 0.05$) at the end of the trial (Table 4). These changes confirm the significant effect ($P < 0.01$) of EO on the overall mean TMAB number of all samples. This important antibacterial activity has been tested in vitro by the diffusion disc method on six standard strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*). These strains showed a degree of sensitivity quite similar to the essential oils of *O. vulgare* with MIC values of 31.25 µg/ml to 125.00 µg/ml (Sari *et al.*, 2006). Recently, the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* was reviewed by Alagawany *et al.* (2020). It was attributed to the particular richness of its oil in phenolic compounds. Among several compounds, carvacrol, citral, thymol and trans-cinnamaldehyde were effective at low MIC against the majority of mastitis-causing bacteria (Gupta *et al.*, 2020). Carvacrol is the major compound of the oil used in our trial. It was known by the US Food and Drug Administration (FDA) as a safe flavouring substance when used in or on food to preserve it (European Commission, 1999). This compound and thymol were the two phenolic compounds often present as major compounds in oregano oil particularly that collected in our study area as described above. Thus, the bactericidal activity of carvacrol has been observed in vitro on several bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Bacillus subtilis*) with a MIC varying according to the bacteria, from 5 mg per Petri dish for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to 20 mg for *Lactobacillus plantarum*. This activity has been linked to the hydrophobicity and chemical structure of this compound, whose presence of a free hydroxyl group and a delocalised system allows the exchange of protons (Ben Arfa *et al.*, 2006).

In vivo effect of oregano essential oil on coagulase-positive staphylococci counts

The counting of coagulase-positive staphylococci showed values below the permitted limits which decreased after the application of the essential oil, regardless of the status of the quarters, healthy or affected. A statistically significant decrease was only found for one unit in the sample ($p = 0.02$). A non-significant effect ($P > 0.05$) of OEO at the end of the trial on the mean number of staphylococci in the samples from healthy and affected quarters was recorded (Table 4) despite an overall decrease from 34.80 CFU/ml to 18.80 CFU/ml and 34.00 CFU/ml to 20.80 CFU/ml for healthy and affected quarters respectively.

The efficiency of the EO of *Origanum vulgare* with carvacrol (92%) has been observed in Brazil (Pozzo *et al.*, 2011) on coagulase-positive strains of *Staphylococcus spp* isolated from bovine mastitis regardless of their resistance profile to antibiotics (tetracycline, penicillin, erythromycin, ceftiofur, ampicillin, cephalothin and oxacillin) used in the treatment of mastitis with MICs lower than those obtained with the use of the majority pure compound carvacrol (99.5%). Its antibacterial activity was demonstrated *in vitro* in the United States on *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis with a MIC of 0.5% and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 1.2% (Baskaran *et al.*, 2009). At a concentration of 98% , carvacrol had strong antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus* including MRSA strains isolated from tank cow's milk with a MIC of 0.058 - 0.234 mg/ml evaluated by microdilution method and inhibition zones ranging from 19 to 45 mm (Keyvan and Tutun, 2019). This susceptibility of MRSA strains to carvacrol explains that registered by the *in vitro* control test in our study.

Table 4. Effect of oregano essential oil on mean counts of total mesophilic bacteria, staphylococci and their ratio

Variables	Quarter Status	Time	Mean	SD	Time fixed effects	
					F	Sig.
TMAB MEAN (CFU/ml)	Healthy	Before	13 920.00*	4 520.18	95.14	0.00
		After	694.00*	320.44		
	Affected	Before	17 040.00*	4 879.34		
		After	1 780.00*	1 463.56		
CPS MEAN (CFU/ml)	Healthy	Before	34.80*	23.69	2.48	0.13
		After	18.80*	19.01		
	Affected	Before	34.00*	29.02		
		After	20.80*	19.42		
RATIO CPS/TMAB	Healthy	Before	0.003	0.002	3.23	0.09
		After	0.057	0.093		
	Affected	Before	0.002	0.001		
		After	0.022	0.031		

*: Significant difference at $P < 0.01$ between the mean of variable and the lower microbiological limit (m) value using t test.

m= the threshold limit number (CFU/ml or CFU/g), below which the product is considered of satisfactory quality.

TMAB: total mesophilic aerobic bacteria; CPS: coagulase-positive staphylococci

Effect of oregano essential oil on the ratio of CPS count per TMAB

No significant change in the proportion of staphylococci to TMAB was noted (Table 4). However, an increase in ratios interpreted as an increase in the proportion of staphylococci relative to TMAB in both healthy and affected groups was recorded at the end of experimentation. The lack of significance of the effect of this oil on the mean overall ratio ($P > 0.05$) suggests that there was no significant change in the balance of the milk flora between the beginning and end of the trial (Table 4). This finding seems to be explained by the presence of multiple factors determining the SCP number and their proportion in the milk flora. Surveys on 27 dairy farms in France (Michel *et al.*, 2001) have shown that the level of microbial populations and the proportion between the flora of technological interest and spoilage flora are influenced by the hygienic practices of milking equipment and udder hygiene before and after milking. These measures had little influence on CPS which are very often present in non-negligible numbers either in milk samples with a low level of aerobic mesophilic flora (1.2×10^3 CFU/ml) where more than 50% of the milk contains at least 100 CFU/ml, or in milk with a higher level of mesophilic flora (1.5×10^4 CFU/ml) which have 37% of the samples at less than 100 CFU/ml. It has been suggested that the proportion of staphylococci is influenced by several factors such as the health status of the herd and, in particular, the presence or absence of cows with recurrent mastitis (Michel *et al.*, 2001).

CONCLUSIONS

The present in vivo study, reinforced by an in vitro control test, demonstrated an antibacterial effect of the topical oily solution containing essential oil of *Origanum vulgare* with carvacrol as a prevalent compound on the indicators of the microbiological hygienic quality of milk (TMAB) and mastitis-causing bacteria (CPS). It has also shown the ability of this oil to preserve the proportional balance of the bacterial population in milk. We suggest for further studies to take into consideration the emergence of minor germs and the recurrence potential of mammary infections due to antibiotic-resistant germs. Such research could help to assess the benefit-risk ratio of aromatherapy in the dairy sector and contribute to One Health.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Directorate General for Scientific Research and Technological Development (Ministry of Higher Education and Scientific Research, ALGERIA), PRFU project N^o: D00L04UN230120190001.

REFERENCES

- Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Shaheen, H. M., Abdel-Latif, M. A., & Noreldin, A. E. (2020): The applications of *Origanum vulgare* and its derivatives in human, ruminant and fish nutrition—a review. *Annals of Animal Science*, 20(2), 389–407. doi.org/10.2478/aoas-2020-0004.

- Algerian Ministry of commerce. (2017) : Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Journal Officiel de La République Algérienne, 39, 11–32. <https://www.joradp.dz/FTP/JO-FRANCAIS/2017/F2017039.pdf>
- Ali, H., Al-Khalifa, A. R., Aouf, A., Boukhebti, H., & Farouk, A. (2020) : Effect of nanoencapsulation on volatile constituents, and antioxidant and anticancer activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil. Scientific Reports, 10(1), 1–9.
- Al-Suwaiegh, S. B., Morshedy, S. A., Mansour, A. T., Ahmed, M. H., Zahran, S. M., Alnemr, T. M., & Sallam, S. M. A. (2020): Effect of an essential oil blend on dairy cow performance during treatment and post-treatment periods. Sustainability, 12(21), 9123. <https://doi.org/10.3390/su12219123>
- Baskaran, S. A., Kazmer, G. W., Hinckley, L., Andrew, S. M., & Venkitanarayanan, K. (2009): Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. Journal of Dairy Science, 92(4), 1423–1429. doi.org/10.3168/jds.2008-1384
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013) : Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. Journal of Medicinal Food, 16(12), 1115–1120. doi.org/10.1089/jmf.2013.0079
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006): Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Letters in Applied Microbiology, 43(2), 149–154. doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x
- Bouhaddouda, N., Aouadi, S., & Labiod, R. (2016) : Evaluation of chemical composition and biological activities of essential oil and methanolic extract of *Origanum vulgare* L. ssp. *glandulosum* (DESF.) Ietswaart from Algeria. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 8(1), 104–112.
- Bradley, A. J., Leach, K. A., Breen, J. E., Green, L. E., & Green, M. J. (2007): Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Veterinary Record, 160(8), 253–258.
- Cabrera-Contreras, R., Morelos-Ramírez, R., Quiróz-Ríos, J. P., & Muñoz-Quiróz, D. (2020): Antibacterial effects of Oregano essential oil (OEO) and its potential applications. Microbiology Research Journal International, 19–25. doi.org/10.9734/MRJI/2020/v30i430209
- European Commission. (1999): Commission decision of 23 February 1999 adopting a register of flavouring substances used in or on foodstuffs drawn up in application of regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council on 28 October 1996. 1999/217/EC. Official Journal, L084, 1–137.
- FAO. (1989): Milking, Milk Production Hygiene, and Udder Health. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (also available at www.fao.org).
- Franchomme, P., Jollois, R., & Penoel, D. (2001) : L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques. Paris, France : Roger Jollois.
- Ghazi, K., & Niar, A. (2011) : Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). Tropicultura, 29(4), 193–196.
- Glasser, J. S., Guymon, C. H., Mende, K., Wolf, S. E., Hospenthal, D. R., & Murray, C. K. (2010): Activity of topical antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria recovered from burn patients. Burns, 36(8), 1172–1184.

- Gomes, F., & Henriques, M. (2016): Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, 72(4), 377–382. doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8
- Gupta, R., Kumar, S., & Khurana, R. (2020): Essential oils and mastitis in dairy animals: A Review. *Haryana Vet.*, 59(SI), 1–9.
- Hakem, A., Yabrir, B., Khelef, D., Laoun, A., Mouffok, F., EL-Gallas, N., *et al.* (2012): Evaluation of microbial quality of raw milk into two dairies Mitidja's farms (Algeria). *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca - Veterinary Medicine*, 69, 272–281. doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:69:1-2:8850
- Holder, I. A., & Boyce, S. T. (1994). Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns*, 20(5), 426–429.
- Keyvan, E., & Tutun, H. (2019): Effects of Carvacrol on *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk. *Med Weter*, 75, 238–241. doi.org/10.21521/mw.6211
- Khalfi, O., Sahraoui, N., Bentahar, F., & Boutekedjiret, C. (2008): Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (Desf .) essential oil from Algeria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9), 1562–1566. doi.org/10.1002/jsfa
- Lévesque, P. (2004): *Less mastitis, better milk*. 4th ed. Wisconsin, USA: Hoard's Dairyman.
- Meklati, F. R., Meribai, A., Yezli, N., & Ben-Mahdi, M. H. (2020): State of play of the dairy sector in Algeria: between objectives and dependencies: an overview. *CAB Reviews*, 15(027), 1–8. doi.org/10.1079/PAVSNNR202015027
- Michel, V., Hauwuy, A., & Chamba, J.-F. (2001): La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. *Le Lait*, 81(5), 575–592.
- Mushtaq, S., Shah, A. M., Shah, A., Lone, S. A., Hussain, A., Hassan, Q. P., *et al.* (2018): Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis*, 114(December), 357–361. doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.024
- Nabti, L. Z., Sahli, F., Laouar, H., & Olowo-okere, A. (2020): Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from the Algerian endemic *Origanum*. *Antibiotics*, 9(1), 29.
- Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., *et al.* (2004): Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2), 191–195. doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00890-5
- Özkalp, B., Sevgi, F., Özcan, M., & Özcan, M. M. (2010). The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8(2), 6–8.
- Pozzo, M. D., Santurio, D. F., Rossatto, L., Vargas, A. C., Alves, S. H., Loreto, E. S., *et al.* (2011): Activity of essential oils from spices against *Staphylococcus* spp . isolated from bovine mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(5), 1229–1232.
- Pyörälä, S., & Taponen, S. (2009): Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 3–8. doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015

- Sachi, S., Ferdous, J., Sikder, M. H., & Hussani, S. M. A. K. (2019): Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), 315.
- Sampimon, O. C., Barkema, H. W., Berends, I. M. G. A., Sol, J., & Lam, T. J. G. M. (2009) : Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 37–44.
- Sari, M., Biondi, D. M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., *et al.* (2006): Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(6), 890–898. doi.org/10.1002/ffj.1738
- Sharifi-Rad, M. S., Setzer, W. N., Iriti, M., Martorell, M., Varoni, E. M., & Salehi, B. (2018): Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675–1687. doi.org/10.1002/ptr.6103
- Tomazi, T., Gonçalves, J. L., Barreiro, J. R., Arcari, M. A., & Santos, M. V. (2015): Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3071–3078. doi.org/10.3168/jds.2014-8466
- Zaatout, N., Ayachi, A., & Kecha, M. (2020): Epidemiological investigation of subclinical bovine mastitis in Algeria and molecular characterization of biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 283–292. doi.org/10.1007/s11250-019-02015-9

© 2021. This work is published under
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>(the “License”).
Notwithstanding the ProQuest Terms and Conditions, you
may use this content in accordance with the terms of the
License.