

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى أسطبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

THESE de DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité Sciences de Nature et de la Vie

Intitulée

**Diarrhée néonatale du veau et son traitement par les
plantes médicinales et les produits de la ruche**

Présentée par : Selles Sidi Mohammed Ammar

Le: 21/02/2019

Devant le jury :

Président	Tir Touil Meddah Aicha	Professeur	Université de Mascara
Examineur	Benbarek Hama	Professeur	Université de Mascara
Examineur	Sahnouni Fatima	MCA	Université de Mascara
Examineur	Mihoub Fatma	MCA	Université de Tiaret
Examineur	Moulay Meriem	MCA	Université de Tiaret
Encadreur	Koudri Mokhtaria	MCA	Université de Tiaret
Membre	Boukraa Laid	Professeur	

Année Universitaire : 2018-2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّا أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

سورة البقرة: الآية 32

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mon pays l'Algérie, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour avoir assuré ma formation et m'avoir fourni les enseignants et les outils depuis le primaire et jusqu'à la post-graduation, que dieu le préserve.

A mes parents, pour leur soutien inconditionnel, leurs sacrifices, leurs tendresses, et leur amour infinis. Malgré toutes les difficultés qu'ont pu représenter ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de rendre tout ce qui m'a été offert. Rien n'aurait été possible sans eux. J'en suis conscient et très reconnaissant. Je vous souhaite une longue vie dans la bonne santé et le bonheur.

A ma chère femme Mokhtaria, Que j'aime infiniment et que notre amour soit éternel. Merci de m'avoir soutenu, aidé et encouragé toute au long de ce parcours pour donner le meilleur de moi même.

A nos chers enfants ; BOCHRA, ABDERAHIM et YUCEF. Que dieu nous les garde et les protège.

A toute ma belle famille, qui m'ont toujours soutenue et encouragée. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mon affection.

A la mémoire de mon cher frère Abderrahim, qui a la plus grande part dans ce que je deviens.

A mon cher frère Redouane, je te dédie ce travail en témoignage du respect et de la gratitude pour l'épaule inconditionnelle que tu représentes pour moi. Je te souhaite une vie pleine de joie et de réussite.

A mes chères grandes sœurs Aziza et Amina, que j'aime beaucoup, à leurs époux Boubaker et Noureddine. Je leurs souhaite toute la joie et le bonheur dans leurs vies, ainsi qu'à mes très chers neveux; Cherifa, Anes, Ilyes, Ayoub, Douniya, Djazia, Kaouther, Asmaa et Naoufel que dieu les préserve.

A toute ma famille, mes amis et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent à Allah, clément et miséricordieux, qui par sa seule grâce, on a pu réaliser ce travail.

*Au Pr. **BOUKRAA Laid**, ancien directeur de cette étude, J'espère qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour l'aide précieuse et les conseils judicieux qu'il m'a prodigué tout au long de cet humble travail. Encore grand merci.*

*Au Dr. **KOUIDRI Mokhtaria**, directrice de cette étude, qui m'a guidé et conseillé tout au long de la réalisation de ce travail, pour sa disponibilité et son encouragement.*

Qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance. Encore grand merci

*Au professeur **TIR TOUIL MEDDAH Aicha**, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre thèse.*

Hommages respectueux,

*Au professeur **BENBAREK Hama** qui nous a honorés par sa participation à l'examen de ce travail.*

Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements.

*A M^{me} **SAHNOUNI Fatima** qui a bien accepté de faire part du jugement de ce travail.*

Je souhaite lui exprimer ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements.

*A M^{me} **MIHOUB Fatma***

C'est pour nous un immense plaisir de vous voir siéger parmi le jury de notre thèse. Nous vous prions de croire en l'expression de notre respect et reconnaissance d'avoir accepté de juger ce travail.

*A M^{me} **MOULAY Meriem** qui nous a fait le grand honneur de prendre part au jury de ce travail.*

Veuillez accepter, Madame, nos sincères remerciements et toute la reconnaissance que nous vous témoignons.

Je tiens à remercier vivement

DRs : BELHAMITI Belkacem Tahar et AIT AMRANE Amar, pour leur aide et contribution inconditionnelles, grand merci mes chers frères.

Dr HAMMOUDI Si Med, c'est un grand et cher frère.

Je vous serais reconnaissant à jamais.

Dr BELLIK Yuva qui m'a aidé et soutenu, grand merci, je vous serais reconnaissant à jamais.

Dr BENAICHATA Lazrag pour la réalisation de la partie statistique, je vous remercie infiniment.

Dr Aissat Saad pour son assistance et collaboration précieuses, je vous serais reconnaissant à jamais.

Je tiens à remercier vivement le staff administratif de l'ISV Tiaret

Pr BENALLOU Bouabdellah, Dr BENIA Ahmed, Dr HEMIDA Houari et Dr AMIRAT Mokhtar

Je tiens à remercier vivement l'équipe du laboratoire

Dr BENARABA Rachida et M^{elle} BENABDELLAH Fatima Pour leur aide et collaborations très précieuses,

A tous les enseignants et le personnel de l'Institut des Sciences Vétérinaires sans exception.

A mes très chers étudiants ; DRIDECHE Moulay, HAMRI Mokhtar, Rezki Hamza...

Que tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail de près ou de loin, y trouvent mes remerciements les plus sincères.

Sommaire

Liste des illustrations

Liste des abréviations

Liste des publications

Résumé

ملخص

Abstract

Introduction 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Diarrhée néonatale du veau

1- Introduction.....	6
2- Etiologie.....	6
2-1 Escherichia coli	7
2-2 Causes virales.....	8
2-2-1 <i>Rotavirus</i>	9
2-2-2 <i>Coronavirus</i>	10
2-3 <i>Cryptosporidiose</i>	11
3- Epidémiologie	13
3-1 Facteurs liés à la naissance.....	13
3-2 Gestion, logement et conditions d’ambiances	14
3-3 Prophylaxie et vaccinations	14
3-4 Facteurs alimentaires	14
3-5 Autres facteurs de risque.....	15
3-5-1 Le sexe	15
3-5-2 La race	15
4- Etude clinique	15
4-1 Pathogénie.....	15
4-2 Symptômes.....	17
5- Conséquences de la diarrhée.....	21
5-1 Perturbation Hydro-électrolytique.....	21

5-2 Acidose métabolique	21
5-3 Balance énergétique négative-hypoglycémie.....	22
6- Diagnostic	23

CHAPITRE II

Résistance aux antimicrobiens

1- Définition	26
2- Origine de l'antibiorésistance	26
2-1 La résistance naturelle	26
2-2 La résistance acquise	27
3- Résistance aux antibiotiques chez les animaux de ferme	27

CHAPITRE II

Traitement alternatif

1- Quelle est donc la solution ?	31
1-1 Les huiles essentielles	31
1-1-1 Activité antimicrobienne des huiles essentielles	32
1-1-2 Activité Antivirale	35
1-1-3 Activité antiparasitaire	36
1-1-4 Activité anti-oxydante	37
1-1-5 Présentation des plantes étudiées	38
1-2 Le miel	39
1-2-1 Définition	39
1-2-2 Propriétés physiologiques du miel	39
- Activité antimicrobienne	40
- Activité Antivirale	43
- Activité antiparasitaire	44
- Activité anti-oxydante	45
1-3 Effets indésirables et secondaires	45
1-3-1 Les huiles essentielles	45
1-3-2 Le miel	46

**PARTIE EXPERIMENTALE
MATERIEL ET METHODES**

1- Objectifs.....	50
2- Zone d'étude.....	50
3- Période d'étude.....	50
4- Laboratoire.....	51

Première partie

Isolements et identification des agents entéropathogènes

1- Animaux	53
2- Méthodes.....	53
2-1 Collecte des échantillons	53
2-2 Détection des bactéries entéropathogènes	54
2-2-1 Culture bactériologique.....	54
2-2-2 Identification des bactéries	54
2-2-2-1 Coloration de Gram	54
2-2-2-2 Tests biochimiques	54
2-2-2-3 Typage des <i>E. coli</i>	55
2-2-3 Antibiogramme	55
2-3 Détection des agents entéropathogènes	56
2-3-1 Test ELISA	56
2-3-1-1 Principe du test	57
2-3-1-2 Mode opératoire.....	57
2-3-1-3 Interprétation des résultats.....	58

Deuxième partie

Etude phyto-chimique et activité anti-oxydante

1- Matière première	60
1-1 Matériel végétal	60
1-2 Miel	61
2- Extraction de l'huile essentielle	61
2-1 Mode opératoire	61
2-2 Traitement de l'extrait	62

3- Analyse de la composition chimique des H.Es par CPG/SM et CPG/FID	62
4- Analyse des pollens	63
5- Analyse physico-chimique	63
6- Activités anti-oxydantes des huiles essentielles et des miels étudiées	64
6-1 Dosage des polyphénols totaux	64
6-2 Dosage des flavonoïdes.....	65
6-3 Pouvoir réducteur	66
6-4 Activité anti-radicalaire à l'égard du DPPH	67
6-5 Activité scavenger à l'égard du radical ABTS.....	68

Troisième partie

Etude in-vitro de l'activité antibactérienne

1- Préparation de l'inoculum	71
2- Test préliminaire « in vitro »	71
1-2 Huile essentielle.....	71
2-2 Miel.....	72
3- Détermination des CMI et CMB	72
3-1 Détermination des CMI de l'huile essentielle de la cannelle par la méthode d'incorporation	73
3-2 Détermination des CMI et CMB par la méthode de micro-dilution.....	73
Analyse statistique.....	76

Résultats & Discussion

Première Partie

Isolements et identification des agents entéropathogènes

1- Résultats bactériologiques	79
1-1 Fréquence d'isolement des bactéries	79
1-2 Typage des <i>E. coli</i>	80
1-3 Antibiogramme	82
1-4 La multirésistance	84

1-5 Prévalences des différents agents entéropathogènes détectés par le test ELISA	86
1-5-1 Prévalences globales des différents agents entéropathogènes détectés par le test ELISA	86
1-5-2 Prévalence des agents entéropathogènes détectés par le test ELISA selon les tranches d'âge.....	89
1-5-3 L'effet du sexe	92

Deuxième Partie

Etude phyto-chimique et activité anti-oxydante

1- Huile essentielle	94
1-1 Rendement	94
1-2 Composition chimique des huiles essentielles analysées par CG/MS CG/FID	95
1-3 Activité Anti-oxydante	101
1-3-1 Pouvoir réducteur	102
1-3-2 Activité anti-radicalaire (DPPH)	103
2- Miel	104
2-1 Origine botanique	104
2-2 Analyse du pollen.....	104
2-3 Caractéristiques physico-chimiques des variétés des miels étudiés.....	105
2-3-1 Teneur en eau	106
2-3-2 Conductivité électrique	107
2-3-3 pH du miel.....	108
2-3-4 Acidité libre.....	108
2-3-5 Hydroxymethylfurfural, invertase et diastase	109
2-4 Pouvoir antioxydant.....	110
2-4-1 Les polyphénols totaux	111
2-4-2 Flavonoïdes totaux	112
2-4-3 Pouvoir réducteur	113
2-4-4 Activité anti-radicalaire (DPPH)	113
2-4-5 Activité anti-radicalaire (ABTS)	114

Troisième Partie

Etude in-vitro de l'activité antibactérienne

1- Activité antibactérienne des huiles essentielles	117
1-1 Détermination de la sensibilité	117
1-2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de la cannelle	118
1-3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)	119
2- Activité antibactérienne du miel	122
5-1 Détermination de la sensibilité	122
5-2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)	122
Conclusion	127
Références Bibliographiques	129
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Partie Bibliographique

Figure 1: Pathogènes causant la diarrhée chez les veaux âgés de moins d'un mois, pourcentage des cas diagnostiqués par les centres de surveillance vétérinaire 2007-201112

Figure 2: Schémas simplifiés de divers mécanismes physiopathologiques impliqués dans les diarrhées néonatales du veau17

Figure 3: Muqueuse intestinale normale infectée par *C. parvum*19

Figure 4: Illustration de différents types de diarrhée20

Figure 5: Conséquences de la diarrhée23

Figure 6: Représentation schématique des voies de transmission de la RA entre les animaux d'élevage, l'environnement et les humains28

Figure 7: Nombre d'articles sur le miel référencés sur Pubmed de 1980 à 201340

Partie Expérimentale

Matériel & Méthodes

Figure 1: *Mentha spicata*60

Figure 2: Tuyaux de *C. aromaticum*61

Figure 3: Dispositif d'hydrodistillation62

Figure 4: Protocole de dosage des polyphénols.....65

Figure 5: Protocole de dosage des flavonoïdes65

Figure 6: Protocole de détermination du pouvoir réducteur67

Figure 7: Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire au DPPH68

Figure 8: Protocole de l'évaluation de l'activité scavenger à l'égard de l'ABTS69

Résultats & Discussion

Figure 9: Fréquence d'isolement des bactéries79

Figure 10: Typage des *E. coli* isolées80

Figure 11: Résultats de l'antibiogramme des isolats étudiés82

Figure 12: Résultats de l'antibiogramme des souches d'*E. coli* isolées82

Figure 13: La multi-résistance des isolats.....84

Figure 14: La multi-résistance des souches *E. coli* isolés.....85

Figure 15: Effet de l'H.E de *C. aromaticum* et de *M. spicata* sur: *E. coli* F5, F17 et ATCC 25922.....118

Liste des Tableaux

Partie Bibliographique

Tableau 1: Différents types de diarrhées néonatales étudiés du veau	18
Tableau 2: Sensibilité et résistance aux huiles essentielles de certaines bactéries d'importance clinique	34
Tableau 3 : Origines géographiques des miels et différents pathogènes testés	41

Partie Expérimentale

Matériel et Méthodes

Tableau 1: Répartition des échantillons en fonction d'âge et du sexe	53
Tableau 2: Répartition des échantillons en fonction de la race	54
Tableau 3: Liste des Antibiotiques à tester.....	56
Tableau 4: Interprétation des résultats de la lecture ELISA	58
Tableau 5: Variétés de miel étudiées	61

Résultats & Discussion

Tableau 6: Prévalences des agents entéropathogènes détectés chez les veaux diarrhéiques.....	86
Tableau 7: Prévalence des agents entéropathogènes selon différentes tranches d'âge	89
Tableau 8: Pourcentage des cas positifs mâles et femelles selon différentes tranches d'âge	92
Tableau 9: Rendement en huiles essentielles	94
Tableau 10: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Mentha Spicata</i> et <i>Cinnamomum aromaticum</i> par CG/MS – CG/FID	95
Tableau 11: Résultats de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des molécules de référence	102
Tableau 12: Type de pollens présents dans les échantillons du miel	104
Tableau 13: Valeurs de différentes propriétés physico-chimiques des trois variétés du miel	106
Tableau 14: Les valeurs des polyphénols totaux, des flavonoïdes, du pouvoir réducteur, et du statut antioxydant total des miels testés	111
Tableau 15: Halos d'inhibition* en (mm) (moyenne ± écart type) provoqués `par les huiles essentielles testées.....	117

Tableau 16: Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de <i>C. aromaticum</i>	118
Tableau 17: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles testées nécessaires pour inhiber 100% de la croissance microbienne in vitro exprimée en solution mg/ml (n = 3)	119
Tableau 18: Pouvoir antibactérien des miels testés à l'égard de trois souches d' <i>E. coli</i> (n = 3).....	122
Tableau 3.13: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des différentes variétés de miels testées nécessaire pour inhiber 100% de la croissance microbienne in vitro exprimée en % (p/v) (n = 3).....	125

% : pourcent	M. : <i>Mentha</i>
° : Degré	M. s : <i>Mentha spicata</i>
°C : Degré Celsius	mg : Milligramme
ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)	Mg Eq AG : Milligramme équivalence Acide gallique
ADN : Acide désoxyribonucléique	Mg Eq QE : Milligramme équivalence quercétine
ARN : Acide ribonucléique	MGEs : éléments génétiques mobiles
API : Analytical profile index	min : minute
ATCC : American Type Culture Collection	ml : Millilitre
BCoV : <i>Coronavirus</i> bovin	mM : Milli mole
C. : <i>Cryptosporidium</i>	mm : Millimètre
C. a : <i>Cinnamomum aromaticum</i>	MT/MC : Médecine traditionnelle/ Complémentaire et alternative
cfu : Colony Forming Unit	Na₂CO₃ : Carbonate de soude
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute	NaCl : chlorure de sodium
CMB : Concentration minimale bactéricide	nm : Nanomètre
CMI : Concentration inhibitrice minimale	NSP4 : protéines non structurales 4
DO : Densité Optic	Ø : Diamètre
DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	OMS : Organisation Mondiale de Santé
E. coli : <i>Escherichia coli</i>	p/p : Poids sur poids
EC₅₀ : La concentration efficace médiane ou the half maximal effective concentration	pH : Potentiel hydrogène
ETEC : <i>Escherichia coli</i> entérotoxigène	RA : résistance aux antimicrobiens
g : gramme	rpm : revolution per minute ou rotation per minute
GENN : gastroentérite néonatale	S. : <i>Staphylococcus</i>
H E : Huile essentielle	sp. : espèces
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène	ST : Thermostables
HMF : hydromethylfulfural	T. : <i>Toxoplasma</i>
IC₅₀ : La concentration inhibitrice médiane ou the half maximal inhibitory concentration	v/v : Volume sur volume
LT : Thermolabiles	µl : Microlitre
	NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

Publications

Sidi Mohammed Ammar Selles, Mokhtaria Kouidri, Yuva Bellik, Amar Ait Amrane, Belkacem Tahar Belhamiti, Ahmed Redha Benia, Si Mohamed Hammoudi and Laid Boukraa. 2018. **Chemical Composition, Antioxidant and *In vitro* Antibacterial Activities of Essential Oils of *Mentha spicata* Leaf from Tiaret Area (Algeria)**. Dhaka Univ. J. Pharm.Sci. 17(1): 87-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.3329/dujps.v17i1.37123>. **Catégorie B**

Sidi Mohammed Ammar Selles, Yuva Bellik, Mokhtaria Kouidri, Belkacem Tahar Belhamiti, Amar Ait Amrane, Si Mohamed Hammoudi, Laid Boukrâa. **2018. Physicochemical and antioxidant properties of algerian honeys and their antibacterial potency against three strains of *E. coli***. Pol. J. Natur. Sc., Vol 33(2): 285–300. **Catégorie B**

Sidi Mohammed Ammar Selles, Mokhtaria Kouidri, Belkacem Tahar Belhamiti Amar Ait Amrane, Ahmed Redha Benia, Si Mohamed Hammoudi, Rachid Kaidi, Laid Boukraa. 2018. **Enteropathogens associated with neonatal calves diarrhea in Tiaret area (Western Algeria)**. Veterinaria. 67 (2) : 97-103. **Catégorie B**

Selles Sidi Mohammed Ammar, Kouidri Mokhtaria, Ait Amrane Amar, Belhamiti Belkacem Tahar, Drideche Moulay, Hammoudi Si Mohamed and Boukrâa Laid. **Chemical Composition and Antibacterial Activity of Cinnamomum aromaticum Essential Oil Against Four Enteropathogenic Bacteria Associated with Neonatal Calve's Diarrhea**. Asian J. Anim. Vet. Adv., 12 (1): 24-30, 2017.

Yuva Bellik and **Sidi Mohamed Amar Selles**. 2017. **In vitro synergistic antioxidant activity of honey-Mentha spicata combination**. Journal of Food Measurement and Characterization. 11(1) : 111-118. DOI: 10.1007/s11694-016-9377-1 ISSN 2193-4126 **Catégorie A**

Présentations aux congrès

Poster présenté dans le cadre du Symposium international sur les plantes médicinales et aromatiques. Zarzis, Tunisie, Décembre 2016,

Selles Sidi Mohammed Ammar, Kouidri Mokhtaria, Ait Amrane Amar, Belhamiti Belkacem Tahar , Hammoudi Si Mohamed & Boukrâa Laid. **Etude de l'activité biologique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* cultivée dans la région de Tiaret (Algérie)**.

Cette étude a tracé comme objectifs ; déterminer la prévalence des agents infectieux associés aux diarrhées néonatales du veau âgé de moins de 30 jours (*Rotavirus* ; *Coronavirus* ; *E. coli entérotoxigène (ETEC)* ; *Cryptosporidium sp.*), l'âge critique pour l'apparition des diarrhées néonatales pendant le premier mois de la vie et l'antibio-résistance des souches bactériennes isolées, d'établir la composition physicochimique des trois variétés de miels (*Eucalyptus*, *Daucus carota* et multifloral) et la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata* et *Cinnamomum aromaticum*, d'évaluer l'activité anti-oxydante des ces huiles essentielles et ces miels et de tester leurs efficacités *in-vitro* vis-à-vis des isolats multi-résistants.

Soixante treize échantillons de matières fécales ont été collectés des veaux diarrhéiques, une culture bactériologique sur le milieu Mac Conkey, une identification par les Api E20, un typage des isolats d'*E. coli* à l'aide des réactifs conglutinés *E.coli* F5, F17, F41 et CS31A , un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques et un Kit ELISA double Sandwich pour le diagnostic des *Rotavirus*, des *Coronavirus*, des *Cryptosporidium sp.* et d'*Escherichia coli* entérotoxigène F5 ont été utilisés.

Les H.Es ont été extraites par hydrodistillation à partir des feuilles séchées de *Mentha spicata* et des tuyaux de *Cinnamomun aromaticum*. La composition chimique de ces H.Es a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) et GC couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Alors que leurs activités anti-oxydantes ont été évaluées par la méthode du pouvoir réducteur et la méthode de DPPH.

Différentes paramètres physicochimiques du miel, tels que le pH, l'acidité libre, la teneur en humidité, la conductivité électrique, le HMF, l'indice de saccharase et l'indice diastasique, les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux, le pouvoir réducteur, le DPPH et le statut anti-oxydant total ont été mesurés.

L'activité antibactérienne des HEs et des miels a été étudiée vis-à-vis de 30 isolats multi-résistants associés aux diarrhées néonatales du veau et d'une souche d'*Escherichia coli* ATTC 25922 par la méthode de micro-dilution.

E. coli a été la bactérie la plus dominante avec une fréquence d'isolement de 47,95%, alors que les sérotypes F5 et F17 ont été les plus réponsus avec des taux égaux de 28.57%. 70.97% des isolats et 62.86% des souches d'*E. coli* sont avérés multi-résistants. *Cryptosporidium* a été l'agent pathogène le plus dominant (40%), suivi par *E. coli* F5 (16%), *Coronavirus* (10%) et en fin *Rotavirus* (8%).

Le rendement en HE a été de l'ordre de 1.97 ± 0.09 % (p/p) pour *Mentha spicata* et 1.46 ± 0.05 % (p/p) pour *Cinnamomum aromaticum*. Le carvone (63.59%) et E-cinnamaldehyde (94.67%) ont été respectivement les constituants majoritaires de ces deux huiles essentielles. L'huile essentielle de *Mentha spicata* a exhibé un pouvoir réducteur et une activité scavenger sur le radical DPPH nettement supérieur à celle de *Cinnamomun aromaticum*.

La teneur en eau des miels a présenté des valeurs de 15,4 -18,0%, le pH variait de 4,19 à 4,34, l'acidité libre de 11.8 à 26.74 méq/kg, la teneur en HMF variait entre 11,2 et 100 mg.kg⁻¹, l'indice de saccharase a montré des valeurs de 3,2 à 20,7, l'indice de diastasique n'a été détecté que dans le miel *Daucus carota* (11.3) et la conductivité électrique variait entre 0,38 et 1,1 mS.cm⁻¹. Le miel de *Daucus carota* a montré la teneur phénolique totale la plus élevée ($850,48 \pm 167,29$ mg d'acide gallique / kg) et un pouvoir réducteur le plus élevé (0.771 ± 0.141), tandis que le miel d'*Eucalyptus* a exprimé la plus grande valeur de l'état antioxydant total (1.7637 ± 0.8596 mmol Eq Trolox/L).

L'étude de l'activité inhibitrice « *in vitro* », a montré des CMI de l'ordre de 0.59 à 4.75mg/ml pour *Mentha spicata*, 0.17 à 0.33 mg/ml pour *Cinnamomun aromaticum* et 12.5 (p/v) pour les trois variétés de miels étudiés à l'égard des isolats testés

La présente étude a révélé que les huiles essentielles et les miels étudiés peuvent constituer des alternatives d'agents antibactériens et antioxydants, qui pourraient être utilisés contre les isolats testés provoquant les diarrhées néonatales chez les veaux de moins de 30 jours.

Mots clés : diarrhée néonatale du veau, agents entéropathogènes, activité anti-oxydante, activité antibactérienne, miel, huile essentielle.

تم من خلال إجراء هذه الدراسة تسطير الأهداف التالية: تحديد معدل انتشار العوامل المعدية المسببة للإسهال عند العجل الذي لم يتجاوز عمره ثلاثين يوماً (*Coronavirus, Rotavirus, Escherichia coli entérotoxinogène (ETEC) et (Cryptosporidium sp.*).

تحديد السن الحرجة لظهور الإسهال عند حديثي الولادة خلال الشهر الأول من العمر و دراسة مقاومة البكتيريا المعزولة للمضادات الحيوية، تحديد الخصائص الفيزيائية و الكيميائية لثلاثة أنواع من العسل (*Eucalyptus, Daucus carota et Multifloral*) بالإضافة إلى تحديد التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية المستخلصة من نبات *Mentha spicata* و *Cinnamomum aromaticum* تقييم النشاط المضاد للأكسدة للعسل و الزيوت الأساسية ودراسة فعاليتها في المختبر ضد العزل البكتيرية المتعددة المقاومة تجاه المضادات الحيوية.

تم جمع ثلاث و سبعون عينة من براز عجول مصابة بإسهال و تم عزل البكتيريا عن طريق الزرع في وسط Mac Conkey وبعدها تم تحديد صنف البكتيريا بواسطة مجموعة من الاختبارات و المتمثلة في الاختبارات البيوكيميائية باستخدام نظام Api 20^E، تحديد الأنماط المصلية باستخدام أمصال التلازن الخاصة بـ F5, F17, F41 و CS41A وفي الأخير تم اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار، بالإضافة إلى هذا أجري اختبار المناعة المرتبط بالإنزيم (ELISA double) Sandwich من أجل تشخيص *Coronavirus, Rotavirus, Escherichia coli entérotoxinogène (ETEC) et (Cryptosporidium sp.*

استخلصت الزيوت الأساسية من الأوراق المجففة ل نبات *Mentha spicata* و عيدان *Cinnamomum aromaticum* بطريقة التقطير المائي، تم تحديد التركيب الكيميائي لهذه الزيوت بواسطة كروماتوغرافيا الغاز المدمج مع المطيافية الكتلية (GC-SM) و كروماتوغرافيا الغاز المدمج مع كاشف التأين باللهب بينما تم دراسة النشاط المضاد للأكسدة بواسطة القوة الإختزالية و طريقة DPPH.

أما فيما يخص العسل فتم قياس مختلف المعايير الفيزيائية و الكيميائية كدرجة الحموضة (pH)، الحموضة الحرة، النسبة المئوية للرطوبة، التوصيل الكهربائي، الهيدروكسي ميثيل فورفورال، نشاط إنزيم السكرز و إنزيم الدياستيز، الفينولات الكلية، الفلافونيدات الكلية، القوة الإختزالية، DPPH و النشاط المضاد للأكسدة الكلية.

تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للعسل و الزيوت الأساسية ضد 30 عزلة بكتيرية عديدة المقاومة للمضادات الحيوية مسببة للإسهال عند العجول حديثي الولادة و ضد سلالة مرجعية *Escherichia coli ATCC 25922* بطريقة التخفيف.

Escherichia coli كانت البكتيريا الغالبة حيث تم عزلها بنسبة 47,95%، بينما كان النمطين المصليين نوع F5 و F17 الأكثر انتشارا بنسبة عزل بلغت 70,97% و 28,57% على التوالي فيما أظهرت 62,86% من سلالات *Escherichia coli* مقاومة ضد العديد من المضادات الحيوية.

كان *Cryptosporidium* العامل الممرض الأكثر انتشارا بنسبة 40 متبوعا ب *Escherichia coli* نوع F5 بنسبة 16%، *Coronavirus* بنسبة 10% وفي الأخير *Rotavirus* بنسبة 8%.

بلغ مردود استخلاص الزيت الأساسي 0,09% ± 1,97 لـ *Mentha spicata* و 0,05% ± 1,46 لـ *Cinnamomum aromaticum*. بين التحليل الكروماتوغرافي أن المركبين الغالبين هما Carvanol (67.94%) و E-cinnamaldehyde (94.67%) لهذين الزيتين الأساسيين على التوالي. أظهر الزيت الأساسي لنبات *Mentha spicata* قوة اختزالية وفعالية كسح الجذور الحرة DPPH أكثر فاعلية مقارنة بالزيت الأساسي لـ *Cinnamomum aromaticum*.

تراوحت نسبة الرطوبة في العسل ما بين 15.4-18.0%، قيمة pH تراوحت بين 4.19 إلى 4.34، الحموضة الحرة 11.8 إلى 26.74 ملي مكافئ لكل كيلوغرام قيمة الهيدروكسي ميثيل فورفورال تراوحت ما بين 11.2 و 100 ملغ/كغ، تراوح نشاط السكرانيزما بين 3.2 إلى 20.7 بينما لم يكتشف نشاط الدياستيز إلا في عسل *Daucus carota* و بلغت قيمته 11.3، تراوحت قيمة التوصيل الكهربائي ما بين 0.38 إلى 1,1 ملي سيمنز لكل سم، بلغ محتوى الفينولات الكلية أكبر قيمة في عسل *Daucus carota* ملغ (29, 48±167, 850 حمض الغاليك لكل كغ) كما أظهر هذا العسل قوة اختزالية كبيرة قدرت قيمتها ب 0.771±0.141 بينما كان النشاط الكلي المضاد للأكسدة أكثر فعالية في عسل *Eucalyptus* إذ بلغت قيمته (1.7637±0.8596 mmol Eq Trolox/L).

تراوحت قيمة التركيز الأدنى المثبط (CMI) لنمو السلالات البكتيرية المدروسة ما بين 0.59 إلى 4.75 ملغ/مل بالنسبة للزيت الأساسي لـ *Mentha spicata* و 0.17 إلى 0.33 ملغ/مل بالنسبة لـ *Cinnamomum aromaticum* و 12.5% بالنسبة لأنواع العسل الثلاثة.

أثبتت الدراسة الحالية أن الزيوت الأساسية و أنواع العسل الثلاثة التي تمت دراستها يمكن أن تستخدم كبدايل عن المضادات الحيوية و مضادات الأكسدة ضد البكتيريا المسببة للإسهال عند العجول التي يبلغ عمرها أقل من ثلاثين يوماً.

الكلمات المفتاحية: الإسهال عند العجل حديثي الولادة ، مسببات الأمراض المعوية ، نشاط مضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للبكتيريا ، العسل ، الزيوت الأساسية.

This study focused on the following objectives; Determination of the prevalence of infectious agents associated with neonatal diarrhea in calves less than 30 days old (*Rotavirus*, *Coronavirus*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *Cryptosporidium* sp.), locate the critical moment of onset of neonatal diarrhea during the first month of life, test the antibiotic resistance of isolated bacterial strains, establish the physicochemical composition of three varieties of honeys (*Eucalyptus*, *Daucus carota* and multifloral) and the chemical composition of the essential oils (H.Es) of *Mentha spicata* and *Cinnamomum aromaticum*, evaluate the antioxidant activity of the essential oils and honeys studied, test the in-vitro efficacy of natural products (essential oil and honey) against multidrug-resistant isolates.

Seventy-three faecal samples collected from diarrheic calves were examined bacteriologically using Mac Conkey medium, the fimbriae antigen (F5, F17, F41) and the fimbrial adhesin CS31A were determined by slide agglutination using specific antiserum, the standardized disc diffusion assay was used to estimate the antimicrobial sensibility and the Sandwich ELISA assay was used for screening the four major agents associated with neonatal calves diarrhea (*Rotavirus*, *Coronavirus*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *Cryptosporidium* sp.).

The essential oil was obtained by hydrodistillation from dried leaves of *Mentha spicata* and bark of *Cinnamomum aromaticum*. The essential oil obtained was analysed by GC-MS/GC-FID. The antioxidant activity was determined by DPPH radical scavenging method and reducing power.

Several physicochemical parameters including pH, free acidity, moisture content, electrical conductivity (EC), Hydroxymethylfurfural (HMF), invertase number and diastase number were measured. Total phenolic contents, flavonoid contents, DPPH radical scavenging, reducing power and ABTS scavenging activity were determined.

The antimicrobial activity of essential oil and honeys was evaluated by the broth microdilution method against 30 multidrug-resistant isolates associated with neonatal diarrhea in calves and one strain of *Escherichia coli* ATTC 25922.

Bacterial culture identified *E. coli* in 47.95 % of the samples. The fimbriae F5 and F17 were the most common with equal rates of 28.57%. 70.97% of all bacteria isolated and 62.86% of *E. coli* were shown as being multidrug resistant. *Cryptosporidium* was the dominant enteropathogen (40%) followed by *E. coli* F5 (16%), *Coronavirus* (10%) and end *Rotavirus* (8%).

The average yield of the essential oil was in the order of $1.97 \pm 0.09\%$ (w / w) for *Mentha spicata* and $1.46 \pm 0.05\%$ (w / w) for *Cinnamomum aromaticum*. Carvone (63.59%) and E-cinnamaldehyde (94.67%) were respectively the majority constituents of these two essential oils. The essential oil of *Mentha spicata* exhibited a reducing power and a scavenger activity on the DPPH radical, which is distinctly higher than that of *Cinnamomum aromaticum*.

The moisture contents vary from 15.4% to 18.0%, pH values ranged between 4.19 and 4.34, the free acidity values varied from was 11.8 to 26.74 meq / kg, HMF contents ranged between 11.2 and $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$, invertase number showed values of 3.2 and 20.7, electrical conductivity ranged between 0.38 and 1.1 mS.cm^{-1} and diastase number was detected only in *Daucus carota* honey (11.3). *Daucus carota* honey showed the highest level of polyphenols ($850.48 \pm 167.29 \text{ mg gallic acid/kg}$) and the highest reducing power (0.771 ± 0.141), while *Eucalyptus* honey showed the best ABTS scavenging activity ($1.7637 \pm 0.8596 \text{ mmol Eq Trolox/L}$).

The study of antibacterial activity "in vitro", showed MICs of essential oil varied from 0.59 to 4.75 mg / ml for *Mentha spicata*, 0.17 to 0.33 mg / ml for *Cinnamomum aromaticum* and 12.5 (w / v) for three varieties of honey studied against all tested bacteria.

The present study revealed that the essential oils and honeys studied can be alternatives to antibacterial and antioxidant agents, which could be used against the tested isolates causing neonatal diarrhea in calves less than 30 days old.

Keywords: Neonatal calves' diarrhea, enteropathogens, antioxidant activity, antibacterial activity, honey, essential oil.

Introduction

Partie
Bibliographique

Les diarrhées néonatales sont de par le monde l'une des pathologies du veau les plus importantes (**Tajik et al., 2012**). Elles constituent la cause majeure de pertes économiques (**Cho et al., 2013**), soit directement par la morbidité et la mortalité qu'elles engendrent ou indirectement par le coût du traitement et la faible croissance suite à l'épisode diarrhéique (**Alfieri et al., 2006**). L'incidence d'apparition de la diarrhée chez les veaux laitiers âgés de moins de 30 jours est de 19,1 et 21,1 %, respectivement (**Windeyer et al., 2014 et Bartels et al., 2010**). Ce risque élevé de développer la diarrhée pendant le premier mois de la vie tend à diminuer avec l'âge (**Izzo et al., 2011**). En outre, le risque de létalité est présent et peut varier de 1.5 à 8 % (**Lorino et al., 2005**).

Les diarrhées néonatales ont une étiologie complexe et multiple, incriminant le plus fréquemment les virus (rotavirus et coronavirus), les protozoaires (*Cryptosporidium parvum*) et les bactéries (*Escherichia coli* K99 et *Salmonella* sp.) (**Izzo et al., 2011**). Parmi les bactéries, les *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC) peuvent provoquer une diarrhée sévère chez les nouveau-nés grâce à la production d'une entérotoxine thermostable (STa). Les fimbriae les plus fréquemment observés sur l'ETEC chez les veaux atteints de diarrhée sont K99 (F5) et F41, bien que des souches de F17 aient été isolées (**Nguyen et al., 2011**).

En addition aux pertes économiques enregistrées, Les bactéries résistantes aux antibiotiques représentent une menace très grave pour la santé publique. De nos jours, le problème le plus critique de la médecine moderne est l'émergence rapide de nombreuses souches de bactéries résistantes aux antibiotiques (**Wang et al., 2012**). De plus, le problème de la résistance aux médicaments n'est pas limité aux bactéries pathogènes, mais il implique également la flore bactérienne commensale qui peut devenir un réservoir majeur de souches résistantes (**Erb et al., 2007**).

De nombreuses plantes sont utilisées comme épices pour améliorer la saveur des aliments et sont consommées en petites quantités, ce qui contribue à des niveaux bas à la valeur nutritionnelle de l'alimentation. Cependant, comme il s'agit de composés du métabolisme secondaire qui peuvent avoir une activité pharmacologique, il existe actuellement un intérêt croissant pour les extraits de plantes en tant que sources de composés antimicrobiens, antioxydants et comme moyen d'éviter des problèmes potentiels provoqués par une consommation excessive d'additifs synthétiques (**Scherer et al., 2013**). Les huiles essentielles sont des produits naturels précieux utilisés comme matières premières dans de nombreux domaines, y compris les parfums, le cosmétique, l'aromathérapie, la phytothérapie, les épices et la nutrition. L'aromathérapie est l'utilisation thérapeutique de parfums ou au moins de simples substances volatiles pour guérir, atténuer ou prévenir les maladies, et les infections (**Boukhebt et al., 2011**).

Les huiles essentielles, en particulier celles provenant de la cannelle, de la menthe poivrée, de l'arbre à thé, de la lavande et de la marjolaine, ont été bien étudiées pour leurs propriétés antimicrobiennes générales contre plusieurs microorganismes pathogènes (Yap et al., 2013).

L'utilisation du miel comme remède traditionnel pour les infections microbiennes remonte aux temps anciens (Boukraâ et Bellik, 2011). Le médecin romain Celsus (vers 25 ans av J-C) a utilisé le miel comme remède contre la diarrhée (Molan, 1999). La propriété de guérison du miel est due à sa composition chimique (Arvanitoyannis et al., 2005). Le miel contient des quantités abondantes de polyphénols et de flavonoïdes qui lui confèrent de bonnes propriétés antimicrobiennes. L'action antimicrobienne est due à sa forte osmolarité, à son faible pH, à sa teneur en peroxyde d'hydrogène et à certains composés mineurs non caractérisés (Alzahrani et al., 2012a, Beretta et al., 2005).

La nature antibactérienne du miel dépend de divers facteurs fonctionnant soit singulièrement soit de manière synergique, les plus saillants étant: le peroxyde d'hydrogène (produit par la glucose oxydase ajoutée au miel par les abeilles), les phénoliques et les hydroxyacides aliphatiques de la gelée royale et les acides dicarboxyliques insaturés, l'acidité du miel et la pression osmotique exercée par le miel (Isodorov et al., 2015). Kwakman et al. (2010) ont indiqués que l'activité bactéricide du miel est due à sa concentration élevée en sucre, le H₂O₂, le 1,2-dicarbonyle méthylglyoxal (MGO), le peptide antimicrobien cationique abeille défensine-1 et le faible pH.

Dans ce sens notre étude a tracé les objectifs suivants :

- Evaluer la prévalence des agents infectieux (*Rotavirus* ; *Coronavirus* ; *E. coli* entérotoxigène (ETEC) ; *Cryptosporidium* sp.) impliqués dans les diarrhées néonatales,
- Déterminer l'âge critique pour l'apparition des diarrhées néonatales pendant le premier mois de la vie,
- Déterminer l'antibio-résistance des bactéries isolées,
- Déterminer la composition physicochimique des différents miels étudiés,
- Déterminer la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata* et *Cinnamomum aromaticum*,
- Déterminer l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des miels étudiés,
- Tester *in-vitro* l'efficacité des produits naturels (plantes médicinales et produit de la ruche) vis-à-vis des bactéries multi-résistantes.

Chapitre 1 :
Diarrhée
Néonatale
Du veau

1- Introduction

Le succès de tout élevage bovin dépend, entre autres, de la réussite de l'élevage des veaux de remplacement. La diarrhée des veaux est une entité de maladie multifactorielle qui peut avoir de graves répercussions financières et sur le bien-être des animaux tant chez les troupeaux laitiers que chez les troupeaux à viande. A l'exemple des élevages laitiers modernes, la durée moyenne de séjour d'une vache dans un troupeau de traite est d'environ quatre ans et, par conséquent, 25 % du troupeau de traite doit être remplacé chaque année (**Yimer et al., 2015**).

Les diarrhées néonatales sont l'une des pathologies du veau les plus importantes dans le monde (**Tajik et al., 2012**). Elles constituent la cause majeure de pertes économiques (**Cho et al., 2013**), soit directement par la morbidité et la mortalité qu'elles engendrent ou indirectement par le coût du traitement et la faible croissance consécutifs à l'épisode diarrhéique (**Alfieri et al., 2006**).

L'incidence d'apparition de la diarrhée chez les veaux âgés de moins de 30 jours varie entre 15 à 20 %. De plus, le risque de létalité peut varier de 1,5 à 8 % (**Lorino et al., 2005**). Ce risque élevé de développer la diarrhée pendant le premier mois de la vie tend à diminuer avec l'âge (**Izzo et al., 2011b**).

2- Etiologie

La diarrhée néonatale des veaux est d'une étiologie complexe et multifactorielle [infectieuse (bactérie et virus), parasitaire (protozoaire) et alimentaire]. Elle résulte d'une combinaison d'un environnement défavorable, d'une immunité insuffisante de l'hôte et de l'intervention d'agents infectieux (**Barrington et al., 2002 ; Millemann et Maillard, 2007**). Bien qu'une faille dans l'un de ces facteurs puisse conduire à la maladie, les épidémies de diarrhée néonatale reflètent habituellement un problème dans les trois domaines (**Millemann, 2009**). En effet, le syndrome diarrhéique peut être influencé par les facteurs environnementaux et de managements ; à savoir une faible température, une hygiène médiocre, une non absorption du colostrum, une sensibilité individuelle de l'animal et une suralimentation lactée (**Alfieri et al., 2006**). Cependant les facteurs infectieux y sont prépondérants, Selon **Cho et al. (2013)**, ces facteurs infectieux sont les causes majeures des diarrhées des veaux (80%), chacun ayant une incidence différente selon l'âge du veau atteint (**Bradford et Smith, 2008**). Les agents pathogènes (parasites, virus ou bactéries) agissent seuls ou en association. En effet, sur un même veau coexistent souvent deux agents infectieux ou plus. Plus de 50% des veaux diarrhéiques seraient

infectés simultanément avec plus d'un pathogène. La co-infection avec deux agents pathogènes serait la plus fréquente (**Cho et al., 2013**).

Il ressort de différentes études que *E. coli* entérotoxigène (ETEC), *Rotavirus*, *Coronavirus*, et *Cryptosporidium parvum* sont les quatre principaux entéropathogènes associés avec les diarrhées néonatales du veau (**Holland, 1990 ; Shams et al., 2012**). Selon **Radostits et al. (2000)**, ces pathogènes sont collectivement responsables de par le monde de 75 à 95% des infections chez les veaux nouveaux nés.

Par conséquent, cette partie est surtout consacrée à l'étude de ces quatre principaux agents.

2- 1 *Escherichia coli*

E. coli appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des germes Gram négatifs, mobiles, anaérobies facultatifs, non sporulés. La plupart des variétés sont des habitants commensaux du tractus gastro-intestinal, mais quelques variétés expriment des facteurs de virulence, ce qui accroît leur capacité à causer une variété d'infections intestinales ainsi que le syndrome diarrhéique chez les animaux nouveau-nés de ferme et chez l'homme (**Holland, 1990**).

E. coli reste l'un des principaux agents impliqués dans les diarrhées/septicémies des veaux de moins d'une semaine (**Fournier et Naciri, 2007**). Les études épidémiologiques des veaux de boucherie et des veaux laitiers ont incriminé *E. coli* enterotoxinogène (ETEC) comme la cause majeure de la diarrhée néonatale survenant au cours des quatre premiers jours de vie, cependant elle est rarement à l'origine de diarrhée chez les veaux plus âgés ou adultes. Immédiatement après la naissance, l'exposition orale aux coliformes fécaux conduit à la colonisation de l'intestin par la flore commensale normale et ces organismes continuent à se déplacer caudalement avec l'ingesta à travers le tractus gastro-intestinal. Si la contamination environnementale est élevée, les organismes ETEC sont ingérés en même temps et sont capables de produire la maladie causée par la présence de deux facteurs de virulence, la fimbriae K99 ou F5 et la toxine thermostable STa. Comme les *E. coli* non pathogènes sont extrêmement fréquents, les cultures fécales comme test de diagnostic sont peu utiles si la présence de ces deux facteurs de virulence ne peut être démontrée (**Foster et Smith, 2009**).

Presque toutes les ETEC d'avoient adhéré aux récepteurs de l'épithélium de l'intestin grêle par leur fimbriae sans induire des modifications morphologiques significatives. Cependant, elles secrètent des entérotoxines qui réduisent l'absorption et augmentent la sécrétion de fluides et d'électrolytes de l'intestin grêle (**Nagy et Fekete 2005**).

Les fimbriae les plus communément observées chez les veaux sont F5 (K99) et le F41 (Nagy et Fekete ; 1999 ; Scott et al., 2004 ; Achá et al., 2004 ; Foster and Smith, 2009 et Nguyen et al., 2011). De plus, les souches F17 (Nguyen et al., 2011) et F165 (Achá et al., 2004) peuvent être aussi isolées. Les diarrhées à *E. coli* F5 sont l'une des plus fréquentes chez les très jeunes veaux (Maes, 2010). Cependant, au delà du 2 jours d'âge Les cellules intestinales des veaux acquièrent une résistance naturelle à l'adhésion du facteur d'attachement F5 (Bradford et Smith, 2008).

Deux classes biologiques d'entérotoxines, thermolabiles (LT) et thermostables (STa et STb) sont produites par ETEC. La plupart des ETEC bovines produit STa (Guth 2000). C'est cette dernière qui est responsable de l'hypersécrétion dans la lumière de l'intestin (Nagy et Fekete, 2005 ; Ok et al., 2009 ; Nguyen et al., 2011).

Dubourguier et al. (1979) ont démontré que STa est responsable de l'ensemble des symptômes observés chez le veau diarrhéique. En effet, on a pu voir la même évolution clinique (mort en 24 - 48 heures en état de déshydratation) après administration de 10^{10} *E. coli* entérotoxigène (K99+, ST+) et par perfusion directe de la toxine ST dans l'intestin du veau.

En fait, les entérotoxines induisent une sécrétion nette d'eau et d'électrolytes (sodium, chlorure et potassium) vers la lumière intestinale, après contact avec la muqueuse intestinale par un mécanisme indépendant des lésions cellulaires structurales. Bywater (1977) a en effet montré que ces pertes étaient les plus importantes dans la partie distale de l'intestin grêle. La réponse aux exotoxines est locale ; ces substances n'agissant que dans les segments inoculés et non dans les segments adjacents.

2-2 Causes virales

Plusieurs familles de virus peuvent être à l'origine de diarrhées chez les animaux nouveaux nés de fermes, comprenant ; *Reoviridae*, *Coronaviridae*, *Toroviridae*, *Parvoviridae*, *Calciviridae* et *Astroviridae* (Deng et al., 2003). Depuis l'observation successive (en 1975) dans des matières fécales de veaux diarrhéiques au microscope électronique par Mebus et ses collègues du *Rotavirus* (appelé à l'époque « reo-like virus ») et du *Coronavirus* entérique bovin, il est apparu que ces deux virus jouent un rôle important dans l'étiologie des gastro-entérites néonatales, compte tenu de leur pouvoir pathogène et de leur incidence (Dufresne, 2003). Dans une étude menée en Grande-Bretagne, le *Rotavirus* et le *Coronavirus* ont été détectés, respectivement, chez 208 (42%) et 69 (14%) de 490 veaux diarrhéiques (Reynolds et al., 1986). En effet, il est toujours reconnu que les *Rotavirus* et le *Coronavirus* sont les causes les plus fréquentes des

diarrhées virales néonatales du veau (**Mayameei et al., 2010**). Il n'est pas rare que ces deux virus peuvent concomitamment infecter les veaux (**Holland, 1990; Alfieri et al., 2006; Oliveira Filho et al., 2007**).

2-2-1 Rotavirus

Les *Rotavirus* sont les principaux agents étiologiques de la gastro-entérite virale aiguë chez les jeunes de nombreuses espèces animales et humaines, et sont à l'origine d'importantes pertes économiques chez les nouveau-nés de nombreux animaux domestiques (**Kapikian et Chanock, 1996**). Selon le Comité International de la taxonomie des Virus, les *Rotavirus* appartiennent à la famille des *Reoviridae*, sous famille des *Sedoviridae* et le genre *Rotavirus*. Ce genre comprend cinq différentes espèces, *Rotavirus* A-E (**ICTV, 2011**).

La plupart des *Rotavirus* bovins (95%) appartiennent au groupe A, bien que les *Rotavirus* des groupes B et C aient également été identifiés (**Ghosh et al., 2007**).

Dans certains rapports, le *Rotavirus* est le pathogène le plus répandu chez les veaux diarrhéiques de moins d'un mois (**Reynolds et al., 1986 ; Radostits et al., 2007**), et provoque de la diarrhée chez les veaux de un à deux semaines d'âge (**Chinsangaram et al., 1995**).

La prise de lait par le veau peut offrir un bon environnement pour la survie du *Rotavirus* a une large gamme de niveaux du pH gastro-intestinal ainsi que le virus infectant les cellules épithéliales intestinales (**Dhama et al., 2009**). Cela pourrait expliquer la susceptibilité des veaux non sevrés. Le virus se réplique dans le cytoplasme des cellules épithéliales des villosités de l'intestin grêle (**Holland, 1998**). Ainsi, la destruction des entérocytes matures dans les villosités, l'activation du système nerveux entérique par des composants vasoactifs provenant des cellules endommagées et la sécrétion d'une entérotoxine virale (par exemple, NSP4) expliquent la diarrhée (mal-digestion/malabsorption) lors de l'infection par le *Rotavirus* (**Martella et al., 2010**). En effet d'assez récentes études ont montré que la protéine virale NSP4 peut agir comme une entérotoxine. Après la lyse cellulaire, la protéine se fixe aux cellules et entraîne la sécrétion de chlorure dans la lumière intestinale, provoquant ainsi une diarrhée osmotique (**Dhama et al., 2009**). Ceci est corroboré par le fait que la diarrhée ait souvent lieu avant même que les changements histologiques ne soient visibles (**ICTV et King, 2012**).

En plus, les changements inflammatoires causés par l'infection dans l'intestin grêle donnent à l'intestin une hyper-mobilité se traduisant par une diminution de l'absorption de liquide. Le résultat final de tous ces facteurs est une diarrhée aqueuse et la plupart du

temps sans sang et sans mucus. Si le mucus et le sang sont présents, il proviennent probablement d'une infection bactérienne secondaire (**Dhama et al., 2009**).

Généralement, la maladie causée par le *Rotavirus* seul est bénigne mais l'association à d'autres micro-organismes entéropathogènes peut se traduire par des syndromes graves, pouvant conduire à une déshydratation prononcée et la mort de l'animal (**Scherrer et Laporte, 1983**).

En effet, une infection combinée du *Rotavirus* et de l'*E. coli* entérotoxigène provoque une diarrhée beaucoup plus importante qu'une infection seule à *Rotavirus*, et particulièrement pour les veaux de quelques jours, quand le *Rotavirus* produit normalement une maladie peu bénigne et que les veaux sont résistants aux *Escherichia coli* entérotoxigènes (**Radostits et al., 2001**). L'infection simultanée ou successive par le *Rotavirus* permet à *E. coli* de coloniser les veaux plus âgés, ce qui traduit donc une synergie entre les *Rotavirus* et *E. coli* entérotoxigène chez les veaux de plus de 2 jours, pouvant expliquer ainsi les diarrhées fatales chez le veau d'une semaine, qui normalement ne sont pas fatales avec une seule infection. Le *Rotavirus* accroît en fait la colonisation des *E. coli*, les effets semblent s'additionner et non s'amplifier (**Radostits et al., 2001**).

Les preuves de transmission inter-espèces et de réassortiment génétique entre *Rotavirus* humains et animaux (par exemple, porcine, bovine, féline et canine) ont soulevé la préoccupation zoonotique des *Rotavirus* (**Martella et al., 2010**).

2-2-2 Coronavirus

Les *Coronavirus* sont un groupe de virus qui peuvent causer une grande variété de signes cliniques. Le *Coronavirus* bovin est une cause fréquente de maladies gastro-intestinales et respiratoires. Il est associé à trois syndromes bien connus chez les bovins: la dysenterie hivernale des bovins adultes, les maladies respiratoires à différents âges et la diarrhée néonatale des veaux (**Maclachlan et al., 2011**).

Le *Coronavirus* bovin appartient à la famille des *Coronaviridae*, sous famille des *Coronavirinae*, genre *BetaCoronavirus*, espèce *BetaCoronavirus 1* (**ICTV, 2011**).

Le virus infecte d'abord la muqueuse nasale où une répllication intensive se produit. De grandes quantités de virus sont ensuite avalées avec les sécrétions accrues de mucus et sont transportées vers le tractus gastro-intestinal (**Saif, 2010**).

Le *Coronavirus* bovin (BCoV) est une cause fréquente de diarrhée néonatale chez les veaux âgés de 3 à 21 jours (**Athanassious et al., 1994**).

La répllication du virus a lieu dans l'épithélium des villosités de l'intestin grêle et de l'épithélium cryptique du colon. La destruction virale des cellules entraîne une atrophie

des villosités, une dilatation des cryptes, une diminution du nombre de cellules caliciformes et une diarrhée aqueuse abondante. La mal-digestion, la malabsorption, l'inflammation, la perte sécrétoire nette et les forces osmotiques qui en résultent contribuent probablement tous à la physiopathologie de la diarrhée à *Coronavirus* chez les veaux (Carman et Hazlett, 1992). La diarrhée est souvent aggravée par la co-infection avec d'autres pathogènes gastro-intestinaux courants comme *E. coli*, *Cryptosporidium*, torovirus et *Rotavirus* (Maclachlan et al., 2011).

2-3 *Cryptosporidium*

Les cryptosporidies sont des protozoaires du Sous-règne Protozoa, Embranchement des Apicomplexa, Classe des Sporozoea, Sous-classe des Coccidea, Ordre des Eimeriida, famille des Cryptosporidiidae, Genre *Cryptosporidium* (Fichou, 2003). *Cryptosporidium* sp est un protozoaire cosmopolite, reconnu comme l'une des causes les plus fréquentes de diarrhée néonatale (Naciri et al., 2007).

Vingt-six espèces de *Cryptosporidium* sont répertoriées (Rieux, 2013). Les bovins sont sensibles à l'infection par *C. parvum*, *C. ryanae*, *C. bovis* et *C. andersoni*. Toutefois, *C. parvum* constitue une potentielle source zoonotique et la cause principale de la diarrhée néonatale du veau (Chalmers et al., 2011, Cho et Yoon, 2014). En effet, dans le genre *Cryptosporidium*, deux espèces au moins affectent les bovins : *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium andersoni*. Cependant, *C. andersoni*, localisé à la caillette des bovins adultes, est considéré comme peu pathogène alors que *C. parvum*, localisé à l'intestin grêle est le plus fréquemment impliqué dans les troubles diarrhéiques, de plus son caractère zoonotique lui confère une importance majeure en santé publique (Enemark et al., 2002).

Les veaux sont généralement infectés entre une et quatre semaines d'âge. La cryptosporidiose se produit moins fréquemment chez les veaux allaitants en pâture, mais quand ils sont atteints, les symptômes sont plus sévères que chez les veaux de lait, avec un taux de mortalité allant jusqu'à 30%. Les anticorps neutralisants présents dans le colostrum ou le lait réduisent l'infection en immobilisant le parasite, bloquant l'invasion, empêchant l'adhésion aux cellules de l'hôte, ou en ayant une cytotoxicité directe sur les sporozoïtes. (Bradford et Smith, 2008).

Après ingestion, les ookystes libèrent des sporozoïtes qui se fixent aux microvillosités des cellules superficielles de la muqueuse intestinale (Fichou, 2003 ; Bradford et Smith, 2008). Ceux-ci se transforment en trophozoïtes qui sont invaginés par la membrane cytoplasmique et restent donc extra cytoplasmiques (Bradford et Smith, 2008). Cette invasion entraîne la destruction de l'épithélium et une atrophie bénigne à

modérée des villosités. Cela empêche l'absorption intestinale et entraîne donc une diarrhée par malabsorption des nutriments et malnutrition (Fichou, 2003 ; Bradford et Smith, 2008).

Cryptosporidium parvum est souvent le seul pathogène trouvé dans la diarrhée des veaux (Singh et al., 2006). Il semblerait que la prévalence du parasite augmente avec l'effectif des veaux dans le troupeau, et que les petites fermes n'ont que peu de problèmes avec la cryptosporidiose (Hamnes et al., 2006). Cependant, l'infestation par *C. parvum* comme cause de la diarrhée du veau est encore discutée due au fait que *C. parvum* est couramment observée chez les animaux sains. Dans certaines études, on n'a trouvé aucune association entre l'infection par *C. parvum* et la diarrhée ou d'autres signes cliniques (De Rycke et al., 1986, Huetink et al., 2001).

La maladie est généralement auto-limitante chez les animaux en bonne santé, mais elle augmente en sévérité chez les veaux en présence d'autres pathogènes tels que le *Rotavirus* (Holland, 1990).

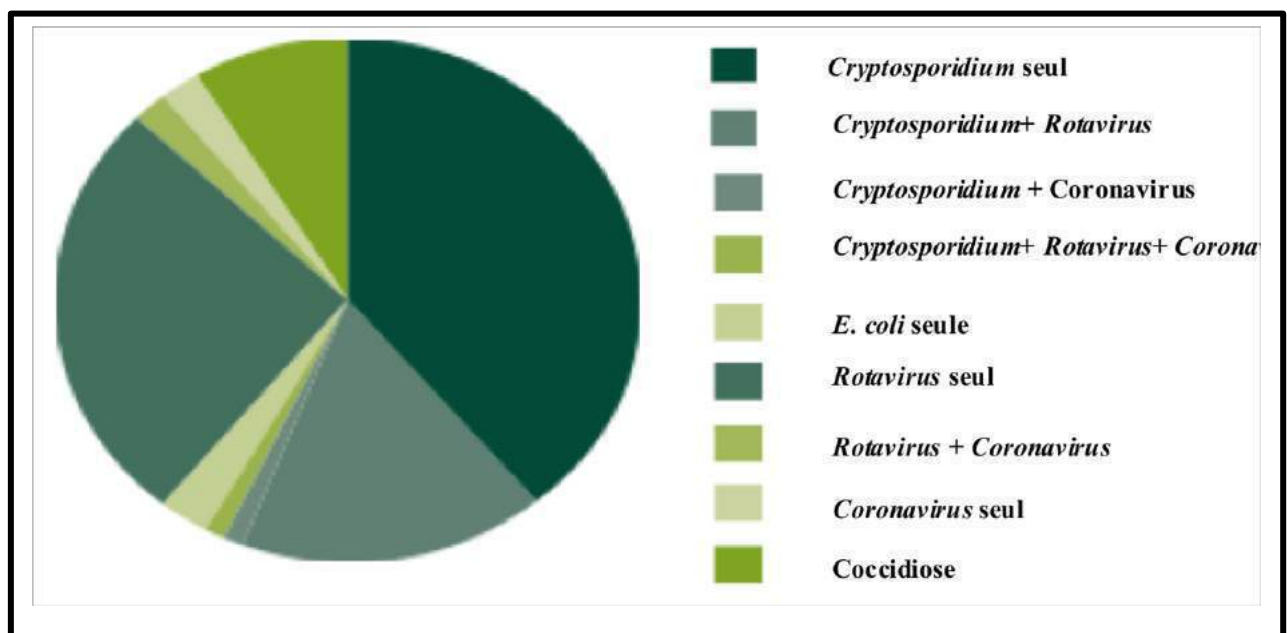


Figure 1 : Pathogènes causant la diarrhée chez les veaux âgés de moins d'un mois, pourcentage des cas diagnostiqués par les centres de surveillance vétérinaire 2007-2011 (Hotchkiss et al., 2015).

3- Epidémiologie

Les études de prévalence sont limitées à un nombre relativement réduit de germes pour des raisons liées aux techniques de mise en évidence. *Rotavirus*, *Coronavirus*, *E. coli entérotoxigène* (ETEC) et *Cryptosporidium parvum* sont les quatre principaux entéropathogènes associés aux diarrhées néonatales du veau dans le monde (75 % à 95 %) (Tzipori, 1985; De La Fuente et al., 1998). De plus, *Salmonella* spp. peut être particulièrement importante chez les veaux laitiers (Reynolds et al., 1986 ; Walter-Toews et al., 1986).

De nombreux facteurs favorisent ou aggravent l'infection et conditionnent l'apparition de la maladie. Ces facteurs de risque agissent soit en augmentant la pression microbienne dans l'environnement du veau, soit en diminuant les moyens de défense du nouveau-né (Bendali, 1998). Roy, (1990) ; estime que 30% des veaux sains possèdent au moins un agent microbien susceptible d'engendrer la diarrhée, quand les conditions s'y prêtent.

Les facteurs de risque peuvent être liés à la naissance, à la gestion de l'élevage, au logement et aux conditions d'ambiance, aux facteurs d'alimentation, à la prophylaxie et /ou à d'autres paramètres (Bendali, 1999 ; Lorino et al., 2005).

3-1 Facteurs liés à la naissance

La dystocie constitue une source de stress pour le veau nouveau-né, ce qui diminue la résistance aux pathogènes (diminution de la vivacité du veau et retarde l'ingestion du colostrum). En outre, les veaux nouveau-nés qui ont besoin d'aide pendant la mise bas peuvent être affaiblis pendant de longues périodes après la naissance, et deviennent ainsi exposés à des agents pathogènes fécaux plus que les veaux qui se lèvent peu après la naissance (Bendali et al., 1999 ; Lorino et al., 2005).

De même les veaux présentant une dyspnée à la naissance avaient un risque 1,85 fois plus élevé de développer la diarrhée (Bendali et al., 1999).

Des études ont estimé que les veaux nés de génisses ont une incidence de diarrhée 2 fois plus élevée par rapport aux autres et cela que les mères soient vaccinées ou non (54% contre 12% pour les vaccinées, et 74% contre 33% pour les non vaccinées) (Cornaglia et al., 1992).

Le colostrum et la désinfection de l'ombilic n'ont pas d'influence sur l'apparition des diarrhées néonatales du veau (Bendali et al., 1999 ; Lorino et al., 2005).

Toutefois, le transfert passif d'immunoglobulines est influencé par la concentration d'immunoglobulines dans le colostrum, le volume de colostrum ingéré et le moment de

l'ingestion après la naissance. En outre, le réflexe de succion et la vivacité du veau, la conformation de la mamelle et des trayons influencent l'apport d'une quantité adéquate de colostrum (**Bendali et al., 1999**).

3-2 Gestion, logement et les conditions d'ambiance

Un taux d'ammoniac élevé (mauvaise ventilation ou une quantité insuffisante de paille) constitue un paramètre favorisant pour l'apparition des gastro-entérites (**Bendali et al., 1999 ; Lorino et al., 2005**). Il y en est de même pour une densité élevée (surpopulation) où le risque de morbidité est estimé à 1,74 fois plus que pour les veaux avec suffisamment d'espace (**Bendali et al., 1999**).

Le climat intervient directement sur la sensibilité du nouveau-né. Des écarts importants de température et d'humidité nécessitent des dépenses supplémentaires d'énergie pour lutter contre le stress thermique, ce qui affaiblit les moyens de défense du veau et favorisent les infections. Toutefois, Lors de temps froids et humides, les éleveurs ont tendance à confiner et à grouper leurs animaux, ce qui augmente la densité et favorisent la contamination (**Bendali, 1998**).

Habituellement, l'incidence des GENN est plus élevée en hiver qu'en été. Outre les raisons météorologiques (température, précipitations), d'autres facteurs supplémentaires semblent jouer un rôle important tel que les changements des pratiques et des habitudes d'élevage ainsi que des variations physiologiques et alimentaires (**Bendali, 1998**).

Le risque des maladies néonatales, en particulier des GENN, s'accroît en fin de saison de vêlage. Ceci serait dû à l'augmentation du nombre de naissances dans l'exploitation entraînant une forte densité des animaux et une augmentation de la pression microbienne (**Clement et al., 1995**).

3-3 Prophylaxie et vaccinations

Les veaux nés dans les troupeaux non vaccinés (vaccination contre un ou plusieurs agents gastro-intestinaux) avaient un risque de 2,1 fois plus élevé de manifester la diarrhée (**Bendali et al., 1999**).

3-4 Facteurs alimentaires

Des constatations contre-versées ont été rapportées à ce sujet. Une supplémentation minéralo-vitaminique offerte aux vaches pendant la période de tarissement (**Waltner-Toews et al., 1986**) ou aux veaux (**Bendali et al., 1999**) diminue le risque de morbidité par les GENN. Alors que **Schumann et al. (1990)** ainsi que **Lorino et al. (2005)** ont cité une augmentation des risques d'apparition des diarrhées chez le veau.

3-5 Autres facteurs de risque

3-5-1 Le sexe

Les mâles semblent être deux fois plus sensibles aux diarrhées que les femelles (**Clement et al., 1995**) . De même pour la durée moyenne de maladie qui est plus courte chez les femelles (1,6 jours pour le femelle contre 1,9 jours pour le mâles) (**Quigley et al., 1995**).

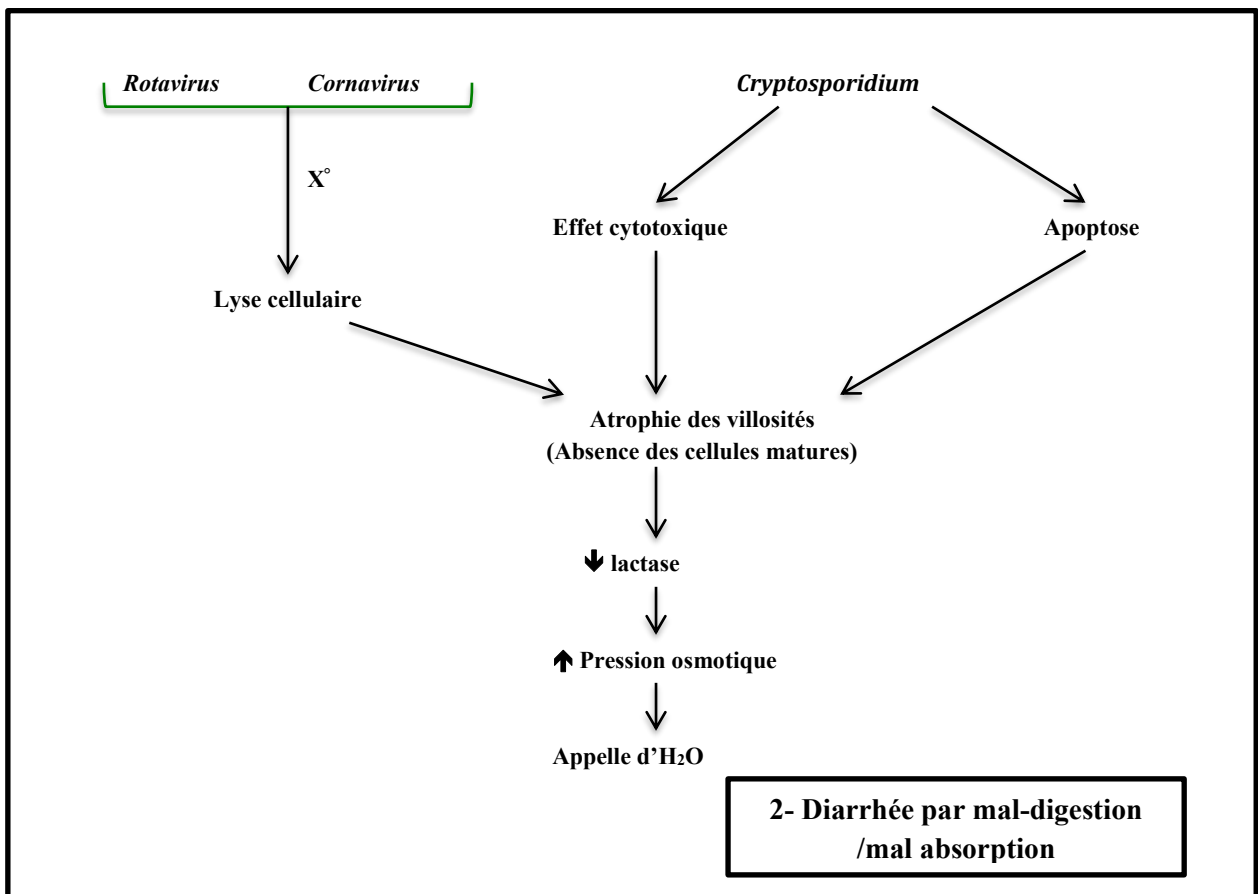
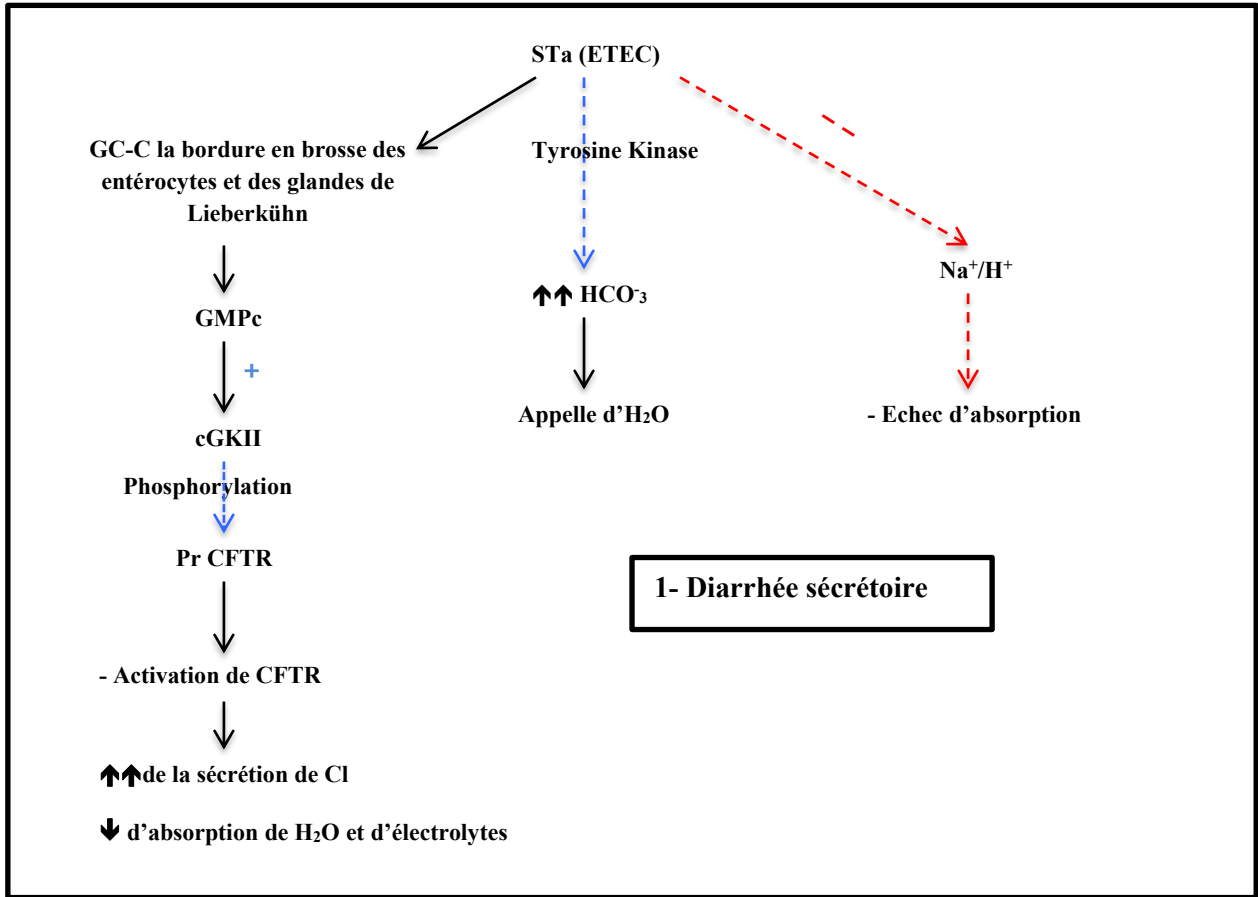
3-5-2 La race

Les veaux de race laitière semblaient moins touchés que ceux de race allaitante (13% contre 23%) (**Bendali, 1998**). Cela s'explique par La différence de la richesse du colostrum en immunoglobulines entre les races (**Tyler et al., 1999, Boussenna et Sfaksi, 2009**).

4- Etude clinique

4-1 Pathogénie

Après pénétration des germes par voie orale (**Thiry et al., 2002 ; Geurden et al., 2004 ; Foster et Smith, 2009 ; Dhama et al., 2009**), diverses localisations des germes tout au long de l'intestin grêle sont observées. Trois types de processus physiopathologiques (sécrétoire, malabsorption/mal-digestion et inflammatoire (**Argenzio, 1985 ; Foster et Smith, 2009**)).



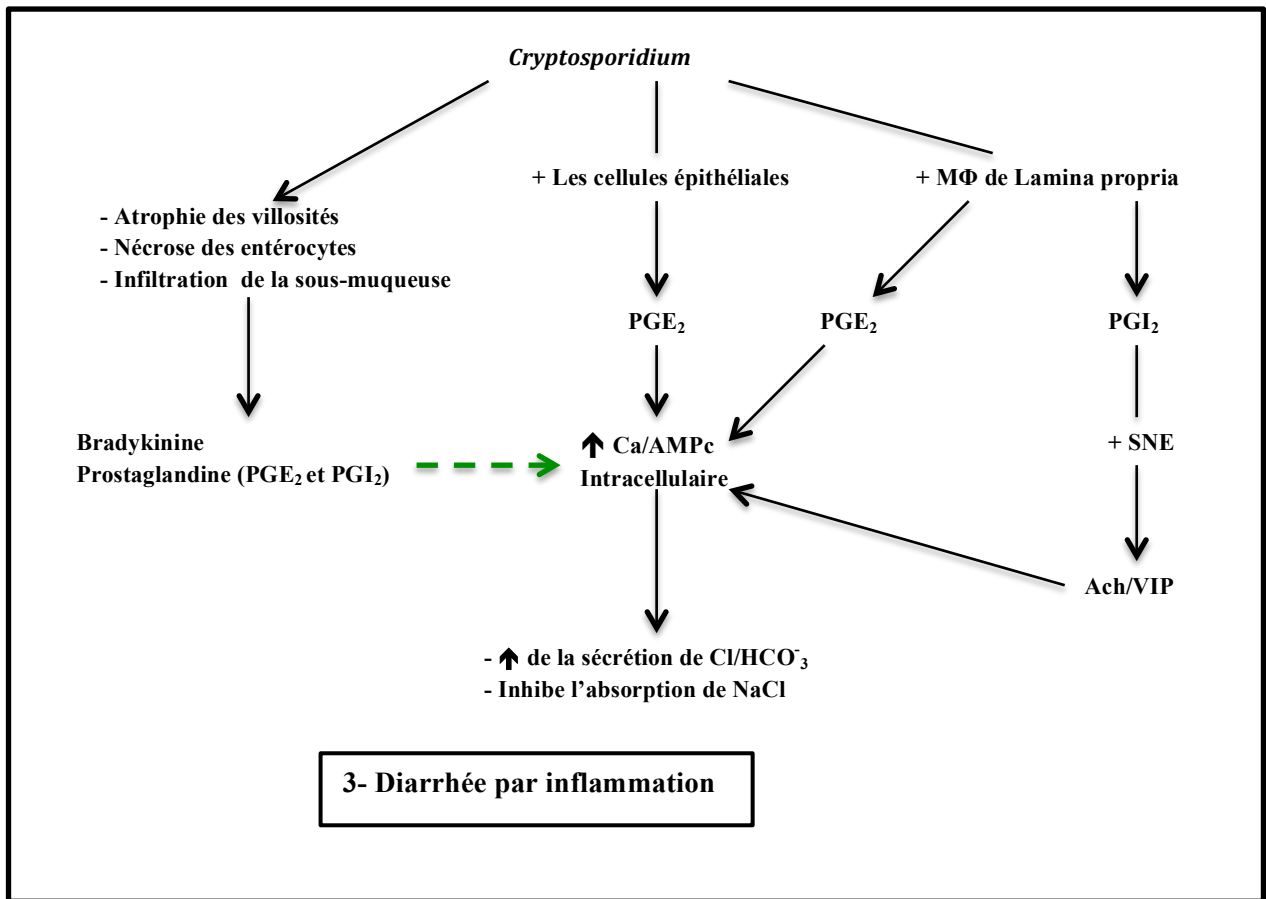


Figure 2: Schémas simplifiés de divers mécanismes physiopathologiques impliqués dans les diarrhées néonatales du veau (Illustration personnelle).

STa : toxine thermostable a, **GC-C** : récepteur membranaire guanylate cyclase-C, **GMPc** : guanosine monophosphate cyclique, **cGKII** : Protéine kinase II GMPc-dépendante, **CFTR** : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, **PGE₂** : Prostaglandines E₂, **PGI₂** : Prostaglandine I₂, **SNE** : Système nerveux entérique, **MΦ** : macrophages **AMPC** : Adénosine monophosphate cyclique, **Ach** : Acétylcholine, **VIP** : peptide vasoactif intestinal, **X^o** : multiplication, + : Stimule, - : Inhibe, **↑** : Augmente, **↓** : diminue.

4-2 Symptômes

Selon l'âge de l'apparition, les symptômes ainsi que les lésions rencontrés lors des diarrhées néonatales du veau dépendent de l'agent causal. Le tableau 1.1 résume les différents types de diarrhées néonatales étudiés chez le veau.

Tableau 1 : Les différents types de diarrhées néonatales étudiés du veau

Agent causal	Age d'apparition	Aspect de la diarrhée	Symptômes associés	Lésions	Références bibliographiques
<i>E. coli F5</i>	Les premières quatre jours de vie	- Aqueuse, très liquide de couleur jaune paille	- Déshydratation sévère et rapide - Faiblesse - Extrémités froides - Choc hypovolémique - Mort en 48 à 72 heures		Rousseau (2006) Smith (2008) Foster et Smith (2009) Millemann (2009) Cho et Yoon (2014)
<i>Rotavirus</i>	1 à 2 semaines (pic au alentour du 6 ^{ème} jours)	-Diarrhée mucoïde devenant rapidement aqueuse, de couleur jaune pâle à verdâtre	- Dépression - Anorexie - Déshydratation - Apyrexie sauf surinfection secondaire	- Raccourcissement des villosités de l'intestin grêle - Infiltration de la lamina propria par des cellules inflammatoires mononuclées	Cilli et Castrucci (1981) Dhama et al. (2009) Holland (1990) Scott et al. (2004) Foster et Smith (2009) Cho et al. (2014)
<i>Coronavirus</i>	3 premières semaines (Pic d'incidence entre 7 à 10 jours)	Diarrhée mucoïde puis liquide de couleur jaune pouvant parfois contenir du sang, des fragments de lait non digérés ou du mucus	- Apathie - Anorexie - Hyperthermie - Hypersalivation - Déshydratation - Acidose	- Atrophie et une fusion des villosités de l'intestin grêle - Atrophie des crêtes du côlon	Dea et al.(1981) Clark (1993) Scott et al. (2004) Smith (2008) Foster et Smith (2009) Millemann (2009) Dash et al. (2012) Içen et al. (2013)
<i>Cryptosporidium</i>	5 à 15 jours	Diarrhée aqueuse, profuse, de couleur jaune pâle et ayant une odeur désagréable	- Fièvre - Déshydratation - Dépression - Anorexie - Amaigrissement	- Atrophie des villosités - Hyperplasie des cryptes - Points de nécrose de la muqueuse intestinale - Infiltrations de l'épithélium des villosités et de la lamina propria par des mononucléaires et des granulocytes neutrophiles	Koudela et Jiri (1997) Abrahamsen (1998) Sevinc et al. (2003) Björkman et al. (2003) Smith (2008) Wyatt et al. (2010)

Mauvaise digestion du lait + <i>E. coli</i> CS31A ou F17	Plus de 11 jours	Diarrhée ±collante (mastic) à odeur de beurre rance ou de pourriture (diarrhée plâtreuse)	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté à rester debout - Démarche ivre et chancelante (entérotoxines paralysantes) - Ventre enflé et douloureux - Peu de déshydratation 		Rousseau (2006)
--	------------------	---	--	--	------------------------



Figure 3: Muqueuse intestinale normale et infectée par *C. parvum* à partir d'un iléon de veau à 100 μm . (A) muqueuse iléale normale du veau. (B) et (C). La muqueuse iléale du veau infectée expérimentalement avec *C. parvum*. Notons l'émoussement des villosités et l'hyperplasie des cryptes. Il y a des changements histologiques plus sévères dans (C), car les villosités sont plus atrophiées et la muqueuse ne recouvre plus complètement la lamina propria (hématoxyline et éosine) (**Foster et Smith, 2009**).

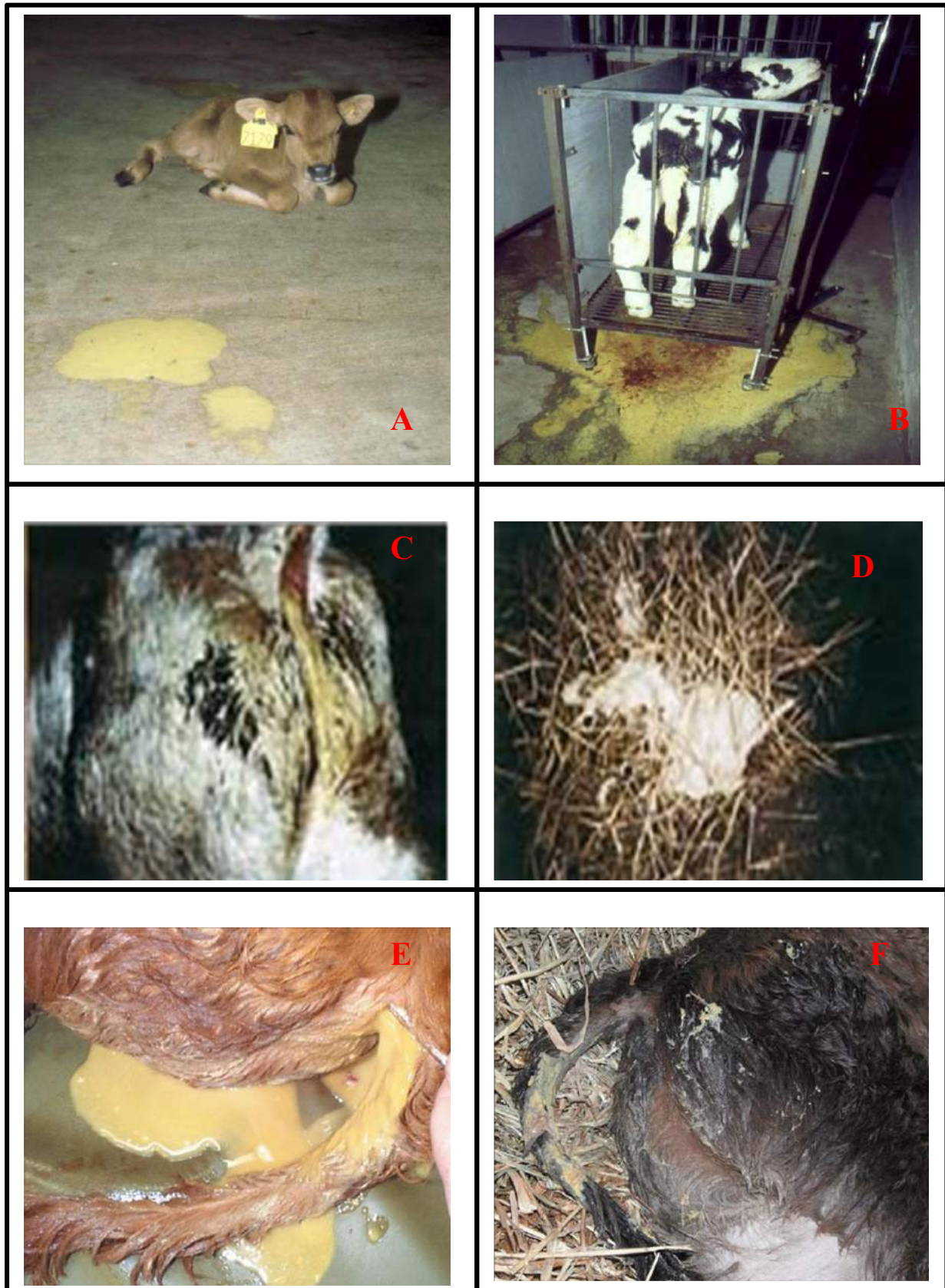


Figure 4: Illustration de différents types de diarrhée : (A) Un veau de race Jersey avec de la diarrhée et des signes systémiques de la maladie. Le veau est réticent à se tenir debout et a un faible réflexe de succion. (B) Un veau de race Friesian-Holstein avec une diarrhée aqueuse profuse qui contient du sang. (C) Diarrhée à cryptosporidies. (D) Diarrhée blanche plâtreuse. (E) diarrhée aqueuse jaune/verte chez un veau de 10 jours atteint de *Rotavirus*. (F) *E. coli* entérotoxigénique a provoqué un début soudain de diarrhée jaune / blanche abondante avec déshydratation sévère chez le veau

(Rousseau, 2006 ; Constable, 2009 ; Scott et al., 2011).

5- Conséquences de la diarrhée (Figure 5)

Les différents mécanismes physiopathologiques responsables du déclenchement de la diarrhée chez le veau peuvent contribuer aux pertes fécales nettes d'eau, de sodium, de potassium, de chlore, de bicarbonate et d'énergie et aboutissent aux quatre anomalies majeures présentes en toute ou en partie chez les veaux diarrhéiques (la déshydratation, l'acidose, les troubles électrolytiques et la balance énergétique négative) (**Rollin, 2002**).

5-1 Perturbation hydro-électrolytique

La diarrhée provoque la plupart du temps de grandes pertes fécales d'eau et d'électrolytes qui sont souvent sous-estimés et peuvent aller de 13 à 18% du poids corporel/ jour. Ce qui entraîne chez les jeunes veaux une déshydratation extracellulaire hypo-osmotique, caractérisée par une diminution des concentrations sériques de glucose, sodium, potassium et chlorure (**Berchtold, 2009**).

Cependant, l'anomalie électrolytique qui mérite une attention toute particulière est l'hyperkaliémie (**Rollin, 2002**). C'est le résultat de la translocation de potassium intracellulaire vers le compartiment extracellulaire (**Berchtold, 2009**). Cette hyperkaliémie va engendrer une réduction de la différence de potentiel membranaire responsable du fonctionnement des cellules musculaires cardiaque et squelettiques. L'action sur les muscles squelettiques va aggraver la faiblesse du veau, mais c'est la cardiotoxicité qui est la plus grave. Elle se traduit par une bradycardie puis si l'hyperkaliémie devient sévère ($> 8 \text{ mmol/l}$), il peut y avoir une arythmie du bloc auriculaire jusqu'à la fibrillation ventriculaire (**Albin, 2002**).

5-2 Acidose métabolique

L'acidose métabolique est le trouble métabolique le plus important mais aussi le plus sous-estimé. En général, elle augmente en sévérité avec la durée de la diarrhée (**Rollin, 2002**).

Plusieurs facteurs sont responsables de cette acidose:

- Les pertes intestinales d'ions de bicarbonate dans les matières fécales (**Trefz et al., 2012**);
- La production d'acide lactique par glycolyse anaérobie suite à l'hypoxie tissulaire associée à la vasoconstriction périphérique résultant elle-même de la diminution du volume sanguin (**Rollin, 2002**);
- La diminution de la filtration glomérulaire d'ions d'hydrogène à la suite d'une réduction de la perfusion rénale (**Trefz et al., 2012**);

- L'absorption d'acides organiques à courte chaîne produits en grande quantité par une flore intestinale anormale dans le colon (**Rollin, 2002**).

L'origine de l'acidose diffère selon le mécanisme physiopathologique de la diarrhée :

Diarrhées sécrétoires (type colibacillaire) : elle est consécutive à la perte intestinale massive en HCO_3 sans augmentation du trou ionique.

Diarrhées par malabsorption : elle est la conséquence d'accumulation des acides organiques exogènes (L- et D-lactate : résultant de la fermentation bactérienne du lactose non digéré) dans la circulation sanguine accompagnée d'une augmentation du trou ionique (**Albin, 2002 ; Rollin, 2002**).

L'acidose a un effet dépresseur sur le système nerveux central et le système cardiovasculaire ; elle provoque une inconscience ou une dépression avec faiblesse, ataxie et une diminution ou une disparition des réflexes de succion (**Albin, 2002**).

L'effet neurotoxique du D-lactate provoque un dysfonctionnement du système nerveux avec un réflexe palpébral retardé. Les veaux atteints apparaissent fatigués avec des yeux fermés, une démarche chancelante et certains se couchent avec une patte antérieure étendue vers l'arrière parallèle au corps (**Berchtold, 2009**).

5-3 Balance énergétique négative - Hypoglycémie

Chez les veaux diarrhéiques, la combinaison ; d'anorexie, de la diminution de l'absorption des nutriments et d'augmentation du catabolisme (**Albin, 2002 ; Rollin, 2002**) ; conduit à une balance protéo-calorique négative reflétée ou non par une hypoglycémie. Celle-ci intervient le plus souvent lors des diarrhées sévères, mais elle est aussi fortement évocatrice d'une endotoxémie (**Rollin, 2002**).

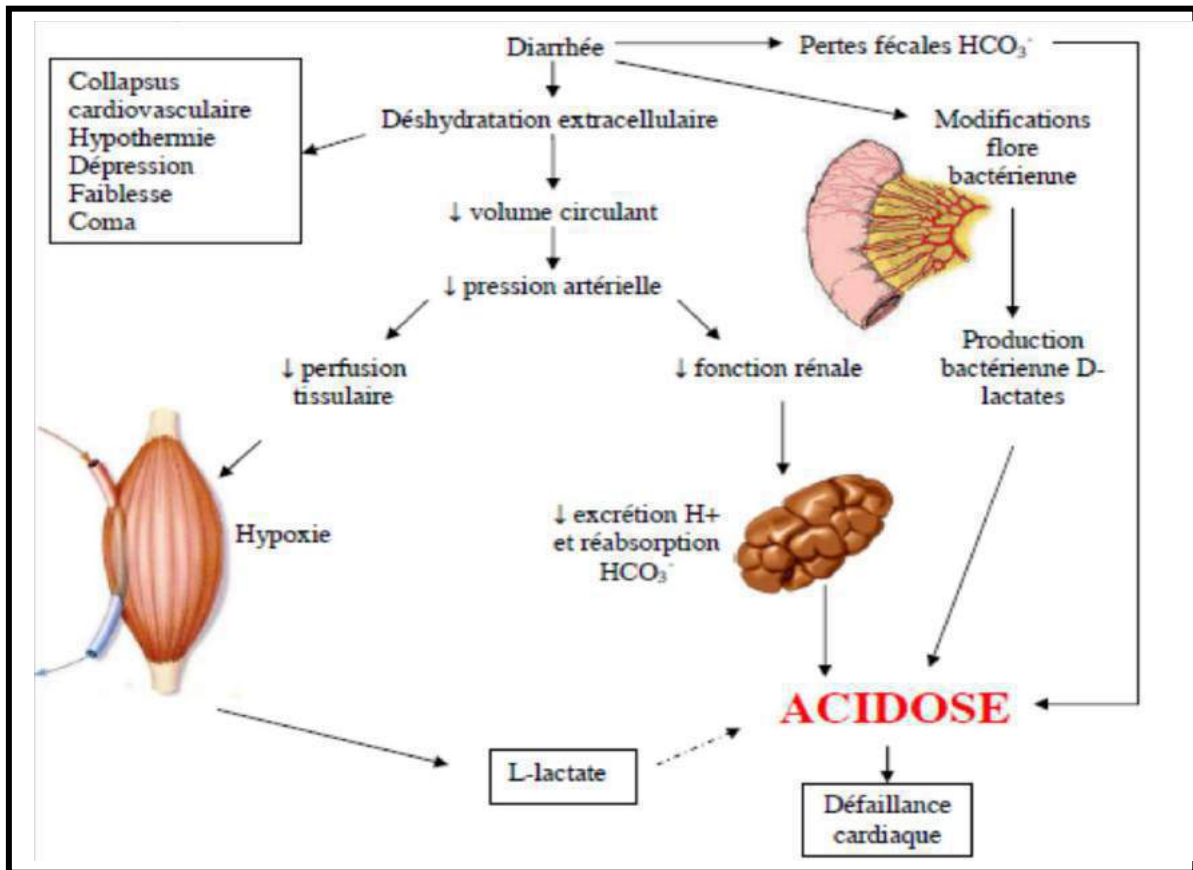


Figure 5: Conséquences de la diarrhée (Payagalage, 2013).

6- Diagnostic

La difficulté de diagnostic clinique des entérites néonatales infectieuses réside dans la fréquence des signes cliniques et des lésions non spécifiques, la présence d'infections asymptomatiques, l'implication de plusieurs agents, et les interactions de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui prédisposent l'hôte à l'infection (Athanasios et al., 1994). Pour ces raisons, les analyses de laboratoire permettant d'identifier les agents infectieux s'avèrent d'une grande utilité (Bendali, 1998).

De nombreux tests de diagnostic de laboratoire sont disponibles. Ces techniques utilisées dépendent de l'agent infectieux que l'on souhaite isoler et de l'objectif de l'analyse (Bendali, 1998). Des techniques simples tel que la culture bactérienne (Cho et Yoon, 2014), le sérotypage et l'antibiogramme (Bendali, 1998) et les techniques de concentration et de coloration (Naciri, 1994) font partie. La microscopie électronique et d'autres techniques plus sensibles (ELISA, l'agglutination sur latex, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le PCR (polymerase chain reaction) et le RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), et la microscopie immunoélectronique,

d'immuno-marquages et à immunofluorescence peuvent être utilisés également (**Geurden et al., 2004 ; Mayameei et al., 2010 et Cho et Yoon, 2014**).

Le FISH (L'hybridation *in situ* en fluorescence) (**Jex et al., 2008**), la PCR nichée (Nested PCR), le RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction = *Restriction Fragment Length Polymorphism*) sont d'autant de méthodes utilisées dans le diagnostic poussé surtout des cryptosporidies (**Maud-Leconte, 2013**).

Le diagnostic étiologique de la diarrhée des veaux doit être fait le plus rapidement possible. En effet, comme les agents infectieux sont généralement impliqués, il est important de vérifier que l'agent ou les agents circulants dans un troupeau lors d'une épidémie déclenchée sera / seront déterminés. Un traitement et une prophylaxie adaptée peuvent être mis en place en fonction de la nature de l'agent en cause (**Millemann, 2009**).

Chapitre 11 :
Résistance Au
Antimicrobiens

1- Définition

La résistance aux antimicrobiens (RA) est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se recoupent pas forcément. Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*) (Muylaert et Mainil, 2012).

Selon la définition microbiologique, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice (Bonnet, 2014). Autrement dit ; une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées (Muylaert et Mainil, 2012).

Pour la définition clinique : une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place (Muylaert et Mainil, 2012 ; Bonnet, 2014).

2- Origine de l'antibiorésistance

On cite classiquement deux types de résistance : résistance naturelle et résistance acquise.

2-1 La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspondant à la capacité de résister à la présence d'un antibiotique pour toutes les souches d'une espèce ou d'un genre bactérien. Habituellement, le support de cette résistance est chromosomique (Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001).

Ces mécanismes de résistance sont spontanés et assez constants. L'absence ou la réduction de sensibilité à un antibiotique peut être due à (Muylaert et Mainil, 2012) :

- Un manque d'affinité du composé pour la cible bactérienne (par exemple, la faible affinité de l'acide nalidixique pour la gyrase des entérocoques) ;
- Une inaccessibilité de la molécule à la cellule bactérienne (impermeabilité de la membrane externe des bactéries Gram négatives aux glycopeptides comme la vancomycine) ;
- Une expulsion de l'antibiotique par des pompes à efflux chromosomiques (résistance aux tétracyclines, au chloramphénicol et aux quinolones chez *Pseudomonas aeruginosa*), ou encore ;
- Une inactivation enzymatique innée de l'antibiotique (la production d'une bêta-lactamase AmpC chez certains membres de la famille *Enterobacteriaceae*).

2-2 La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes (**Guinoiseau, 2010**). C'est une propriété de souche. Cette résistance correspond à la capacité de supporter une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle supportée par les autres souches de la même espèce (**Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001**). On décrit deux phénomènes majeurs à la base de l'acquisition de résistances par modifications du génome bactérien, à savoir, les mutations responsables des résistances endogènes, et l'acquisition horizontale de matériel génétique étranger responsable des résistances exogènes (**Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012**).

3- Résistance aux antibiotiques chez les animaux de ferme

La non discrimination dans l'utilisation des antibiotiques s'est soldée par l'émergence d'un certain nombre de bactéries, de virus et de fungi résistants aux antibiotiques (Reichling et al., 2009). Cette RA chez les humains est liée à la RA dans d'autres populations, en particulier les animaux de ferme ainsi que l'environnement au sens large. Les quelques espèces bactériennes à l'origine de maladies chez les humains et cibles des antibiotiques, constituent un minuscule sous-ensemble de la diversité globale des bactéries, incluant le microbiote intestinale ainsi qu'un grand nombre dans le sol (**Woolhouse et al., 2015**).

Il y a une augmentation générale du nombre de micro-organismes résistants de par le monde, bien que les motifs spécifiques varient considérablement d'un pays à l'autre. Il y a eu une augmentation significative à travers l'Europe dans les pourcentages de *Klebsiella pneumoniae* résistant aux fluoroquinolones, aux céphalosporines de troisième génération et aux aminoglycosides, ainsi que la résistance combinée aux trois groupes d'antibiotiques. La résistance des *Escherichia coli* aux céphalosporines de troisième génération a également augmenté de façon significative, passant de 9,6% à 12,0% entre 2011 et 2014.

Cependant, la résistance peut passer entre ces différentes populations; en effet la résistance homologue de gènes a été trouvée dans les pathogènes, la flore normale et les bactéries du sol. Les animaux de la ferme sont un élément important de ce système complexe: ils sont exposés à d'énormes quantités d'antibiotiques (malgré les tentatives de réduction) et constituent un autre réservoir de gènes de résistance. Le trafic bidirectionnel des bactéries MRA entre les fermes et la clinique est un fait établi (**Woolhouse et al., 2015**).

Bon nombre d'études et rapports de surveillance mentionnent que ces RA sont largement répandues chez les animaux de ferme. Une étude effectuée en 1999 sur 195 souches de *E. coli* a montré que 89-95% de ces souches étaient très sensibles à l'apramycine

(Orden et al., 2000). Des études plus récentes font état chez les veaux nouveaux nés d'*E. coli* résistante à l'apramycine et l'ampicilline (Yates et al., 2004 ; Hoyle et al., 2004a, 2004b, 2005), un niveau élevé de résistance à l'ampicilline a été détecté même dans les fermes biologiques (Hoyle et al., 2006).

Il existe plusieurs liens et interactions entre les humains, les animaux et l'environnement qui permettent non seulement le mouvement des bactéries mais aussi des éléments génétiques mobiles (MGEs) ainsi que des médicaments eux-mêmes (Woolhouse et Ward, 2013). L'image devient encore plus complexe lorsque nous considérons les antimicrobiens affectant plus d'une espèce de microbe, et que la résistance se déplace régulièrement entre les espèces de microbes via les MGEs. Plus récemment, il a été fait état dans des élevages d'entérobactéries résistantes au carbapenème (Fischer et al., 2013). Le carbapenème n'est pas utilisé chez les animaux, et la source de cette résistance ne pourrait être que humaine (Woolhouse et al., 2015).

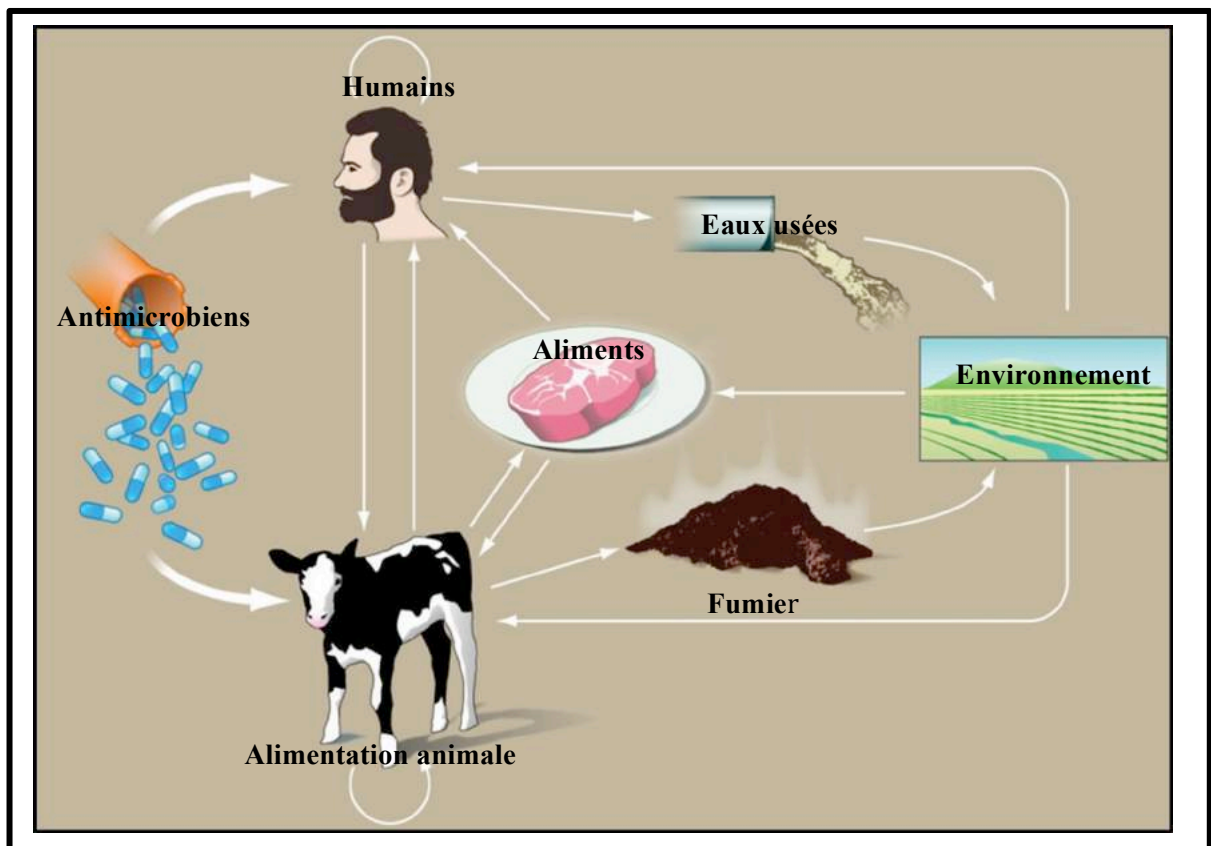


Figure 6: Représentation schématique des voies de transmission de la RA entre les animaux d'élevage, l'environnement et les humains (Woolhouse, 2013).

Une étude in vitro en 1999 portant sur l'action de 15 agents antimicrobiens vis-à-vis de 195 souches d'*E. coli* provenant de veaux laitiers atteints de diarrhée néonatale, a montré que 137 souches produisaient un ou plusieurs facteurs potentiels de virulence (F5, F41, F17, factor cytotoxique nécrosant, verotoxine et le gène eae). Plus 65% des souches étaient résistantes à la streptomycine, à la tylosine et à la tétracycline ; 23 à 50% à l'ampicilline, à la néomycine, à la kanamycine, à la spectinomycine, au chloramphénicol, à la sulfadiméthoxine et au triméthoprim. Les souches d'*E. coli* étaient très sensibles (89-95%) à l'apramycine et à la gentamicine et très sensibles (99-100%) à la polymyxine B, au florfenicol et à au nitrofurazone. La plupart des souches présentaient une résistance multiple: 76,9% des isolats étaient résistants à au moins deux antibiotiques, 67,7% étaient résistants à au moins quatre antibiotiques et 50,3% étaient résistants à au moins six antibiotiques (**Orden et al., 2000**).

Chapitre III :
Traitement
Alternatif

Depuis les années quatre-vingt-dix, du fait de l'apparition de la RA et le manque à gagner pour l'industrie pharmaceutique, on note un tarissement de la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques. Les antibiotiques les plus faciles à mettre au point ont déjà été commercialisés et les rares nouvelles molécules ont tendance à être réservées aux cas les plus sévères, diminuant d'autant la taille du marché pour les industriels (**Centre d'analyse stratégique, 2012**). En l'absence de nouveaux antibiotiques permettant d'agir sur des bactéries résistantes aux antibiotiques déjà utilisés, le risque d'impasse thérapeutique pour certaines infections bactériennes est non négligeable. Il s'agit d'une menace grave pour la santé des animaux qui ne peuvent pas être traités, mais également pour la santé publique, en raison d'une baisse de la production de denrées alimentaires d'origine animale d'une part et du risque de transmission de bactéries antibio-résistantes à l'homme d'autre part (**Chardon et Brugere, 2014**).

1- Quelle est donc la solution ?

La médecine traditionnelle, complémentaire et alternative (MT/MC) constitue un pan important et souvent sous-estimé des soins de santé. Elle existe dans quasiment tous les pays du monde, et la demande de services dans ce domaine est en progression. La MT/MC, dont la qualité, la sécurité et l'efficacité sont avérées, participe à la réalisation de l'objectif d'un accès aux soins universels. Aujourd'hui, de nombreux pays reconnaissent la nécessité d'adopter une approche cohésive et intégrative des soins de santé, qui permette aux pouvoirs publics, aux professionnels et, surtout, aux personnes qui recourent aux services de santé, d'avoir accès à une MT/MC qui soit sûre, respectueuse, efficiente par rapport aux coûts et efficace (**OMS, 2013**).

1-1 Les huiles essentielles

Les médecines alternatives ont été pratiquées pendant des siècles et restent comme partie intégrante de beaucoup de civilisations à travers le globe. Un aspect important de la médecine alternative comprend les médicaments à base de plantes / médicaments dans lesquels les plantes endémiques (disponibles localement) ou leurs parties sont utilisées.

Les plantes médicinales sont dérivées des plantes ou des extraits de plantes contenant des substances thérapeutiques (**Drew et Myers, 1997**).

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans l'attraction des insectes (ou répulsif pour d'autres) favorisant ainsi la dispersion des pollens et des graines. En outre, les huiles essentielles peuvent également agir comme des antibactériens, des antiviraux, des antifongiques, des insecticides, des herbicides ou ont des effets dissuasifs sur les

herbivores en réduisant leur appétit pour de telles plantes. Les huiles essentielles jouent également un rôle important dans la communication allélopathique entre les plantes (**Ibrahim et al., 2001 ; Bakkali et al., 2008**).

Depuis toujours les plantes et leurs huiles essentielles sont connues pour leurs degrés variables d'activité antimicrobienne. De nombreuses huiles essentielles sont relativement faciles à obtenir, ont une faible toxicité cellulaire chez les mammifères et sont respectueuses de l'environnement car se dégradant rapidement dans l'eau et le sol, ce qui les rend relativement faciles à utiliser comme alternative aux antibiotiques (**Kavanaugh et Ribbeck, 2012**).

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils (**Kalemba et Kunicka, 2003**). Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire (**Sanon et al., 2002**). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits, mais également à partir de gommages qui s'écoulent du tronc des arbres (**Burt, 2004**). Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, elles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (**AFNOR, 2000 ; Bruneton, 1999**).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras. Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (**Anton et Lobstein, 2005**).

Les huiles essentielles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**AFNOR, 1986**).

1-1-1 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

C'est Delacroix qui en 1881, fut le premier à mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles (**Boyle, 1995**). Depuis lors, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes à des degrés divers (**Burt, 2004**). Il s'agit du domaine le mieux étudié. En effet, cette propriété des huiles essentielles fait partie des plus connues et des plus utilisées. En fonction de leur composition chimique, et de la nature de leurs composés volatils majeurs, Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques ou inactives (**Sipailiene et al., 2006 ; Oussou, 2009**). En effet, cette activité est très variable et dépend de

l'huile essentielle et de la bactérie en cause (Avlessi, 2012). L'activité antimicrobienne des huiles essentielles dérivées des plantes est mise à profit dans de nombreuses applications, en particulier la conservation des aliments, l'aromathérapie et la médecine complémentaire. Bien que les huiles essentielles aient été largement testées contre un large éventail de bactéries, de levures et de champignons, l'interaction entre les huiles essentielles et les microbes à l'origine de cette activité antimicrobienne n'est pas bien comprise (Reichling et al., 2009).

Les médicaments à base de plantes sont souvent considérés comme des alternatives importantes contre les souches multi-antibiorésistantes, et il est démontré que les bactéries ne peuvent pas développer de résistance aux médicaments à base de plantes (Nostro, 2006 ; Reiner, 2008 ; Warnke et al., 2009 ; Singh, 2013). Mais, d'autre part il a été rapporté que certaines bactéries ont une résistance naturelle à certains des médicaments à base de plantes (Singh et al., 2011). Cependant, les mécanismes de cette résistance ne sont pas clairement compris.

Il a été montré que les bactéries Gram négatives telle que *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis* ou encore *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus* sont assez sensibles (en essais in vitro) aux huiles essentielles de *Cinnamomum verum*, *Cinnamomum cassia*, *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha viridis*, et *Thymus* spp (Benazzouz, 2011).

Tableau 2 : Sensibilité et résistance aux huiles essentielles de certaines bactéries d'importance clinique (Vadhana et al., 2015).

Médicament à base de plantes / Huiles essentielles testées	Actif contre	Inactif contre	Références
Huile de citronnelle (<i>Cymbopogon</i> spp) (Constituants importants : geraniol citral, Myrcène, néral, limonène, pipéritone, Citronellal)	<i>S. aureus, B. cereus, B. subtilis, E. coli, .pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Naik et al. (2010)
	Majorité de <i>Bacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., <i>Edwardsiella</i> , <i>Budvicia aquatic</i> , <i>Leminorella ghirmontii</i>	Majorité de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Salmonella enterica</i> , <i>Citrobacter</i> spp., <i>Providencia</i> spp, <i>Kluyvera cryocrescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Escherichia</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Erwinia ananas</i> , <i>Pragia fontium</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	Singh et al. (2011a)
Huile essentielle de sauge (<i>Savia officinalis</i> L.) (Composants importants: pinène, camphène, Myrcène, limonène, 1,8-cineol, thuyone, camphre, linalol, acétate de bornyle et Borneol)	<i>Dermatophilus congoleasis, Pasteurella canis, Plesiomonas shigelloides and Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, E.coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	Baratta et al. (1998) Mitiulafi et al. (2005) Bosni et al. (2006) Singh (2013)
Espèces de <i>Pelargonium</i> Huile de géranium (Composition importante: α -pinène, myrcène, Limonène, menthone, linalol, geranyl Acétate, citronellol, geraniol et geranyl, Butyrate))	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>equi</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	Singh et al. (2015)
Huile essentielle de carvi (<i>Carum carvi</i> L.) (Important composition: Acetaldehyde, Cumuninic aldehyde, Furfurol, Carvone, Limonene)	<i>Bacillus cereus, Bordetella bronchiseptica, Brucella abortus, Dermatophilus congolensis, Erwinia ananas, Escherichia coli</i> (tdeux), <i>Moraxella canis</i> (deux), <i>Moraxella osloensis, Pasteurella multocida, Proteus penneri, Pseudomonas aeruginosa, Raoultella terrigena and Streptococcus pyogenes.</i>	<i>Aeromonas</i>	Singh et al. (2015)
Huile essentielle de muscade <i>Myristica fragrans</i> (Important composition: Sabinene, Camphene, d-Pinene, Dipentene, d-Linalool, d-Borneol, i-Terpineol, Geraniol, Myristcin)	<i>Shigella dysenteriae, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Pseudomonasaeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhi, Bacillus subtilis, Proteus vulgaris</i>	Piaru et al. (2012)
Huile essentielle de <i>Selinum wallichianum</i> (Important composition: α -bisabolol, farnesol, germacrene D, citronellyl propanoate, α -bisabolol oxide B, sabinene, β -farnesene, limonene)	Souche de Reference de <i>E. coli</i> , (E3376 and E3382), <i>Edwarsiella tarda</i>	<i>Bacillus coagulans, E. coli, Aeromonas hydrophila, Lactobacillus acidophilus, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus</i>	Singh et al. (2012)

Les huiles essentielles utilisées en médecine vétérinaire peuvent être classées comme suit: huiles attractives et répulsives pour les animaux; Insecticides, antiparasitaires; huiles utilisées dans les aliments pour animaux et les huiles utilisées dans le traitement des maladies chez les animaux. Cependant, Les études sur les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles contre les microorganismes ayant une importance vétérinaire *in vitro* et *in vivo* sont encore limitées (**Rusenova et Parvanov, 2009**).

1-1-2 Activité Antivirale

Les virus sont en général très sensibles aux molécules aromatiques. Les réponses classiques aux infections virales étant très limitées, les huiles essentielles constituent une véritable alternative pour traiter les troubles d'origine virale allant des plus banals aux plus redoutables. Des molécules appartenant à de nombreuses familles chimiques ont révélé leurs activités antivirales comme les monoterpénols et les monoterpénals (aldéhydes terpéniques) par exemple (**Pierron, 2014**). Le couple synergique cinéole-monoterpénol sera utile pour traiter les pathologies virales touchant la sphère respiratoire (les plus répandues dans les régions tempérées). Ce couple est présent dans de nombreuses huiles essentielles issues d'arbre de la famille des Myrtacées connues, depuis toujours, pour leur valeur dans le traitement des affections pulmonaires (**Franchomme et al., 2001**). Un autre couple, celui présent dans l'huile essentielle d'Hysope officinale (*Hyssopus officinalis* var. *decumbens*), linaloxyde-linalol est également intéressant dans le cadre des pathologies virales affectant essentiellement les voies respiratoires basses (**Pierron, 2014**).

Un nombre considérable d'essais cliniques et d'études *in vitro* continuent de mettre en exergue le potentiel des phyto-produits comme agents antiviraux. Beaucoup d'huiles essentielles ont été étudiées en rapport à leur activité antivirale. La plupart d'entre elles ont été testées contre les virus enveloppés à ADN et à ARN, tels que les herpes virus simplex type 1 et 2 (virus à ADN), le virus de la Dengue (virus à ARN), le virus junin (virus à ARN) et l'influenza virus (virus à ARN), tandis que, seulement quelques huiles essentielles à l'exemple de celles de l'origan (*Origanum vulgare*) et du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), les quelles ont été testées contre les virus à ADN et à ARN non enveloppés, tels que l'adenovirus type 3 (virus à ADN), le poliovirus (virus à ARN) et le coxsackievirus B1 (virus à ARN) (**Reichling et al., 2009**).

Etant lipophiles, les HE peuvent pénétrer dans l'enveloppe des virus et sont donc plus actives sur les virus enveloppés comme l'herpès virus simplex. Une étude effectuée sur l'activité d'HE de *Melaleuca ericifolia*, *leucadendron*, *armillaris* et *stiphelioides* sur l'action de l'herpes virus simplex type 1 sur des cellules de singe vert africain a donné des résultats remarquables (**Deans et Ritchie, 1987**). D'après **Astani et al. (2011)**, l'HE d'anis étoilé

montre une action antivirale potentielle contre l'herpès virus simplex de type 1 (HSV-1), de même que l'eugénol, le trans-anéthol, le β -caryophyllène et d'autres molécules retrouvées dans la composition des HE.

Une activité antivirale élevée de certaines HE envers les virus à ADN ou ARN enveloppés a été montrée. Cette activité a été également clairement mise en évidence vis-à-vis des isolats cliniques de virus résistants à l'acyclovir (**Schnitzler et al., 2007**).

Selon **Kubica et al. (2014)**, l'HE de basilic (*Ocimum basilicum*) ainsi que différentes molécules retrouvées dans les HE (camphre, thymol et 1,8-cinéole) pourraient avoir une activité antivirale à l'encontre du virus de la diarrhée bovine.

1-1-3 Activité antiparasitaire

Les huiles essentielles et les composants actifs des plantes peuvent être utilisés comme traitement alternatif ou complémentaire aux thérapies antiparasitaires actuelles. A l'exemple des affections causées par les parasites protozoaires qui se posent actuellement comme un problème majeur en santé publique en raison de leur prévalence élevée, de leur distribution et de leurs effets sur la population. De nouveaux médicaments sont nécessaires pour traiter et combattre les infections telles que le paludisme, la maladie du sommeil, la maladie de Chagas, la leishmaniose et les infections intestinales, qui touchent des millions de personnes chaque année (**Pérez et al., 2012**).

Le médicament le plus couramment utilisé actuellement contre les protozoaires est le métronidazole. Cependant, ce composé a des effets secondaires désagréables comme un goût métallique, maux de tête, sécheresse de la bouche, urticaire, prurit et urine de couleur sombre. De plus, des effets cancérogènes et tératogènes ont été documentés (**Upcroft et al., 1999; Upcroft et Upcroft, 2001**). Ces effets toxiques et mutagènes potentiels sont les principales raisons pour lesquelles il est essentiel de développer d'autres agents antiprotozoaires présentant une activité élevée, une faible toxicité et une grande efficacité (**Monzote et al., 2012; Pérez et al., 2012**).

Les huiles essentielles de thym à linalol, la sarriette des montagnes sont d'excellents antiparasitaires (**Mayer, 2012**).

L'huile essentielle de Chénopode (*Chénopodium ambrosioides var. anthelminthicum*) contient de l'ascaridole qui est considéré comme un bon antihelminthique (**Pierron, 2014**). L'huile essentielle de noix de muscade présenterait une forte activité anti- *T. gondii* avec de faibles effets cytotoxiques (**Pillai et al., 2012**).

Les propriétés acaricides démontrées de l'eugénol, l'une des composantes majeures de l'huile essentielle de clou de girofle se révèlent être une piste sérieuse pour le développement de nouveaux acaricides topiques pour le traitement de la gale (**Oustric, 2014**).

Une autre grande propriété des HEs est leur pouvoir antiparasitaire, très intéressant pour les animaux, souvent hôtes de nombreux parasites. Cette activité s'exerce sur les parasites, en détruisant leur système respiratoire ou en entraînant leur paralysie (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

1-1-4 Activité anti-oxydante

La présence d'anti-oxydants dans les aliments permet d'éviter le rancissement dû à l'oxydation causée par l'oxygène, la lumière, la chaleur ou le contact de certains métaux. C'est souvent le cas des aliments riches en lipides comme les huiles. Ils peuvent également empêcher la formation de composés secondaires potentiellement toxiques (**Moure et al., 2001 ; Ivanova et al., 2005**). C'est pourquoi les industriels ajoutent des molécules dans les aliments pour augmenter leur durée de vie. Ces antioxydants peuvent également s'avérer nécessaires au sein de certains produits pharmaceutiques, cosmétiques ou des plastiques afin d'éviter leur dégradation. Cependant, il a été montré que ces anti-oxydants de synthèse comme le 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), le di-tertbutyl-4-hydroxyméthylphénol (IONOX-100), le gallate de propyle (PG), le gallate d'octyle (OG), l'acide nordihydroguaiariétique (NDGA) et le 4-hexylresorcinol (4HR), pouvaient être dangereux (**Guo et al., 2006**). En effet, malgré la puissance de leurs activités anti-oxydantes, ces anti-oxydants synthétiques peuvent être toxiques, mutagènes et présenter un danger sur la santé (**Williams, 1994**).

Les radicaux libres sont produits dans le métabolisme cellulaire normal et / ou pathologique, car, l'oxydation est essentielle à de nombreux organismes vivants pour la production d'énergie.

Cependant, la production non contrôlée de radicaux libres dérivé de l'oxygène est impliquée dans le déclenchement de nombreuses maladies telles que le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, la cirrhose et l'artériosclérose ainsi que dans les processus dégénératifs associés au vieillissement (**Mau et al., 2001**).

Pour ces différentes raisons, la recherche d'antioxydants naturels à des fins diététiques, cosmétiques et pharmaceutiques est devenue un défi majeur de la recherche industrielle et scientifique au cours des dernières décennies (**Ali et al., 2008**). De nombreux auteurs ont rapporté des propriétés anti-oxydantes et anti-radicalaires des huiles essentielles (**Sacchetti et al., 2005**).

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles est une propriété biologique intéressante pouvant être mise à profit comme palliatif à l'effet délétère de ces antioxydants de synthèse (**Maestri et al., 2006**). En outre, les huiles essentielles de par leur effet « scavenger » sur les radicaux libres, peuvent jouer un rôle important dans la prévention de

certaines maladies telles que le dysfonctionnement du cerveau, le cancer, les maladies cardiaques et l'immunodéficience (Kamatou et Viljoen, 2010).

1-1-5 Présentation des plantes étudiées

▪ *Mentha spicata*

Le genre *Mentha*, appartient à la famille des Lamiaceae, sous-famille Nepetoideae (Golparvar et al., 2015). Ce genre comprend 25-30 espèces qui poussent sous le climat tropical à tempéré d'Amérique, d'Europe, de Chine, de Brésil, d'Inde, d'Australie et d'Afrique du Sud. *M. arvensis* L. (menthe de maïs), *M. x piperita* L. (menthe poivrée), *M. citrata* Ehrh. (Menthe de bergamote), *M. longifolia* L. (menthe sauvage) et *M. spicata* L. (menthe verte) sont les principales espèces cultivées dans les régions tempérées, méditerranéennes et subtropicales (Snouci et al., 2015). *M. spicata* L., connue localement sous le nom de «Naanaa», est cultivée dans toute l'Algérie soit pour des fins culinaires ou pour ses propriétés médicinales (Brahmi et al., 2016). Les feuilles sont populairement utilisées comme agent aromatisant au thé et la plante entière est utilisée comme carminative. Les plantes fraîches et séchées et leurs huiles essentielles sont largement utilisées dans les industries alimentaire, cosmétique, confiserie et pharmaceutiques (Snouci et al., 2015). En outre, il a été largement appliqué au traitement de diverses maladies telles que les nausées, les vomissements et les troubles gastro-intestinaux (Shahbazi, 2015).

▪ *Cinnamomum aromaticum*

La cannelle appartient au genre *Cinnamomum*, famille des Lauraceae. Elle contient plus de 300 arbres et arbustes aromatiques à feuilles persistantes. Quatre espèces ont une grande importance économique pour leurs utilisations culinaires multiples comme des épices communes, y compris la cannelle *Zeylanicum blume* (synonyme de cannelle verum J. Presl, connue comme la cannelle du Sri Lanka), *Cinnamon loureiroi* Nees (connue comme la cannelle vietnamienne), *Cinnamon burmanni* (Nees & T. Nees) *blume* (cannelle indonésienne) et *Cannelle aromaticum* Nees (synonyme de *Cinnamon cassia* (L.) J. Presl, connue sous le nom de cannelle chinoise) (Nabavi et al., 2015). La cannelle a été longtemps utilisée dans les pays de l'Est comme un conservateur et à usage médicinal (Yang et al., 2012). Elle a une réputation comme un remède efficace pour les rhumes (Sharaf et al., 2011). En médecine ayurvédique, elle a été utilisée comme agent antiémétique, anti-diarrhéique, anti-flatulente et stimulant (Nabavi et al., 2015).

1-2 Le miel

1-2-1 Définition

Le miel est la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes, ou des sécrétions provenant de parties vivantes des plantes, ou des excréments laissés sur celles-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment, en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche (Norme européenne recommandée pour le miel (**Décret n°2003-587 du 30 juin 2003**)), l'ajout de sucre en tant qu'aliment pour les abeilles exclut ipso facto, le produit ainsi obtenu de cette définition.

1-2-2 Propriétés physiologiques du miel

Les vertus médicinales du miel sont connues depuis des millénaires de façon empirique. On a utilisé et on continue à utiliser le miel pour soigner les maux les plus divers. Le miel médicament doit ses vertus à sa composition : l'association du glucose et du lévulose, les acides organiques, les matières minérales, les centaines de substances identifiées ou non qui proviennent des plantes ou de l'organisme de l'abeille constituent une véritable pharmacopée. Malheureusement pour le miel, l'immense bibliographie que l'on possède sur sa valeur thérapeutique n'est pas toujours d'une grande rigueur scientifique, non pas parce que les recherches ont été mal conduites, mais parce que le miel ne doit pas être considéré comme un produit défini et stable (**Benoit, 2004**). Cependant, L'analyse de la littérature internationale met en exergue l'intérêt porté aux propriétés du miel (plus de 10000 articles référencés sur Pubmed par exemple), et ce de manière croissante ces dernières années (**Balas, 2015**).

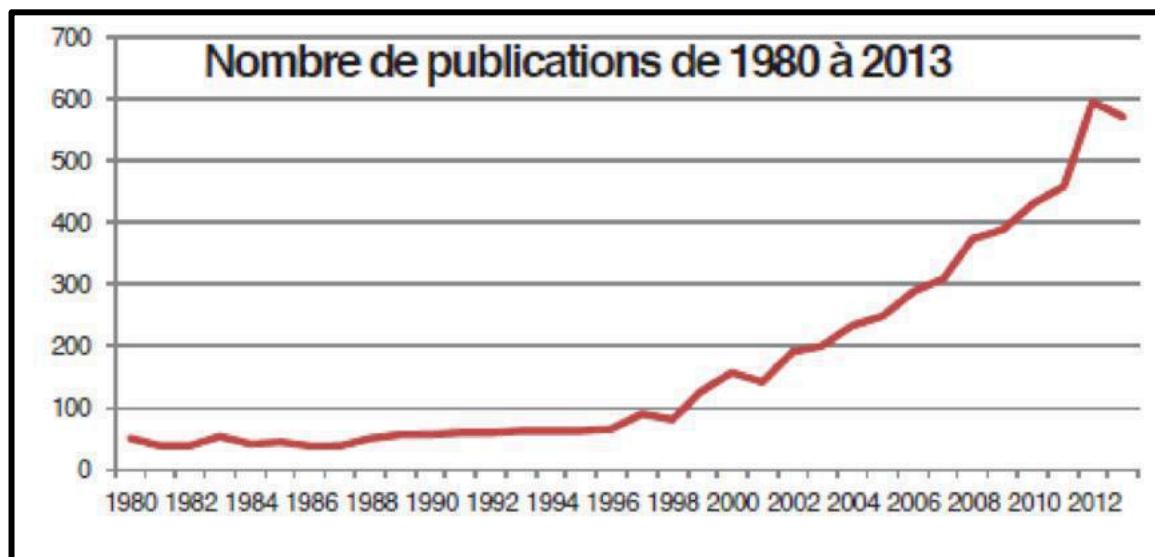


Figure 7 : Nombre d'articles sur le miel référencés sur Pubmed de 1980 à 2013 (Balas, 2015).

- Activité antibactérienne

On explique l'efficacité du miel dans divers usages médicaux principalement par son activité antibactérienne. En effet, Le miel a gagné une certaine reconnaissance dans le milieu médical pour son usage comme agent antibactérien dans le traitement des ulcères, escarres, brûlures et plaies infectées. Dans de nombreux cas, il est utilisé avec succès dans des infections ne répondant pas aux traitements antibiotiques et antiseptiques standards (Assie, 2004).

Le miel est doté d'un large spectre d'activité antibactérienne contre une large gamme de bactéries incluant les aérobies, les anaérobies, les Gram⁺ et les Gram⁻ (Allen et al. 2000; Kingsley 2001; Cooper et al. 2002 ; Al-Waili et al. 2005).

Les miels ne sont pas égaux en efficacité. Cette dernière dépend de l'origine botanique et géographique. Apparemment, les miels de certaines plantes et/ou de certaines régions ont une meilleure activité antibactérienne. Cependant, il n'y a pas assez de preuves pour l'étayer de façon affirmative, car les données proviennent d'un nombre réduit d'échantillons (Olaitan et al., 2007). Ainsi, il a été suggéré que les miels à utiliser comme agents antimicrobiens, devraient être choisis parmi les miels qui ont été préalablement testés en laboratoire pour leur activité antimicrobienne (Aurongzeb et Azim, 2011).

A travers le monde, l'effet antibactérien du miel a été testé sur un nombre élevé de bactéries qu'elles soient résistantes ou non résistantes aux antibiotiques avec des résultats probants (tableau 3) (Al-Waili et al., 2011).

Tableau 3: Origines géographiques des miels et différents pathogènes testés (Al-Waili et al., 2011).

Origine géographique du miel	Type de bactérie
Emirats Arabie unis	<i>Escherichia coli</i> , <i>Entérobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>shigella dysenteriae</i> , <i>Klebsiella species</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Proteus species</i> , <i>Staphylococcus hemolyticus</i> groupe B
Iran	<i>Mycobactérie</i>
Jérusalem	<i>Streptococcie orale</i>
Arabie Saudia	<i>Helicobacter pylori</i>
Oman	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>
Turquie	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27736, <i>Morganella morganii</i> , <i>Micrococcus luteus</i> NRRL B-4375, <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218
Inde	<i>Pseudomonas</i> et 8 espèces de <i>Klebsiella</i>
Malaysia	micro-organismes entériques et des plaies
New Zélande	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positifs, <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à méthicilline, <i>Entérococci vancomycine sensitifs</i> , <i>Entérococci vancomycine résistants</i> , <i>Campylobacter</i> et les souches de mammité isolés de vache laitière.
Brésil	<i>Staphylococcus aureus</i>
Australie	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , les infections associés au cathéter
Etats unis	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>Escherichia coli</i> O157 :H7, <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Listeria monocytogènes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>bacillus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus cereus</i> F4552, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> ,
Canada	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, <i>E. coli</i> ATCC14948, <i>Staphylococcus aureus</i> sensible à méthicilline, <i>Staphylococcus aureus</i> résistante à méthicilline, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Argentine	<i>E. coli</i> ATCC25922
Afrique de sud	<i>Streptococcie orale</i>
Egypte	<i>Staphylococcus aureus</i> et les <i>Bactéroïdes melaninogenicus</i>
Algérie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC
Nigéria	Divers entéropathogènes, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Clostridium oedematiens</i> , <i>E. coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Slmonella enterocolitis</i> et <i>Shigella dysenteriae</i> .
Royaume uni	<i>Bukholderia cepacia</i>
Holland	<i>Bacillus subtilis</i> , MRSE, MRSA, <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> BLSE, <i>Klebsiella BLES</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistante à ciprofloxacine, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> .
Ireland	MRSA, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Portugal	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> .

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline, **MRES** : *Staphylococcus epidermidis* résistante à la méthicilline, **BLES** : β -lactamase à spectre étendu

Une étude Nigérienne portant sur les effets du miel sur les bactéries à l'origine de diarrhée, notamment *E. coli*, *C. jejuni*, *Salmonella enterocolitis*, et *S. dysenteriae* a montré que tous les échantillons de miels testés inhibaient la croissance de tous ces microorganismes. L'effet inhibiteur sur *E. coli* a été similaire à celui de l'amoxicilline et le chloramphénicol (Adebolu, 2005). Des miels des Emirats Arabes Unis à des concentrations entre 30-100% ont

inhibé complètement la croissance d'*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella species*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus species*, *S. aureus*, *Streptococcus hemolyticus* groupe B et *Candida albicans*. Les plus sensibles ayant été *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *H. Influenzae* (Al-Waili, 2004).

L'activité anti-mycobactérienne de miels Iraniens testés vis-à-vis de mycobactéries provenant de cultures positives et de crachats de patients tuberculeux a montré que la croissance des mycobactéries a été inhibée par incorporation de 10% de miel dans les milieux de culture (Asadi-Pooya et al., 2003).

Le miel a montré une activité antibactérienne contre certaines souches résistantes et posant problèmes dans les milieux médicaux tel que *S. aureus* résistant à la methicilline (Blaser et al., 2007) et les entérocoques résistants à la vancomycine (George et Cutting, 2007).

Farouk et al. (1988) ont montré que l'activité antibactérienne inhibitrice de 15 miels soudanais testés sur *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella aerogenes* ne montraient aucune action sélective contrairement à l'ampicilline, la cephradine, le chloramphenicol et l'oxytetracycline testés sur les mêmes bactéries.

La capacité antibactérienne du miel a été déterminée envers des isolats cliniques multi-résistants de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus coagulase négative*, *Streptococcus pyogenes* et *Klebsiella pneumonia*, ainsi que cinq bactéries de contrôle. Aucun des isolats n'a montré de résistance envers les miels testés, les miels sombres étant plus actifs que les clairs (Wasihun et Kasa, 2016).

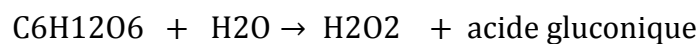
Il a été montré *in vitro* que le miel peut inverser la résistance aux antibiotiques, (Jenkins et Cooper, 2012). Il semblerait que le miel induit une régulation à la baisse des produits du gène *mecR1*, un transducteur associé à la résistance des *S. aureus* résistant à la méthicilline.

Cette activité potentielle du miel contre les bactéries résistantes aux antibiotiques a encore augmenté l'intérêt pour son utilisation, mais une connaissance incomplète du mécanisme d'action de l'activité antibactérienne est un obstacle majeur à son application clinique (Kwakman et Zaat, 2012).

Les effets antibactériens de miel ont été attribués à son osmolarité élevée (Bogdanov et al 2008 ; Alzahrani et al. 2012a) liée à sa forte concentration en sucres et sa faible teneur en eau. La forte interaction entre les molécules de sucre et d'eau laisse donc peu d'eau libre disponible pour le développement des microorganismes. Cela provoque une forte déshydratation des germes mettant en jeu leur survie (Molan. 1992 ; Olaitan et al. 2007).

Cependant, des sirops de sucre à la même activité de l'eau que le miel ont un effet *in-vitro* moindre dans l'inhibition de la croissance bactérienne (**Molan, 1992**). Le pH bas du miel peut être à lui seul inhibiteur d'un bon nombre de bactéries pathogènes. L'osmolarité et le pH acide peuvent expliquer en partie l'action du miel lors d'applications topiques. Mais lorsque le miel est consommé, il est dilué par les fluides corporels, d'où effet tampon et diminution de l'osmolarité élevée (**Molan, 1992**). C'est également vrai lors de l'incorporation en gélose et lors de micro-dilution

Il est reconnu que la dilution du miel augmente son activité antibactérienne. Cette activité est due à l'action du glucose oxydase sur le glucose du miel en présence d'eau, selon la réaction :



Le peroxyde d'hydrogène, ainsi produit serait la source majeure de l'activité antibactérienne du miel. Ce mécanisme serait inhibé par le sur-chauffage ou le stockage prolongé (**White et Subers, 1964**). Des études *in vitro* ont montré que la mort des cultures de cellules de mammifères ainsi que celle des levures et des bactéries est observée avec une quantité excédant 50 Mm de H₂O₂. Cette concentration est 50 fois supérieure à la concentration de H₂O₂ trouvé dans le miel. Donc l'action oxydante de l'H₂O₂ du miel envers les cellules bactériennes pourrait être modulée par d'autres molécules bioactives du miel, ce qui exclurait l'action isolée du H₂O₂ (**Bizerra et al., 2012**). D'autant plus qu'ils existent des miels dotées d'une importante activité antibactérienne indépendante du peroxyde d'hydrogène (**Allen et al., 1991**).

L'activité antibactérienne du miel peut être due à de multiples mécanismes fonctionnant soit individuellement soit de manière synergique. Une teneur élevée en sucre, une faible acidité, une faible teneur en eau, une production d'hydrogène, des composés phytochimiques, les défensines, les prostaglandines ou d'autres composants non identifiés favorisent l'activité du miel sur la croissance bactérienne (**Molan 1992; Mavric et al., 2008**). Tous ces facteurs ont des effets toxiques sur les bactéries qui peuvent affecter leur métabolisme et structure.

- Activité antivirale

En sus de l'activité antibactérienne du miel, un certain nombre d'études ont porté sur son activité antivirale. **Zeina et al. (1996)** ont montré *in vitro* que contrairement au thym, le miel était actif contre le virus de la rubéole.

Une étude comparative entre l'effet d'application topique du miel et d'acyclovir crème sur des lésions herpétiques labiales et génitales, a montré que, la durée moyenne des crises et de la douleur, l'apparition de la croûte et le temps moyen de guérison étaient meilleurs avec le miel qu'avec l'acyclovir. Contrairement à l'acyclovir, aucun effet secondaire n'a été constaté avec le miel (**Al-Waili, 2004**).

Une étude portant sur l'effet cytopathique du virus respiratoire syncytial a montré que l'adjonction de 2% de miel à la culture des cellules A549 sujettes à l'expérience entraîne une inhibition du développement viral et un nombre plus bas des antigènes viraux par rapport aux cellules non traitées (**Zareie, 2011**).

- **Activité antiparasitaire**

Le kyste hydatique ou hydatidose ou *Echinococcose uniloculaire*, zoonose cosmopolite, peut toucher n'importe quel site de l'organisme même si elle prédomine au niveau hépatique et pulmonaire (**Carmoi et al., 2008**). Le traitement chirurgical et le drainage percutané ont récemment été utilisés pour le traitement des kystes hydatiques. L'inactivation du parasite par des agents protoscolicides est une composante importante du traitement dans les deux méthodes. De nombreux agents ont été utilisés à ces fins (**Karaoğlanoğlu et al., 2011**), mais aucun des produits couramment utilisés n'est dénué d'effets secondaires (**Altindis et al., 2004**). Une étude menée *in vitro* et *in vivo* (administration intrapéritonéale chez des rats) par **Kilicoglu et al. (2006)** a montré que le miel à la concentration de 10% et plus éliminaient tous les protoscolex, sans aucun effet secondaire.

Bien que la cholangite sclérosante soit une complication majeure qui limite l'utilisation de nombreux agents protoscolicides en présence de fistulation des kystes hydatiques dans les voies biliaires, il a été montré que le miel peut être utilisé en toute sécurité dans cette situation (**Kilicoglu et al., 2008**).

L'activité anti-helminthique d'extrait aqueux d'édulcorants naturels, y compris le miel a été testée sur des vers de terre indiens (*Pheretima posthuma*), des ténias (*Raillietina spiralis*) et des ascaris (*Ascaridia galli*) par **Prasad et al. (2010)**, le miel a montré l'effet le plus significatif.

Pour **Zeina et al. (1997)** le miel posséderait une activité antileishmaniose, alors que pour **Nilforoushadeh et al. (2007)** le miel n'était pas efficace même en association avec la glucantine.

- Activité anti-oxydante

Le miel comme source d'anti-oxydants, lesquels réduisent significativement les risques d'affections cardiaques, de cancer, d'immunodépression, de cataractes, de processus inflammatoires diverses etc... a été démontré par plusieurs auteurs (NHB, 2003). De nombreuses études ont montré que sa consommation seul ou avec d'autres boissons anti-oxydantes augmente significativement la capacité anti-oxydante du sérum humain (**Schramm et al., 2003, Al-Waili, 2003**). De même, qu'il peut également prévenir les réactions oxydatives à l'origine du brunissement enzymatique des fruits et légumes (**Chen et al., 2000**) ainsi que l'oxydation des lipides de la viande (**Nagai et al., 2006**).

Une large gamme de constituants mineurs présents dans le miel sont connus pour être à l'origine de ses propriétés anti-oxydantes, ils incluent les acides phénoliques et les flavonoïdes, certaines enzymes telles que la glucose oxydase et la catalase, l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les acides organiques et les produits de la réaction de Maillard (**Khallil et al., 2010**).

Les espèces réactives de l'oxygène qu'elles soient radicalaires ou non radicalaires, interviennent dans la lutte antimicrobienne mais cet effet bénéfique peut être contre balancé par leur production non contrôlée (lorsque les mécanismes antioxydant de l'organisme sont dépassés) pouvant causer des dommages aux cellules d'où la nécessité d'une immuno-modulation. Il a été montré que le miel peut être un excellent immuno-modulateur (**Tonks et al., 2003 ; Majtan et al., 2013 et 2014 ; Aissat et al., 2015**).

Plusieurs études ont montré que l'activité anti-oxydante du miel varie largement en fonction de son origine botanique. Cette dernière a une influence plus marquée sur son activité anti-oxydante que celle due à sa manipulation, traitement et conservation (**Bertoncelj et al., 2007**).

1-3 Effets indésirables et secondaires

1-3-1 Huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: « ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme » (**Bay-Ould Sidi Said, 2014**).

Les huiles essentielles sont très réactives et rapidement absorbées puisqu'elles sont fortement concentrées en principes actifs et possèdent une majorité de constituants lipophiles. C'est surtout la composition chimique des huiles essentielles qui leur confère ces effets indésirables, les composés polyinsaturés étant plus toxiques que les autres (cétones, lactones, phénols...) (**Lienard, 2012**).

Des réactions dermo-caustiques et irritantes pour les muqueuses peuvent être observés lors de l'application des huiles essentielles riches en phénols, aldéhydes et certains esters (riches en thymol ou en carvacrol). Ces composés se trouvent dans la cannelle (écorce et feuille), la menthe, le clou de girofle, le niaouli, le thym à thymol, la marjolaine, le cymbopogon, la gaulthérie couchée (**Piochon, 2008 ; Bay-Ould Sidi Said, 2014 ; Lienard, 2012**).

Ainsi, un effet hépatotoxique a été constaté lors de l'utilisation des huiles essentielles riches en phénols à forte dose et pendant de longues périodes (**Lienard, 2012**).

Cependant, l'utilisation prolongée des huiles essentielle du pin des landes, de genièvre, de santal et la livèche (riche en monoterpènes et phtalides) ont un effet néphrotique (**Lienard, 2012**).

Tandis qu'une réaction de photosensibilité peut être rencontrée lors d'utilisation des furocoumarines présents dans le citron, la mandarine, l'orange, la bergamote, le pamplemousse, l'angélique (**Lienard, 2012**).

D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique et abortif tels que ceux contenues dans l'absinthe, l'armoise, le cèdre, l'hysope, la sauge officinale, le thuya, la menthe poivrée. Ces huiles sont riches en cétones fortement lipophiles, ils passeraient la barrière hémato-encéphalique, détruiraient des gaines de myéline et perturberaient par la suite l'activité neuronale par excitation puis dépression. Les HE à cétones ont également une activité utéro-tonique ; ce qui leur conférerait un effet abortif (**Lienard, 2012**).

1-3-2 Miel

Le miel est l'un des suppléments nutritionnels bien connu et qui est également utilisé pour le traitement de certains problèmes de santé ainsi que pour la préparation de médicaments naturels. Mais dans certains cas, la consommation excessive de miel peut donner lieu à des effets secondaires différents (**Abid, 2017**).

Boukraâ et Sulaiman (2009) ont signalé la présence des spores et des formes végétatives de *Bacillus sp.* ou de *Clostridium botulinum*, par contamination accidentelle, dans le miel et que les formes végétatives sont détruites mais pas les spores. Malgré qu'ils se retrouvent en petites quantités dans des miels (environ 5%), les spores ne peuvent pas germer dans le miel pur mais le peuvent après ingestion ou application locale où une dilution s'effectue par les liquides digestifs ou les exsudats de plaie. Il est donc préférable de n'utiliser chez le jeune que des miels certifiés exempts de spores. La pasteurisation peut être un moyen de traitement tout en sachant que les qualités thérapeutiques seront moindres. Dans ce cas, l'ionisation aux rayons gamma est préférable (**Tomczak, 2010**).

De même, vu la richesse du miel en fructose, on évitera de le donner au nourrisson, car le transporteur du fructose au niveau intestinal (GLUT5) est rapidement saturé ce qui provoque des malabsorptions. Ce fructose se retrouve alors au niveau du colon où il fermente et engendre ainsi des diarrhées (**Cuvillier, 2015**).

Si l'apport en fructose est trop important, le métabolisme de celui-ci va se diriger préférentiellement vers la lipogénèse, conduisant à une hypertriglycémie. C'est pour cette raison que les patients souffrant d'hypertriglycémie doivent éviter la consommation de miel (**Cuvillier, 2015**).

Bien que le miel soit apaisant et non irritant, certains symptômes peuvent se manifester lorsqu'il est utilisé comme un pansement : sensation de douleur, picotements, brûlures localisées, une intensité modérée pendant quelques minutes à 2h après changement de pansement où une analgésie est nécessaire voire un report ou un arrêt du traitement peuvent être observés (**Molan et Betts, 2004 ; Tomczak 2010; Gharbi, 2011**).

Partie
Expérimentale

Matériel
&
Méthodes

Notre étude expérimentale a été scindée en trois parties ;

- Première partie : Isolements et identification des agents entéropathogènes.
- Deuxième partie : Etude phyto-chimique et activité anti-oxydante.
- Troisième partie : Etude in-vitro de l'activité antibactérienne.

1- Objectifs

- Evaluer la prévalence des agents infectieux (Rotavirus ; coronavirus ; *E. coli* entérotogène (ETEC) ; *Cryptosporidium spp*),
- Déterminer l'âge critique pour l'apparition des diarrhées néonatales pendant le premier mois de la vie,
- Déterminer l'antibio-résistance des bactéries isolées,
- Déterminer la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata* et *Cinnamomum aromaticum*,
- Déterminer la composition physicochimique des différents miels étudiés,
- Déterminer l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des miels étudiés,
- Tester *in vitro* l'efficacité des produits naturels (plantes médicinales et produit de la ruche) vis-à-vis des bactéries multi-résistantes.

2- Zone d'étude

La région de Tiaret se trouve sur les hauts plateaux, au centre d'un relief montagneux d'où descendent les premières eaux de l'oued Mina, l'oued Rhiou, le Nahr Ouassel.

Tiaret s'étend sur les pentes du Djebel Guezoul à une altitude de 1086m, une latitude de 35°15' N et une longitude de 1°26' E. Les hauteurs au dessus du col de Guertoufa culminent à 1196m, à 1121m pour Sidi Khaled et à 1221m pour Djebel Guitna, au nord du champ de tir.

Cette situation géographique caractérise la région par un climat semi aride, qui se distingue par un hiver froid et humide et un été chaud et sec.

3- Période d'étude

Cette d'étude a été réalisée pendant une période de cinq années et s'est étalée depuis février 2011 à juillet 2016.

4- Laboratoires :

Cinq laboratoires ont été sollicités pour la réalisation de ce travail (trois laboratoires appartenant à deux universités algériennes et deux laboratoires étrangers).

- Laboratoire pédagogique de microbiologie de l'institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret
- Laboratoire de recherche de valorisation et d'amélioration de production des races locales, institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.
- Laboratoire des biotechnologies liées à la reproduction animale, Université Saâd Dahlab de Blida.
- Sarl Pyrenessences Analyse (France).
- Laboratoire CARI ASBL (Louvain-la-Neuve, Belgique).

Première Partie :
Isolements et
Identification
Des Agents
Entéropathogènes

Cette première partie a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie puis au laboratoire de recherche de valorisation et d'amélioration de production des races locales, institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret. Une partie de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire des biotechnologies liées à la reproduction animale, Université Saâd Dahlab de Blida.

1- Animaux

Les prélèvements ont été réalisés durant la période s'étalant de février 2011 à avril 2013. Les veaux ont été consultés au cours des visites réalisées pour une entérite néonatale dans quelques fermes de la wilaya de Tiaret.

2- Méthodes

2-1 Collecte des échantillons

Soixante-treize prélèvements ont été effectués sur des veaux diarrhéiques âgés de 1 à 30 jours, nés de mères non vaccinées et n'ayant bénéficiés d'aucune intervention thérapeutique. Les échantillons ont été récoltés dans des flacons en plastique stériles, après nettoyage de la région anale à l'aide d'un papier hygiénique et une éventuelle excitation de l'orifice anal avec l'index de la main droite gantée. Immédiatement après leurs récoltes, les prélèvements ont été étiquetés par un stylo indélébile et acheminés dans une glacière isotherme (à environ 4 °C) au laboratoire de microbiologie de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Tiaret.

Les tableaux 2.1 et 2.2 montrent la répartition des échantillons en fonction de l'âge et le sexe ainsi que la race du veau.

Tableau 1 : Répartition des échantillons en fonction d'âge et du sexe

Tranche d'âge	Nombre d'échantillon prélevé	Sexe	
		Mâle	Femelle
1 à 7 jours	14	10	4
8 à 14 jours	22	9	13
15 à 21 jours	24	9	15
22 à 30 jours	13	6	7
Total	73	34	39

Tableau 2: Répartition des échantillons en fonction de la race

Race	Nombre d'échantillon prélevés
Prim' Holstein	41
Croisé	25
Fleckvique	2
Montbeliard	2
Brune des Alpes	1
Pie rouge des près	1
Normande	1
Total	73

2-2 Détection des bactéries entéropathogènes

2-2-1 Culture bactériologique

Une culture bactériologique a été réalisée en vue de mettre en évidence des entérobactéries associées aux diarrhées néonatales du veau.

Immédiatement, après réception au niveau du laboratoire de microbiologie, les échantillons ont étéensemencés à l'aide d'un écouvillon sur le milieu Mac Conkey (Biochem, chemopharma, Quebec) et incubés pendant 18 à 24 h à 37 °C.

2-2-2 Identification des bactéries

2-2-2-1 Coloration de Gram

L'étude des caractères morphologiques a été réalisée par la coloration de Gram. Ils permettent l'observation du mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes, et le type de Gram. Cette technique a été réalisée selon la méthode décrite par **Delarras (2007)**.

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

2-2-2-2 Tests biochimiques

Les tests biochimiques pour chaque prélèvement ont été réalisés à l'aide d'une galerie Api 20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A partir de la suspension bactérienne préalablement préparée, les cupules de la galerie Api 20E ont été remplis selon les recommandations du fabricant, puis incubés à 37°C pendant 24h.

- Préparation de l'inoculum bactérien

Une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^8 UFC.mL⁻¹) a été préparée à partir de chaque ensemencement. Sur la base de cette suspension une identification à l'aide d'une galerie Api 20E, et un antibiogramme ont été réalisés.

- Lecture

La lecture s'effectue après notation (+ ou -) en fonction du virement de couleur selon les recommandations du fabricant. Cependant, l'identification du genre, voire l'espèce a été réalisé à l'aide d'un logiciel Api web (Api 20 E V 4.0).

2-2-2-3 Typage des *E. coli*

Deux à quatre colonies d'*E. coli* isolées et identifiées préalablement avec l'api E20, ont été repiquées sur la gélose Minca enrichie, [préparée par addition de 0.5 ml de solution d'enrichissement Polivitex (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) dans 100 ml de gélose Minca (BioVac, France)], et ont été incubées pendant une nuit à 37°C.

- Préparation de la suspension

Une suspension bactérienne dense (DO à 580 nm comprise entre 1.4 et 1.8) a été préparée à partir de chaque souche d'*E. coli* ensemencée sur la gélose Minca enrichie. Sur la base de cette suspension, un typage à l'aide des réactifs coagglutinés *E. coli* : F5, F17, F41 et CS31A (BioVac, France) a été réalisé.

Après agitation énergique au vortex et mise à température ambiante des réactifs [F41, F17 (FY), F5 (K99) et CS31A].

- Technique

On réalise des témoins à chaque utilisation :

- Un contrôle réactif : 30 µl d'eau physiologique + une goutte de réactif.
- Un contrôle souche : 30 µl d'eau physiologique + 30 µl de la suspension.
- On met en contact sur une lame, une goutte de chacun des 4 réactifs avec 30µl d'eau de la suspension dense de la souche à tester puis on agite pendant 2 minutes.

- Interprétation

L'évaluation qualitative de l'agglutination est de 1 à 3 +. Une réaction est considérée positive à partir de 2+.

Dans le cas des réactions croisées, la suspension a été diluée au demi puis au quart.

2-2-3 Antibiogramme

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la

distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture (**Guérin-Faublée et Carret, 1999**).

Application

Dans des boîtes de 16 cm de diamètre contenant 10^6 à 10^8 cfu de culture bactérienne effectuée à la surface de 20 ml de gélose Muller Hinton, des disques imprégnés d'antibiotique de doses connues sont appliqués à la surface à des distances déterminées (tableau 1). Les boîtes sont incubées à température ambiante pendant 30 min, ensuite dans une étuve à 37°C pendant 18 à 20 heures. La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée. Les valeurs sont comparées avec celles établies par la commission de standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire (**MoARD, 2008 et 2011**).

Tableau 3 : Liste des Antibiotiques à tester.

Nom d'antibiotique	Charge
Ampicilline (Bioanalyse)	10 mg
Amoxicilline + acide clavulanique (Bioanalyse)	20/10 mg
Tetracycline (Bioanalyse)	30 mg
Colistin (Bioanalyse)	10 mg
Gentamicin (Bioanalyse)	10 µg
Trimethoprim/sulfaméthoxazole (Liofilchem srl)	1.25/23.75 µg
Ofloxacin (Cypress diagnostics)	5 µg
Cifotaxime (Cypress diagnostics)	30 µg

2-3 Détection des agents entéropathogènes

2-3-1 Test ELISA

En vue de la recherche des rotavirus, des coronavirus, des *Escherichia coli* K99 (F5) et du *Cryptosporidium*, nous avons utilisé un kit ELISA fourni par le laboratoire Bio-X Diagnostics (BIO K 348 - Multiscreen Ag ELISA Calf digestive / sandwich, double puits, Bio-X Diagnostics Sprl, Jemelle, Belgique).

Les échantillons fécaux ont été décongelés auparavant de la réalisation de l'analyse par le kit ELISA. Soixante et un échantillons fécaux ont été soumis à l'analyse (les 12 autres échantillons ont été écartés pour les causes suivantes : un prélèvement pour cause d'éclatement lors de la décongélation et les autres prélèvements pour suspicion d'être traités).

2-3-1-1 Principe du test

Les lignes suivantes (A, C, E, G) de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par des anticorps spécifiques des agents pathogènes recherchés. Ces anticorps assurent la capture de ces agents à partir de l'échantillon dans lequel ils se trouvent (matières fécales). Les lignes B, D, F et H de ces microplaques ont été sensibilisés avec des anticorps non spécifiques des agents pathogènes. Ces témoins négatifs permettent de déterminer ce qui a été fixé de façon spécifique sur la microplaque. Leur utilisation permet de limiter dans des proportions importantes les résultats faussement positifs. Les matières fécales sont diluées dans le tampon de dilution et incubées durant une heure sur la microplaque. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute les conjugués dans les puits correspondants. Ces conjugués sont des anticorps monoclonaux couplés à la peroxydase. Ils sont spécifiques des agents pathogènes. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21°C +/- 3°C et d'un second lavage, on ajoute la solution de révélation (TMB mono-composant). Ce chromogène présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérigène. En cas de présence d'un ou de plusieurs des agents pathogènes recherchés dans l'échantillon, le ou les conjugués correspondants restent fixés sur leurs cupules respectives et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en agent pathogène de l'échantillon. Le signal enregistré sur la cupule négative sensibilisée avec l'anticorps témoin est retranché du signal de la cupule positive sensibilisée par l'anticorps spécifique. Un contrôle positif est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

2-3-1-2 Mode opératoire

- 1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation.
- 2- Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- Diluer au demi les matières fécales dans le tampon de dilution (préalablement diluer au 1/5 dans de l'eau distillée). Si la consistance de l'échantillon rend l'homogénéisation difficile, ajouter des billes de verre dans le récipient et déliter la selle en agitant vigoureusement l'ensemble (ne pas centrifuger).
- 4- Distribuer les échantillons dilués à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante : échantillon 1 dans les puits de la colonne 2, échantillon 2 dans les puits de la colonne 3, etc... Distribuer le contrôle positif à raison de 100 µl dans tous les puits de la colonne 1.
- 5- Couvrir et incubé la plaque à 21°C +/- 3°C durant une heure.

6- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage (préalablement diluer 1/20 dans de l'eau distillée). Cette étape a été effectuée en triplicata par un appareillage de lavage automatique (BioTek ELx50).

7- Distribuer les conjugués à raison de 100 µl par puits. Conjugué anti-rotavirus (rouge) lignes A et B, conjugué anti-coronavirus (jaune) lignes C et D, conjugué anti- *E. coli* F5 (bleu) lignes E et F, conjugué anti- Crypto (vert) lignes G et H. Couvrir et incuber la plaque 1 heure à 21°C +/- 3°C.

8- Laver la plaque comme décrite au point 6.

9- Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C sans couvrir et à l'obscurité.

10- Distribuer 50 µl de solution d'arrêt par puits. La couleur passe de bleu à jaune.

11- Lire et enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques « Bio Tek EL 800 » en utilisant un filtre de 450 nm.

2-3-1-3 Interprétation des résultats

Pour chaque échantillon, calculer la densité optique nette en déduisant de chaque résultat obtenu, la densité optique du puits négatif correspondant. Procéder à la même opération pour le contrôle positif.

Le test ne peut être validé que si le contrôle positif fournit des différences de densité optique en dix minutes supérieures aux valeurs indiquées sur le contrôle de qualité (voir tableau).

Tableau 4 : interprétation des résultats de la lecture ELISA.

Validation		Statue	
Rota>	1.248	Positif >	6.00%
Corona >	1.228	Positif >	6.00%
E. coli F5 >	1.207	Positif >	6.00%
Crypto >	1.171	Positif >	6.00%

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le contrôle positif et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous la forme d'un pourcentage.

$$Valeur = \frac{\Delta DO \text{ échantillon} * 100}{\Delta DO \text{ positif}}$$

En utilisant le premier tableau repris dans le contrôle de qualité, déterminer le statut des échantillons (positif ou négatif).

Deuxième partie :
Etude
Phyto-chimique
et Activité
Anti-oxydante

Cette deuxième partie a été réalisée au laboratoire de valorisation et d'amélioration des productions des races locales, institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret. Cependant l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles et l'analyse de la composition physico-chimique des miels ont été faites au niveau de la Sarl Pyrenessences Analyse (France) et du laboratoire CARI ASBL (Louvain-la-Neuve, Belgique).

1- Matière première

1-1 Matériel végétal

Les plantes utilisées dans ce travail se trouvent sur le marché tout au long de l'année, pour leur importance majeure et leur usage quotidien dans la cuisine Algérienne.

Les espèces : *Mentha spicata* (menthe verte) et *Cinnamomum aromaticum* (cannelle de chine) ont été utilisées dans cette étude.

▪ *Mentha spicata*

Mentha spicata (menthe verte) (figure 2.1) provient d'une exploitation agricole privée, située dans la région de Dahmouni dans la wilaya de Tiaret. La récolte de parties aériennes de notre espèce de menthe a été réalisée durant les mois de Juin, Juillet, Août et Septembre des années 2012, 2013 et 2014. Elles ont été ensuite séchées au laboratoire à l'air libre à l'abri de la lumière et de l'humidité, puis conservées jusqu'au moment de l'extraction.

L'identification botanique de cette plante a été faite par un spécialiste en botanique au niveau de département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université Ibn Khaldoun de Tiaret.



Figure 1: *Mentha spicata*

▪ *Cinnamomum aromaticum*

Les tuyaux de cannelle (figure 2.2) de l'espèce *Cinnamomum aromaticum* ont été achetés dans un magasin d'épices en 2012 à Nédroma (Tlemcen). Ces tuyaux vont servir à l'extraction de l'huile essentielle.



Figure 2 : Tuyaux de *C. aromaticum*

1-2 Miel :

Notre étude a été faite sur trois échantillons du miel provenant de trois différentes régions comme le montre le tableau suivant :

Tableau 5 : Variétés de miel étudiées.

Variétés	Date de récolte	Région de récolte	Origine florale présumée
Miel 1	Eté 2012	Nédroma (Tlemcen)	Toute fleur
Miel 2	Eté 2012	Sidi Ali (Mostaganem)	Toute fleur
Miel 3	2011	Chlef	Carotte sauvage

2- Extraction de l'huile essentielle

2-1 Mode opératoire

Les feuilles sèches de menthe ont été broyées et les tuyaux de cannelle ont été concassés à l'aide d'un mortier et d'un pilon afin d'éclater les cellules et permettre la libération des molécules volatiles. L'huile a été extraite par hydro-distillation, à l'aide du dispositif d'hydro distillation (figure 2.3). Le procédé consiste à introduire la matière première végétale (Menthe : 25g et cannelle : 75g) dans un ballon de un litre, imprégné de 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est ensuite porté à l'ébullition à pression atmosphérique et l'hydro-distillation se fait pendant 1 heure et demi pour la menthe et jusqu'à 2 heures et demi pour la cannelle; la chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur

d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs chargées d'huile essentielle; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.



Figure 3 : Dispositif d'hydro-distillation.

2-2 Traitement de l'extrait

L'eau est rejetée et la phase huileuse est récupérée par une micropipette. La phase huileuse récupérée est séchée par le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) (Eyob et al., 2008). L'huile essentielle extraite a été conservée à 4 °C dans des fioles scellées hermétiquement et couvertes de papier aluminium jusqu'à leurs utilisation ultérieure (réalisation des tests antioxydants et évaluation des effets antibactériens).

3- Analyse de la composition chimique des H.Es par CG/MS et CG/FID

Nos échantillons des huiles essentielles ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse grâce à un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS). Cette technique est très utilisée dans l'analyse qualitative et quantitative des H.Es. L'analyse de la composition chimique des H.Es a été faite au niveau de la Sarl Pyrenessences Analyse (France).

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse de type HEWLETT PACKARD (GC : 6890 - SM : 5973) ; équipé d'une colonne capillaire HP INNOWAX polaire (60 m x 0,25 mm) avec une épaisseur du film de 0,5 μm .

L'échantillon est dilué dans l'éthanol (10 % v/v). Le volume injecté a été de 1 µL. Le gaz vecteur est l'hélium (30 psi/FID ; 23 psi/MS). La température de la colonne est programmée à 60°C durant 6 minutes, puis 2°C/min jusqu'à 250°C et 10 minutes à 250°C. Les composés sont identifiés par une recherche combinée des temps de rétention (la bibliothèque propre de la Sarl) et des spectres de masse (bibliothèque NKS, 75 000 spectres). Les pourcentages sont calculés à partir des surfaces de pics donnés par le CG/FID, sans l'utilisation de facteur de correction.

4- Analyse des pollens

L'analyse du pollen a été réalisée au laboratoire CARI ASBL (Louvain-la-Neuve, Belgique) en utilisant la méthode d'Acétolyse proposée par **Erdtman (1969)**. Les grains de pollen étaient observés au microscope et par rapport aux lames de référence pour l'identification. Selon leurs classes de fréquence, les types de pollen ont été classés comme suit: le pollen dominant (D) : > 45%; pollen secondaire (S) : 40 à 10%; pollen d'une importance mineure : <10%.

5- Analyse physico-chimique

L'analyse physico-chimique a été réalisée au laboratoire CARI ASBL (Louvain-la-Neuve, Belgique). Brièvement, la teneur en eau du miel a été déterminée en utilisant un réfractomètre à 20 °C et le pH a été mesuré par un pH-mètre. L'acidité libre a été obtenue par titrage au NaOH. La teneur en HMF a été mesurée selon la méthode de Winkler et les résultats ont été exprimés en milligrammes par kilogramme (mg/kg). Le nombre d'invertase et de diastase ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre à 400 nm et selon la méthode de Phadebas, respectivement. La conductivité électrique a été déterminée à l'aide d'un conductimètre et le résultat a été exprimé en mS/cm.

6- Activités anti-oxydantes des huiles essentielles et des miels étudiés

L'étude de la capacité anti-oxydante des huiles essentielles et les trois variétés de miels a été basée sur les tests suivants.

6- 1 Dosage des polyphénols totaux

Le principe de ce dosage est adapté par **Singleton et Ross (1965)** avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

▪ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

▪ Mode opératoire

Le dosage des composés phénoliques totaux est effectué en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et est réalisé selon la méthode de **Chan et al. (2008)** avec quelques modifications apportées. Les échantillons du miel sont dilués au 1/10 dans l'eau distillée puis filtrés. On réalise une gamme étalon en milieu aqueux (6 points de concentrations de 0 à 0,1 mg.ml⁻¹) avec un standard (l'acide gallique). Pour réaliser le dosage, 200 µl d'échantillon de miel dilué sont ajoutés à 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 5 minutes, on ajoute 1500 µl de Na₂CO₃ (7,5%). Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités puis incubés pendant 30 min à l'ombre. La lecture de l'absorbance à 765 nm se fait grâce à un spectrophotomètre (Shimadzu UV-Vis 1202, Japan) (figure 4).

La teneur en phénols totaux est donnée en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'extrait; elle a été déduite de la courbe d'étalonnage provenant de la régression linéaire des valeurs obtenues pour la solution standard.

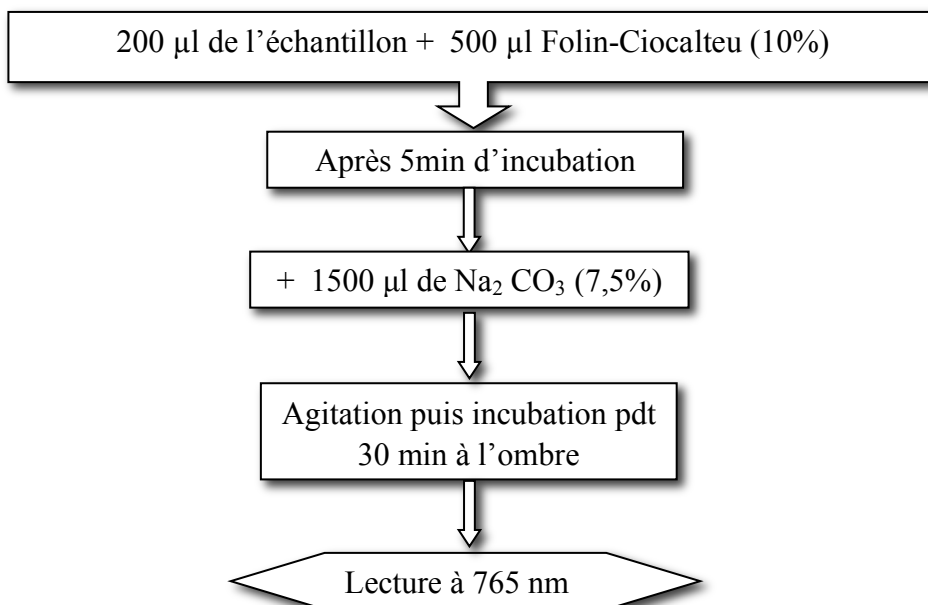


Figure 4: Protocole de dosage des polyphénols (Chan et al., 2008).

6-2 Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux des trois variétés de miel a été évaluée par la méthode décrite par Arvouet-Grand et al. (1994), légèrement modifiée.

Pour 1 ml d'extrait du miel (1/10 g/v) sont ajoutés 1 ml de chlorure d'aluminium (2%) préalablement dilué dans l'eau distillée. Après 15 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 420 nm. La teneur en flavonoïdes, exprimée en mg/100g de miel, est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine (figure 5).

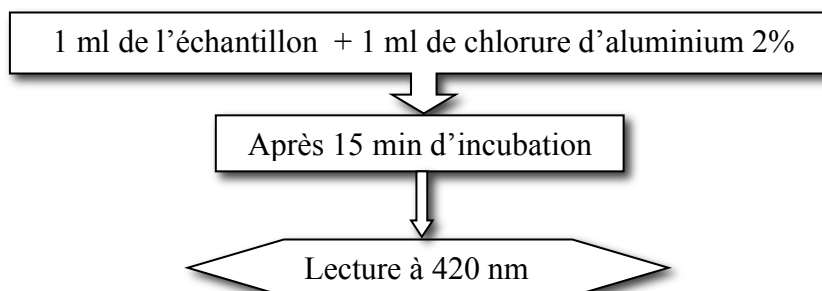


Figure 5 : Protocole de dosage des flavonoïdes (Arvouet-Grand et al., 1994).

6-3 Pouvoir réducteur

▪ Principe

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice est déterminée selon la méthode de **Yen et Duh (1993)**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fer (II) (**Ferreira et al., 2007; Ak et Gulçin, 2008**).

▪ Mode opératoire

Les extraits de huiles essentielle ont solubilisés dans l'éthanol (1/500 v/v) et les échantillons du miel ont été dilués dans l'eau distillées (1/10 p/v), puis 2,5 ml de chaque solution (éthanol ou eau distillée pour l'échantillon de contrôle) sont mélangés avec 2,5 ml d'une solution à 1 % de ferricyanure de potassium ($K_3 Fe(CN)_6$) et 2,5 ml d'un tampon phosphate (0,02 M, pH 6,6). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 2,5 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés. La solution est centrifugée à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant (1 ml) est mélangé à 1ml d'eau distillée puis 0,5 ml de chlorure de fer (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm (**Yen et Duh, 1993**).

La figure 6 reprend les principales étapes du protocole expérimental du pouvoir réducteur. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. La valeur EC_{50} est la concentration à laquelle l'absorbance est égale à 0,5 pour la capacité réductrice et est obtenue à partir des courbes à régression linéaire (**Chang et al., 2007**).

Les absorbances pou les trois variétés de miels testés et les EC_{50} pour les deux huiles testés ont été enregistrés.

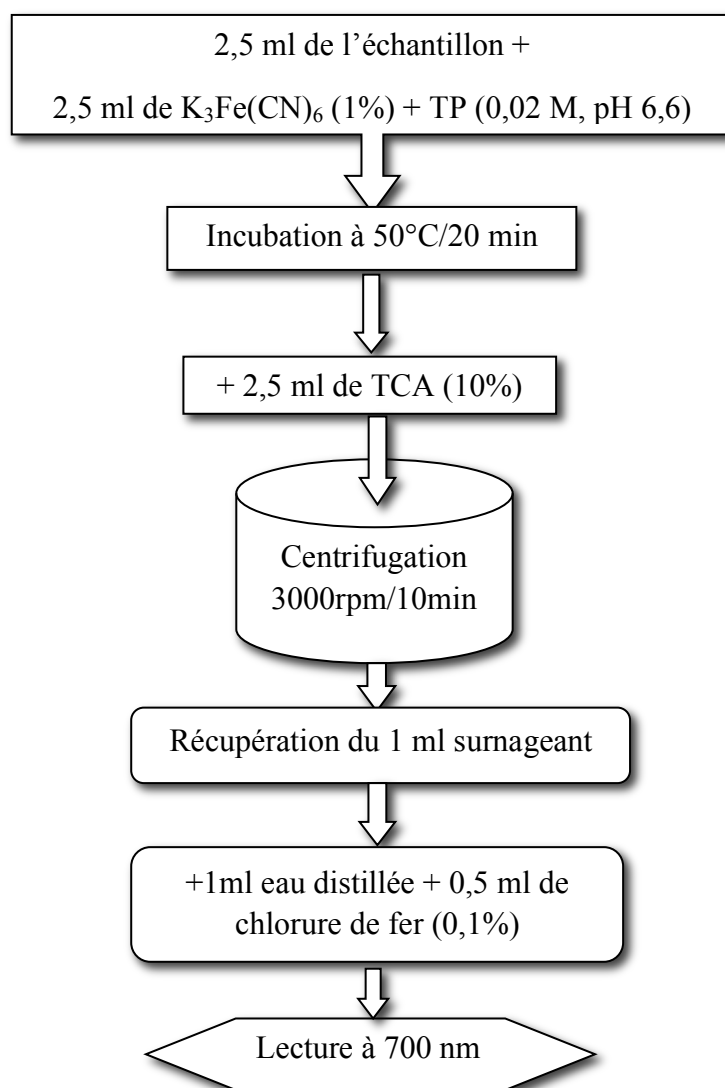


Figure 6 : Protocole de détermination du pouvoir réducteur (Yen et Duh, 1993).

6-4 Activité anti-radicalaire à l'égard du DPPH

L'activité anti-radicalaire a été estimée selon la méthode de Tien et al. (2005).

▪ Principe

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl ; α,α -diphényl- β -picrylhydrazyl) est pratiquement, le radical libre le plus stable (Niki, 2010). En solution dans l'éthanol, le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 517 nm (Niki, 2010). Lorsque son électron seul est apparié à un hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle.

Ce passage, de la première forme à la seconde, est accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction du DPPH.

$$AA (\%) = \frac{(A_T - A_E)}{A_T} \times 100$$

AA: activité anti-radicalaire

A_T : absorbance du témoin.

A_E : absorbance de l'échantillon

▪ Mode opératoire

A 0,4 ml de la solution du DPPH à 0,5 mM (préparé dans du méthanol pur), on ajoute 2 ml de l'échantillon (les huiles essentielles à étudier préalablement solubilisées dans l'éthanol et les miels à étudier préalablement dilués dans l'eau distillé). Après 30 min d'incubation à l'obscurité, la lecture se fait à 517 nm (figure 7). L'acide gallique, la quercétine et l'acide ascorbique sont utilisés comme standard. La valeur IC_{50} est définie comme étant la quantité en échantillon capable de réduire 50% de la concentration initiale du DPPH (Niki, 2010), les IC_{50} sont calculées à partir des courbes à régression linéaire (Chang et al., 2007).

Les pourcentages d'inhibition pour les trois variétés de miel et la IC_{50} pour les deux huiles essentielles étudiés ont été notés.

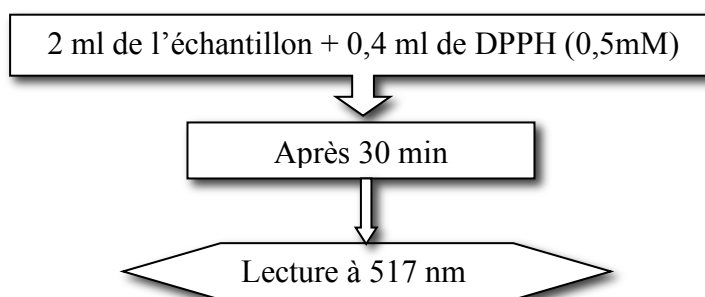


Figure 7: Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire au DPPH (Tien et al., 2005).

6-5 Activité scavenger à l'égard du radical ABTS

▪ Mode opératoire

L'activité scavenger sur le radical $ABTS^{0+}$ a été mesurée selon la méthode de Re et al. (1999). L'ABTS est solubilisé dans l'eau distillée à une concentration de 7 mM. Le radical cation ($ABTS^{0+}$) est produit en faisant réagir la solution d'ABTS avec du persulfate de potassium à une concentration finale de 2,45 mM. Le mélange a été laissé au repos, à l'obscurité et à température ambiante pendant 12-16h avant l'utilisation. La

solution $ABTS^{0+}$ a été diluée avec de l'eau distillée à une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm. Après addition de 1 ml de la solution $ABTS^{0+}$ à 10 μ l de chaque échantillon du miel dilué (1/10 g/v), la lecture a été prise 6 min exactement après le mélange initial comme le montre la figure 8. Le pourcentage d'inhibition à 734 nm a été calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger de l'ABTS} = \frac{(A_T - A_E)}{A_T} \times 100$$

A_T : absorbance du témoin.

A_E : absorbance de l'échantillon

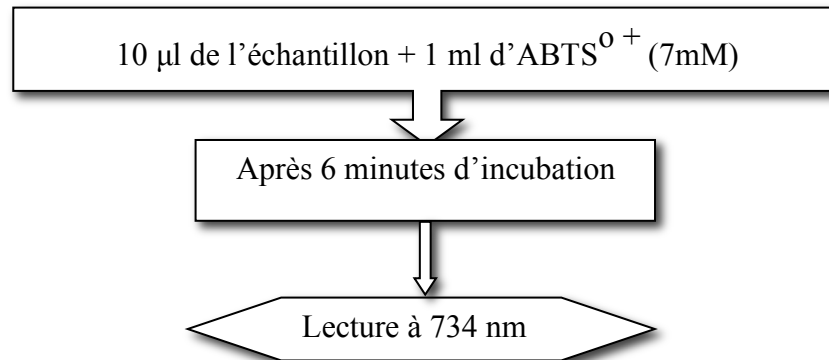


Figure 8: Protocole de l'évaluation de l'activité scavenger à l'égard de l'ABTS (Re et al., 1999).

Troisième partie :
Etude In-vitro
De l'Activité
Antibactérienne

Cette partie expérimentale a été réalisée au laboratoire pédagogique de microbiologie puis le laboratoire de valorisation et d'amélioration de production des races locales, institut des sciences vétérinaires, Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

1- Préparation de l'inoculum

Les suspensions d'inoculum ont été obtenues en prenant cinq colonies à partir des cultures de 24 h. Les colonies ont été mises en suspension dans 5 ml de solution d'eau physiologique stérile (0,85 % de NaCl) en agitant pendant 15 secondes. La densité a été ajustée à la turbidité du standard Mc Farland 0,5 (ce qui équivaut à $1-5 \times 10^8$ cfu/ml). La densité optique de chaque suspension a été confirmée sur un spectrophotomètre.

2- Test préliminaire « in vitro »

2-1 Huile essentielle :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des H.Es, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromagramme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (**Benjelali et al., 1986**) vis-à-vis de trois souches bactériennes multi-résistantes (*E. coli* F5, *E. coli* F17 et *E. coli* ATCC 25922).

▪ Principe

Il repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (**Ponce et al., 2003**).

▪ Protocole expérimental

Couler aseptiquement la gélose Mueller Hinton en surfusion dans des boîtes de Pétri (90mm de Ø) à raison de 10 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse. Les boîtes ont été par la suite inoculées à l'aide des écouvillons.

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose stérile et l'imbiber avec l'H.E à tester en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'H.E jusqu'à l'imprégnation totale du disque (5µl), puis déposer sur la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 min, et mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24 heures. Dans les boîtes de contrôle, les disques sont trempés dans de l'eau physiologique stérile. L'expérience est répétée trois fois pour chaque H.E et pour chaque souche bactérienne.

▪ Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.Es, (Ponce et al., 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

2-2 Miel

La détermination de l'activité antibactérienne des miels étudiés a été effectuée à l'aide de la méthode d'incorporation vis-à-vis de trois souches d'*E. coli* (F17, F5 et CS31A) multi-résistantes selon la méthode décrite par Alzahrani et al. (2012a).

▪ Protocole expérimental

Des concentrations entre 5% à 10% (v/v) des miels testés ont été additionnées à la gélose Mueller Hinton. Le volume final du miel et des milieux dans chaque boîte de Pétri (Ø : 60 mm) était de 5 ml. Les boîtes ont été inoculées et incubées à 37 ° C pendant 24 h. Les essais ont été répétés en triplicata.

▪ Lecture

La concentration inhibitrice minimale (CMI) a été définie comme étant la plus faible concentration de miel sur lequel les souches ne se développerait pas. Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires. Toutes les valeurs de CMI ont été exprimées en pourcentage (v/v).

3- Détermination des CMI et CMB

La méthode d'incorporation, pour l'huile essentielle de la cannelle, et la méthode de dilution en milieu liquide (micro-dilution), pour les deux huiles essentielles et les trois variétés de miels, ont été utilisées pour la détermination d'activité antimicrobienne. Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution de Tween 20.

3-1 Détermination des CMI de l'huile essentielle de la cannelle par la méthode d'incorporation

L'activité antimicrobienne d'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* a été évaluée contre quatre souches de bactéries Gram-négatives isolées des diarrhées néonatales du veau (*Escherichia coli* F5, *Escherichia coli* F17, *Kluyvera* spp. et *Klebsiella* spp). La détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode d'incorporation décrite par Amarti et al. (2010), avec une légère modification. La solution mère de l'huile essentielle de la cannelle a été préparée dans le Tween 20 à 10 % (1/9 v/v). Une dilution en série d'huile essentielle a été préparée avec Tween 20 (1/10^{ème}, 1/20^{ème}, 1/40^{ème}, 1/80^{ème}, 1/160^{ème} et 1/320^{ème}). Chaque tube à essai contenait 4,5 ml de milieu de gélose Mueller-Hinton auquel on a ajouté aseptiquement 0,5 ml des dilutions préparées pour obtenir une concentration finale de 1/100^{ème}, 1/200^{ème}, 1/400^{ème}, 1/800^{ème}, 1/1600^{ème}, 1/3200^{ème} (v/v). Les tubes ont été soigneusement agités pour disperser l'huile essentielle dans le milieu de culture avant de verser dans des boîtes de Pétri. Les témoins contenaient le milieu de culture et la solution tween 20 à 10% seule, ont été également préparés. Les boîtes ont été inoculées et incubées à 37 ° C pendant 24 h. La concentration inhibitrice minimale (CMI) a été déterminée en identifiant les boîtes ayant la plus faible concentration l'huile essentielle sur laquelle la souche ne se développait pas. Les essais ont été répétés en triplicata. Toutes les valeurs de CMI sont exprimées en v/v.

3-2 Détermination de CMI et CMB par la méthode de micro-dilution

La méthode de micro-dilution a été utilisée pour la détermination des activités antimicrobiennes des huiles essentielles et les trois variétés de miel étudiées vis à vis d'une souche *E. coli* ATCC 25922 et 30 souches bactériennes ayant une multi-résistance envers quatre classes d'antibiotique et plus.

La détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode de dilution en série sur des microplaques en matière plastique comportant 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12) en bouillon Mueller Hinton selon les recommandations du CLSI (CLSI, 2006 ; NCCLS, 1999).

Les concentrations de départ des solutions d'huiles essentielles étaient de 10 µl/ml pour chacune des deux huiles essentielles à tester (*Cinnamomum aromaticum* et *Mentha spicata*) ce qui est équivalent à (10,7 mg et 9,5 mg, respectivement) et de 50 % pour les miels. Les solutions mères des huiles essentielles ont été préparées dans le Tween 20 à 10 % (1/9 v/v) puis double dilution en série des huiles ont été faites. L'inoculum a été ajouté à tous les puits de façon à obtenir une concentration finale de bactéries d'environ 1- 5 x 10⁵ CFU / ml,

les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h. Pour chaque expérience, un contrôle positif (milieu inoculé) et un contrôle négatif (milieu seul) ont été préparés. La croissance bactérienne a été visualisée en ajoutant de la solution aqueuse à 0,5 % de chlorure de 2, 3, 5-triphényl-tétrazolium (TTC) (**Radulovic et al., 2011**). La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la concentration la plus faible des huiles qui a inhibé la croissance visible (La formation de pastille de couleur rouge au fond du puits après l'addition de TTC), tandis que la concentration minimale bactéricide (CMB) a été définie comme la plus faible concentration de l'huile qui a tué 99,9% des cellules bactériennes. Pour déterminer le CMB, 20 µL de bouillon a été prise de chaque puits sans croissance visible et inoculée sur une gélose nutritive pendant 24 h à 37 °C. La croissance des souches bactériennes testées correspondant à l'activité bactériostatique, tandis que l'effet bactéricide est révélé par une gélose claire après incubation (**Dramane, 2010**). Les expériences ont été réalisées en trois exemplaires.

Analyse
Statistique

Les veaux ont été regroupés selon leur âge en quatre catégories: 1-7, 8-14, 15-21 et 22-30 jours.

Le test du Chi-deux a été utilisé à une valeur de 95% pour estimer les différences entre la proportion d'échantillons fécaux testés positifs ou négatifs pour les entéropathogènes étudiés et le groupe d'âge et le sexe des veaux ayant la diarrhée.

Le modèle linéaire généralisé (la régression logistique) a été utilisé pour évaluer les différences entre les tranches d'âge et le sexe des animaux étudiés. Le logiciel de statistique R (version 3.3.0/ 03-05-2016) a été utilisé pour effectuer ces analyses.

Toutes les expériences de l'activité anti-oxydante (huiles essentielles et miel) ainsi que l'étude des paramètres physicochimiques du miel ont été effectuées en trois exemplaires et les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes avec écarts-types. Les différences significatives ont été obtenues par une analyse de variance à un seul facteur (ANOVA) suivie d'un test post hoc de différence hautement significative (HSD) de Tukey ($p < 0,05$). Cette analyse a été réalisée en utilisant le logiciel de statistique R (version 3.3.0/ 03-05-2016).

Résultats
&
Discussion

Première Partie :
Isolements et
Identification
Des Agents
Entéropathogènes

1- Résultats bactériologiques

1-1 Fréquence d'isolement des bactéries

La figure 9 montre que *E. coli* a été la bactérie la plus dominante avec un taux de 47,95%, suivie par *Kluyvera* sp. et *Klebsilla* sp. avec des taux égaux de 15,07%.

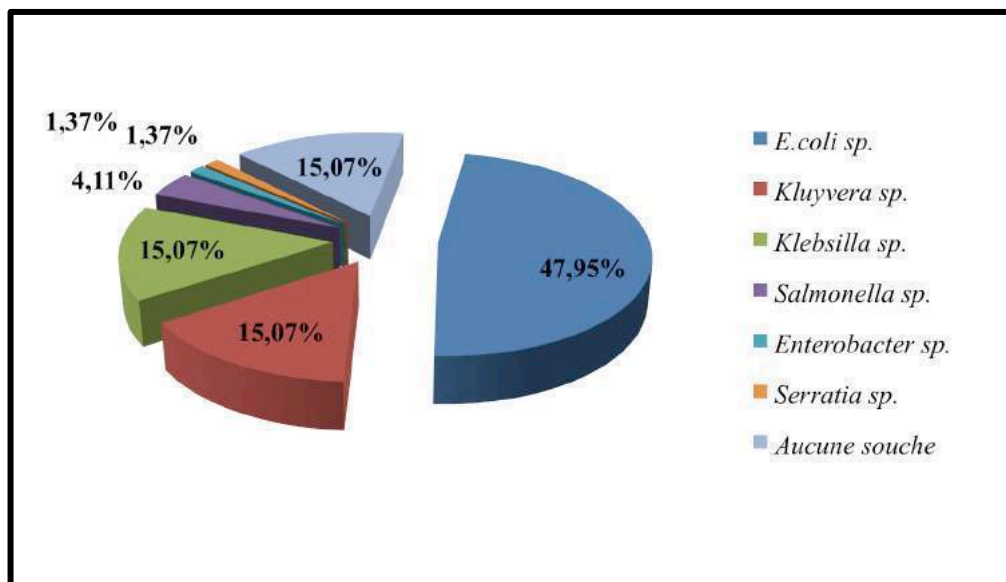


Figure 9 : Fréquence d'isolement des bactéries.

La fréquence d'isolement d'*E. coli* enregistrée durant cette étude a été inférieure à celle obtenue par **Shahrani et al. (2014)** en Iran 76,45%, **El Seedy et al. (2016)** (75,6%) et **Younis et al. (2009)** (87,72%) en Egypte. Cependant, **Picco et al. (2015)**, **Abd-Elrahman (2011)**, **Herrera-Luna et al. (2009)** et **Uhde (2008)** ont rapporté des taux inférieurs avec des prévalences, respectives de 30,1%, 39,23%, 18,9% et 5,5%.

Concernant l'isolement des Salmonelles, nos résultats (4,11%) concordent avec ceux de **Younis et al. (2009)** avec un taux de 4,09%, mais sont bien inférieurs à ceux d'**Izzo et al. (2011a)** en Australie (23,8%). **El Seedy et al. (2016)** en Egypte avec un taux de 18,1%, **Cho et al. (2013)** aux Etats unis avec une prévalence de 9% et **Reynolds et al. (1986)** avec un taux de prévalence de 12 %, qui ont qualifié *Salmonella* comme un agent de diarrhée répandu chez les veaux des races laitières. Alors que **Langoni et al. (2004)**, ont affiché un taux de 6,1 % pour *Salmonella typhimurium* et 5,4 % pour *Salmonella dublin*. Des pourcentages moindres ont été enregistrés par **Perez et al. (1998)** et **Achà et al. (2004)** avec 2 %, **De La Fuente et al. (1998)** avec 0,92 %.

Par contre, **Herrera-Luna et al. (2009)**, **Abraham et al. (1992)** ainsi que **Snodgrass et al. (1986)** ont signalé une absence de détection de *Salmonella*.

Il est utile de préciser que la coproculture négative ne garantit pas l'absence de portage. Mais, d'autre part, l'isolement d'une salmonelle ne signifie pas obligatoirement une maladie, ni même un portage chronique. Plusieurs coprocultures successives sur le même animal sont nécessaires pour conclure (Martel et Moulin, 1983).

Pour ce qui est de *Klebsiella* sp., nos résultats (15,07%) sont supérieurs à ceux de Herrera-Luna et al. (2009) qui ont rapporté un taux 3,3%.

1-2 Typage des *E. coli*

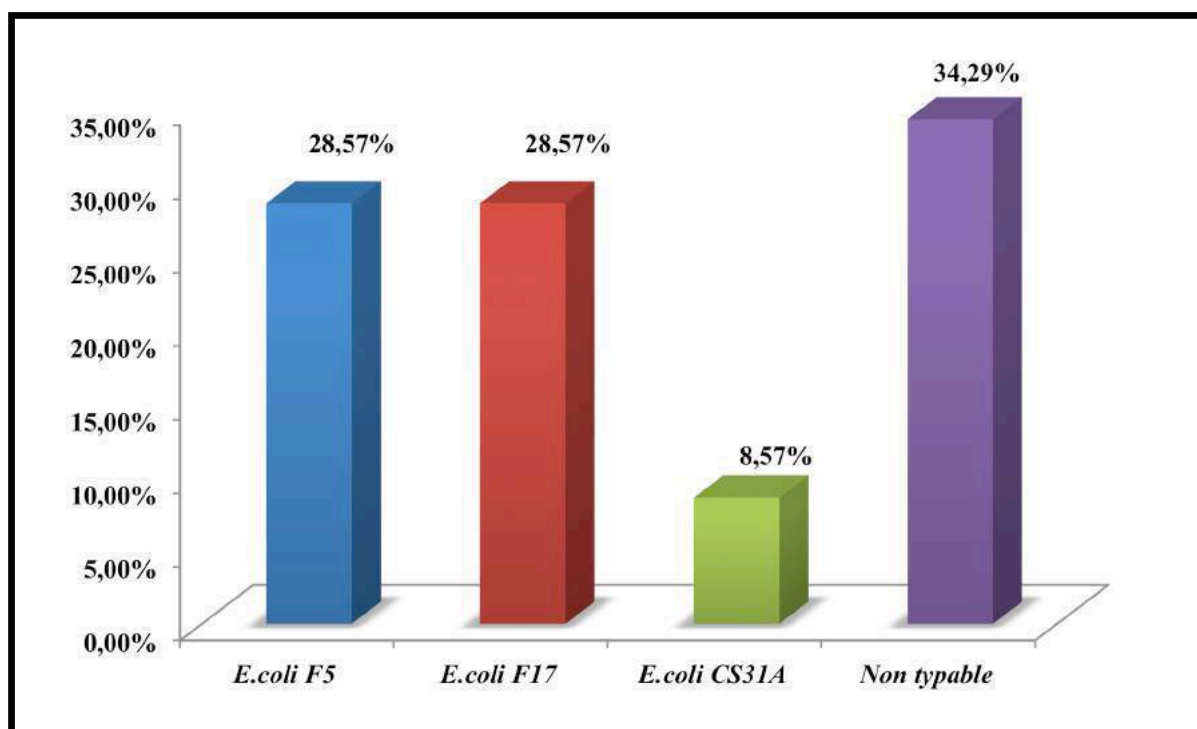


Figure 10 : Typage des *E. coli* isolées.

La figure ci-dessus montre que le séro-typage des souches d'*E. coli* a permis d'enregistrer des pourcentages égaux pour *E. coli* F5 et *E. coli* F17 (28,57%), suivies de *E. coli* CS31A (8,57%). Le reste, soit 34,29% de souches d'*E. coli* étaient non-typables par la technique utilisée.

Ce taux de 57,14% (20/35) des ETEC mis en évidence est supérieur à ceux cités par Pourtaghi et al. (2016), Shahrani et al. (2014), Pourtaghi et al. (2013) et Younis et al. (2009) qui ont respectivement rapportés des taux de 11,3%, 28,4%, 14,1% et 10,36%.

La prévalence d' *E. coli* F5 (28.57%) notée dans notre étude est proche à celles signalées en Turquie (26%) par Içen et al. (2013), au Mozambique (25%) par Achà et al. (2004) et au Brésil (34,9%) par Langouni et al. (2004). Des prévalences moindres ont été mentionnées en France (11,4%) par Lacroute et al. (2016), en Iran (14,1% et 5,3%) par

Pourtaghi et al. (2013) et **Shems et al. (2012)** respectivement, en Algérie (15,12%) par **Akam et al. (2011)**, en Australie (17,4%) par **Izzo et al. (2011b)**, en Egypte (10,36 %) par **Younis et al. (2009)** et en Turquie (18,9%) par **Ok et al. (2009)**.

Le fimbriae F17, connue sous le nom de FY ou Att25, est répandu dans des souches de *E. coli* isolées chez des veaux souffrant de diarrhée ou de septicémie (**Nguyen et., 2011**). Ce fait a été confirmé par notre étude où la prévalence d' *E. coli* F17 était de 28,75%, ce qui concorde avec celle de 28,7% notée en Uruguay par **Umpiérrez et al. (2016)**. Un taux plus faible de 16% a été cité par **Nguyen et. (2011)**. Alors que **Lacroute et al. (2016)** ont affiché un taux très faible chez les veaux malades (diarrhée/septicémie). Pour **Picco et al. (2015)** et **Güler et al. (2008)**, les prévalences étaient respectivement plus élevées de l'ordre de 41% et 44%.

CS31A est une adhésine fibrillaire d'*E. coli*, immunologiquement apparentée aux fimbriae F4 (anciennement appelé K88) et également codée par un plasmide. Elle a été étudiée en profondeur dans les souches d'*E. coli* septicémiques et entérotoxinogènes. *E. coli* CS31A est généralement exprimée avec d'autres antigènes fibrillaires de surface. En particulier, il a été rapporté que les fimbriae F17 et CS31A sont fortement associés (**Umpiérrez et al., 2016**). Dans cette étude, les souches portant cet antigène ont été détectées avec une prévalence de 8,57%. **Umpiérrez et al. (2016)** et **Mercado et al. (2003)** ont mentionné chez les veaux diarrhéiques des prévalences respectives de 17,3% et 17,8%. Une prévalence très élevée (77,3%) a été citée par **Lacroute et al. (2016)**.

Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence *E. coli* F41. Le même constat a été fait par **Lacroute et al. (2016)** et **Salvadori et al. (2003)**. Toutefois, **Nguyen et al. (2011)** ont montré une prévalence d'*E. coli* F41 de 4,93%. Alors que **Ok et al. (2009)** en Turquie ont signalé une prévalence élevée de 18,9%.

Cette variation du taux de prévalence avec les études précédentes, pourrait être sous la dépendance de différents facteurs tels que : la saison de l'étude, la situation géographique, l'environnement, les conditions d'hygiène dans l'exploitation, l'âge des animaux, ainsi que les méthodes de diagnostic pratiquées (**Picco et al., 2015 ; Içen et al., 2013**).

1-3 Antibiogramme

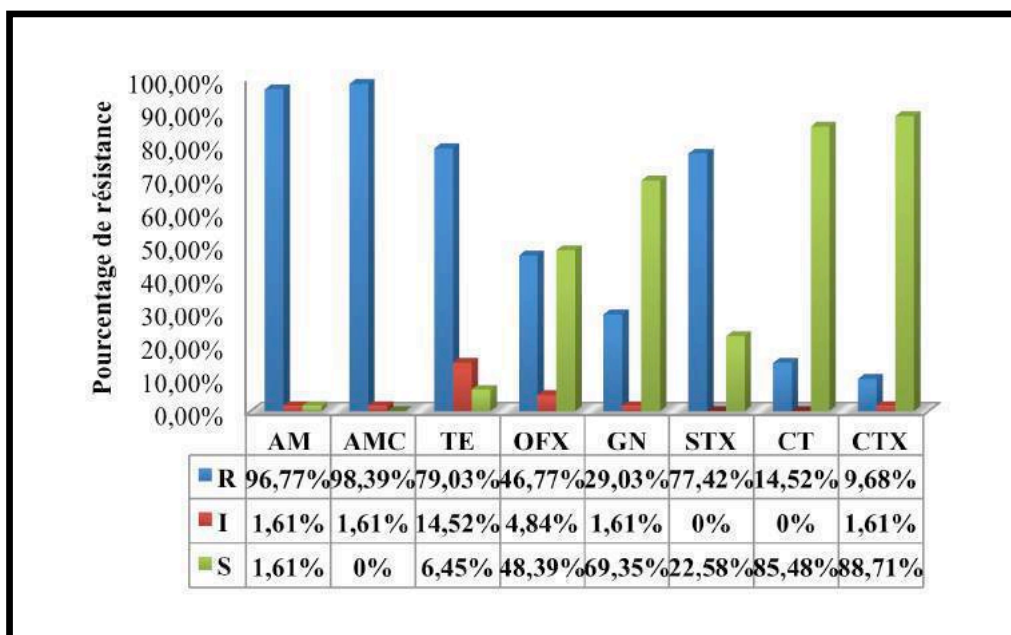


Figure 11 : Résultats de l’antibiogramme des isolats étudiés.

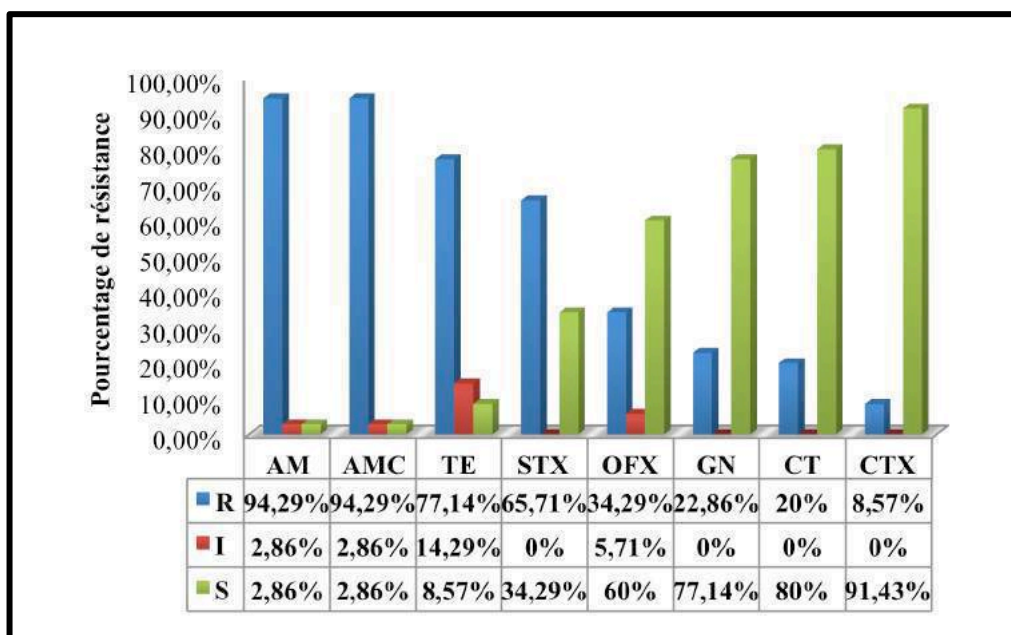


Figure 12 : Résultats de l’antibiogramme des souches d’*E. coli* isolées.

R : Résistant, I : Intermédiaire et S : Sensible

AM: Ampicilline, AMC: Amoxicilline + acide clavulanique, TE: Tétracycline,
 STX: Triméthoprime/sulfaméthoxazole, OFX: Ofloxacine, GN: Gentamicine,
 CT: Colistine, CTX: Céfotaxime.

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de huit antibiotiques par la méthode standard des disques.

Les figures 11 et 12 résument les résultats de l'antibiogramme. La figure 3.3 montre une antibio-résistance élevée des souches bactériennes testées envers : Amoxicilline +acide clavulinique (98,39%), ampicilline (96,77%), tétracycline (79,03%) et triméthoprime/sulfaméthoxazole (77,42%). Par contre, on a noté une sensibilité élevée de ces souches à l'égard de céfotaxime (88,71%), colistine (85,48%), gentamicine (69,35%) et ofloxacine (48,39%).

Pour ce qui est d'*E. coli*, germe le plus souvent incriminé dans les diarrhées, la figure 3.4 montre la résistance des souches d'*E. coli* isolées des diarrhées néonatales du veau. Un taux élevé de résistance de ces bactéries vis-à-vis de l'amoxicilline +acide clavulinique, ampicilline, tétracycline et triméthoprime/sulfaméthoxazole a été enregistré, avec des pourcentages respectifs, de 94,29%, 94,29%, 77,14% et 65,71%.

Plusieurs études antérieures ont rapporté l'antibio-résistance des souches d'*E. coli* isolées des diarrhées néonatales du veau. Des taux élevés de résistance ont été rapportés par **Lacroute et al. (2016)** à l'égard de la streptomycine (77,6%), l'amoxicilline (72,7%), la tétracycline (61,5%) et l'acide clavulinique (42,9%). Pour **Shahrani et al. (2014)**, cette résistance était envers la pénicilline (100%), suivie par la streptomycine (98,25%), la tétracycline (98,09%), la lincomycine (92,69%) et la sulfaméthoxazole (90,31%). **Abd-Elrahman (2011)** quant à lui a noté une résistance vis-à-vis de pénicilline (100%), néomycine (74,5%), streptomycine (68,62%), tétracycline (54,9%) et chloramphénicol (50,98%). Pourtaghi et al. (2016), ont observé une résistance des ETEC à l'égard de la pénicilline (100%), la tétracycline (90,9%), la streptomycine (90,9%), le sulfonamide (63,6%), le chloramphénicol (63,6%), la gentamicine (45,4%) et le fluoroquinolone (36,3%).

Des taux de résistance moins élevés des souches d'*E. coli* isolées de diarrhées néonatales du veau ont été montrés par **Rigobelo et al. (2006)** en Brésil à l'encontre de la céphalothine (46,1%), la tétracycline (45,7%), la triméthoprime-sulfadiazine (43,3%) et l'ampicilline (41%). Cependant **Roopnarine et al. (2009)** ont constaté une absence de résistance des souches d'*E. coli* isolées chez les veaux à l'égard de la triméthoprime/sulfaméthoxazole, la gentamicine, ciprofloxacine et enrofloxacine.

En Algérie **Akam et al. (2007)**, ont signalé une antibio-résistance des souches *E. coli* F5 à l'égard de l'ampicilline, la tétracycline et le chloramphénicol.

De plus, 100% des souches de *Salmonella* isolées des diarrhées néonatales du veau étaient résistants à l'amoxicilline, à la tétracycline, 75% à la carbinicilline et la doxycycline,

50% à l'érythromycine et la tobramycine et 25% à la bacitracine (Ansari et al., 2014). Tandis que, El-Seedy et al. (2016) ont montré que *Salmonella* était résistante à la gentamycine, l'érythromycine et l'amoxicilline.

Toutefois, Izzo et al. (2011a) ont montré que la majorité (72,4%) des isolats de *Salmonella* testés étaient sensibles à tous les antibiotiques utilisés. Ces mêmes auteurs ont expliqué cette résistance limitée aux antibiotiques chez les bovins australiens, par le fait que l'industrie laitière australienne est moins intensive que celle d'Europe et des Etats-Unis, de sorte que l'exposition aux agents pathogènes et les maladies concomitantes sont minimisées. De plus, la présence des antibiotiques à titre prophylactique dans l'alimentation (néomycine et l'oxytétracycline) sont très courants dans le lait de remplacement commercialisé aux Etats-Unis.

1-4 La multi-résistance

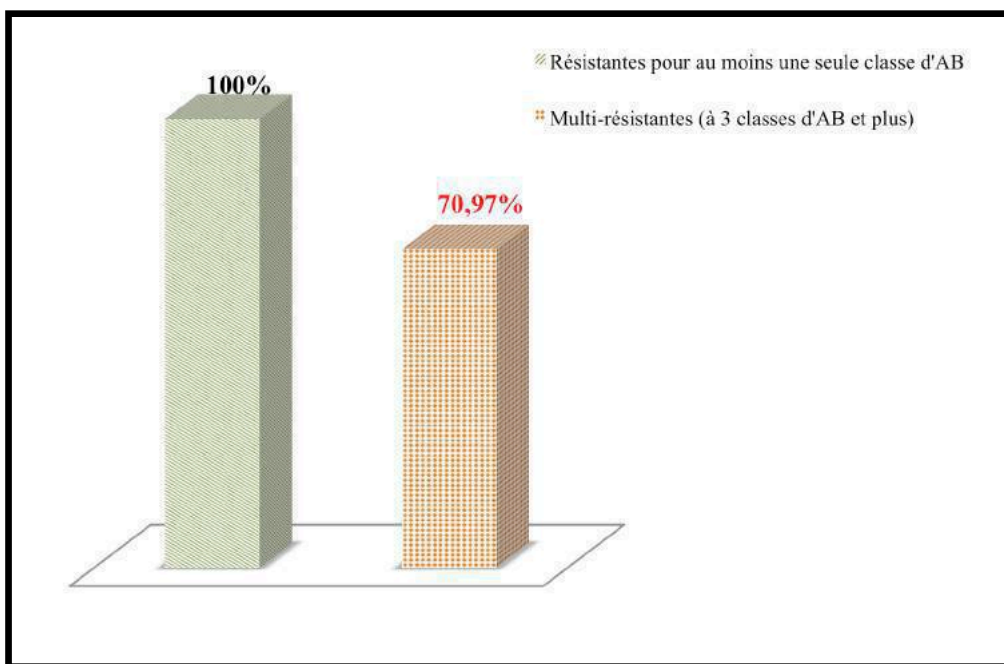


Figure 13 : Multi-résistance des isolats.

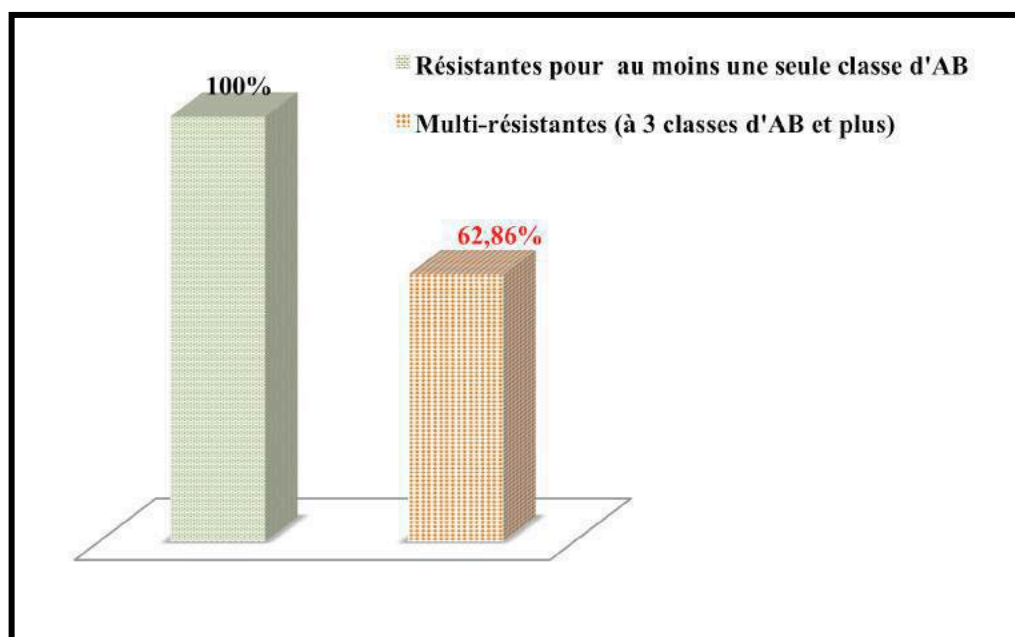


Figure 14 : Multi-résistance des souches *E. coli* isolées.

En terme littéraire, la multi-résistance bactérienne signifie «la résistance à plus d'un antibiotique». Cependant, aucune définition standardisée n'a encore été approuvée par la communauté médicale. L'absence de consensus sur la définition de la multi-résistance dans les protocoles des études cliniques a donné lieu à des données très difficiles à comparer. L'une des méthodes la plus employée par divers auteurs et autorités pour caractériser les organismes en tant que multi-résistants est basée sur les résultats des tests *in vitro* de la sensibilité aux antibiotiques, lorsqu'ils testent la résistance à divers agents antimicrobiens (classes ou sous-classes). La définition la plus fréquemment utilisée pour les bactéries Gram-positives et Gram-négatives est « la résistance à trois classes d'antibiotique ou plus » (Magiorakos et al., 2012).

En se basant sur cette dernière définition, les figures 13 et 14 montrent la multi-résistance des bactéries étudiées avec un ordre de 70,97% pour l'ensemble des bactéries et 62,86% pour les souches d'*E. coli*. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Rigobelo et al. (2006) et Lazaro et al. (1994) en Brésil qui ont mentionné 100% et 80% de multi-résistance envers deux et plus d'antibiotique pour les isolats d'*E. coli*. Néanmoins, De Verdier et al. (2012) ont affiché un taux de 28% de multi-résistance envers un antibiotique et plus.

Ces taux élevés de résistance et de multi-résistance peuvent s'expliquer par l'utilisation non rationnée des antibiotiques dans les cheptels bovins étudiés. De Verdier et al. (2012) ont incriminé l'alimentation du veau par un lait de vache traitée aux antibiotiques

ou un colostrum de vache traitée en période de tarissement comme une source possible d'antibio-résistance sous le risque d'une pression de sélection.

1-5 Prévalences des différents agents entéropathogènes détectées par le test ELISA

1-5-1 Prévalences globales des différents agents entéropathogènes détectées par le test ELISA

Tableau 6 : Prévalences des agents entéropathogènes détectés chez les veaux diarrhéiques.

Agents entéropathogènes détectés	Veaux (n = 50)	
	Nombre	%
Aucun agent	17	34
<i>Cryptosporidium</i> seul	17	34
<i>E. coli</i> F5 seul	06	12
<i>Coronavirus</i> seul	04	8
<i>Rotavirus</i> seul	02	4
<i>Cryptosporidium</i> + <i>E. coli</i> F5	01	2
<i>Cryptosporidium</i> + <i>Coronavirus</i>	01	2
<i>Cryptosporidium</i> + <i>Rotavirus</i>	01	2
<i>E. coli</i> F5 + <i>Rotavirus</i>	01	2

Avec une prévalence de 34% comme agent entéropathogène seul, *Cryptosporidium* spp a été l'agent pathogène le plus dominant. L'association avec *E. coli* F5, *Rotavirus* et *Coronavirus* a été de beaucoup moindre (2 %) (Tableau 6).

E. coli F5 a été détecté chez huit (08) veaux, ce qui représente une prévalence de 12% comme agent entéropathogène seul. Cependant, les coronavirus ont affiché une prévalence de 8%, comme agent entéropathogène seul, tandis que l'infection par les rotavirus a été détectée chez 4%, comme agent entéropathogène seul.

- Absence des agents entéropathogènes :

Les cas négatifs ont affiché un pourcentage de 34%, ce qui est inférieur à ceux obtenus par Selles et Niar (2007), Abraham et al. (1992), Zrelli et al. (1990) et Fedida et al. (1983), qui ont enregistré des pourcentages de 53,66%, 51,85 %, 57,1 % et 46,6 %, respectivement. Cependant, il est supérieur à celui décrit par De La Fuente et al. (1998) et Ok et al. (2009) et Içen et al. (2013) qui ont obtenu un pourcentage de résultats négatifs de 19,7%, 18,29% et 7,3%, respectivement. Par contre Izzo et al. (2011b) ont obtenu un taux inférieur de 5%.

Ce taux négatif élevé peut être expliqué par le fait que :

- Certains cas de diarrhée peuvent être non associés à des agents entéropathogènes (la diarrhée n'est pas d'origine infectieuse stricte, mais peut être due au lieu de cela à des facteurs nutritionnels ou de gestion).
- Les prélèvements ont été effectués à un moment où l'agent pathogène n'était pas présent dans les fèces.
- L'implication d'autres agents entéropathogènes non visés par cette étude dans le déclenchement de la diarrhée, tel que certaines bactéries (des souches d'*E. coli* autres que K99, *Campylobacter*,...etc.) et des virus (*Calicivirus*, *Torovirus*,...etc.).

- Prévalence Globale

Cette étude a affiché une prévalence globale de 66%, ce taux est supérieur à celui signalé par **Selles et Niar (2007)** dans la même région d'étude avec un pourcentage de 44,44%. Tandis qu'inférieur à ceux lancés par **Içen et al. (2013)**, **Izzo et al. (2011b)** et **Ok et al. (2009)** avec des taux de 92,7%, 95% et 81,71%, respectivement.

***Cryptosporidium* spp.**

Soit seul ou en association, *Cryptosporidium* spp a été l'agent pathogène le plus dominant dans notre étude, avec une fréquence de détection de 40%. Cette prévalence est proche à celles citées par **Içen et al. (2013)** et **Langoni et al. (2004)** avec des taux respectifs, de 47,8% et 38,9 %.

Selon **Gati (1992)**, chez les veaux diarrhéiques de moins de trois semaines, cette prévalence a été de 58,02 %.

Des prévalences également supérieures ont été décrites par **Quilez et al. (1996)**, **De La Fuente et al. (1999)**, **Safavi et al. (2001)**, **Singh et al. (2006)** et **Izzo et al. (2011b)** qui ont rapporté des prévalences allant de 51,8% à 86,36 %.

Pour **Selles et Niar (2007)**, les chiffres étaient de l'ordre de 14,63%, alors qu'ils étaient de 23% pour Reynolds et al. (1986), lesquels étaient très proches de ceux d' **Arslan et al. (2001)** avec 25,7%.

***E. coli* K99 (F5)**

Sur les cinquante échantillons fécaux soumis à l'analyse, *E. coli* K99 a été détectée dans huit cas, soit une prévalence de 16%. Cette prévalence est proche de celle de 14,1% mise en évidence par PCR multiplex et ciblant les ETEC par **Pourtoghi et al. (2013)** en Iran.

Pour **Akam et al. (2011)** en Algérie et **Izzo et al. (2011b)** en Australie, les résultats étaient de 15,12% et 17,4% et ce, Par la méthode ELISA.

Des prévalences légèrement inférieures ont été observées par **Picco et al. (2015)** en Argentine (12,9%), **Younis et al. (2009)** en Egypte (10,36 %), **De La Fuente et al. (1998)** en Espagne (12%) et **Abraham et al. (1992)** en Ethiopie (11,1%).

D'autres prévalences encore plus basses ont été signalées en Algérie par **Selles et Niar (2007)** 3,65% et **Akam et al. (2007 et 2004)** avec 5% et 4,7%. Pour **Perez et al. (1998)** au Costa Rica et **Reynolds et al. (1986)** en Grand Bretagne, elles étaient de 2% et 3%. Chiffres s'inscrivant à peu près au même niveau que ceux constatés en Algérie par **Ou Said et al. (1998)** lequel après, recherche des toxines et des fimbriae produites par les souches d'*Echerichia coli* à partir des fèces des veaux diarrhéiques a procédé à l'isolement d' *E. coli* K99 chez un veau âgé de 4 jours sur 48 veaux diarrhéiques soit 2,08%.

Dans la bibliographie consultée, la plus forte prévalence pour *E. coli* K99 a été rapportée par **Içen et al. (2013)** avec un taux de 27%. Alors qu'elle était nulle pour **Langoni et al. (2004)** et **Snodgrass et al. (1986)**.

Coronavirus

Le *Coronavirus* a été détecté sur 10% des prélèvements. Chiffre supérieur à ceux noté en Ecosse 4 % par **Snodgrass et al. (1986)**, et en Espagne 7,34 % par **De La Fuente et al. (1998)**.

Notre résultat est proche à ceux rapportés par **Rai et al. (2011)** en Inde (11,76%) et **Perez et al. (1998)** au Costa Rica (9%). Mais légèrement inférieur à ceux notés par **Ok et al. (2009)** en Turquie (13,4%) et **Reynolds et al. (1986)** en Grande Bretagne (14%).

Mais beaucoup plus inférieur à ceux cités par **Khamees (2015)** en Egypte, **Selles et al. (2014)**, **AKam et al. (2011)** en Algérie, **Izzo et al. (2011b)** en Australie, **Stipp et al. (2009)** et **Brandão et al. (2007)** au Brésil, **Abraham et al. (1992)** en Ethiopie, **Fedida et al. (1983)** et **Marsolais et al. (1978)** en France se situant dans une fourchette comprise entre 18,48% et 38,9%.

Rotavirus

Sur les cinquante échantillons soumis à l'analyse, les *Rotavirus* n'ont été détectés que dans quatre prélèvements diarrhéiques, ce qui représente une prévalence de 8%, très proche de celle de 7% rapportée par **Perez et al. (1998)** au Costa Rica.

Des prévalences supérieures ont été rapportées par **Selles et al. (2014)**(14,63%) en Algérie, **Rai et al. (2011)** en Inde (15,68%), **Akam et al et al (2011)** en Algérie (21,84%), **Ok et al (2009)** en Turquie (18,2%), **Alfieri et al. (2006)** en Brésil : 33 % pour les veaux à viande et 20,2% pour les veaux laitiers ; et par **Langoni et al. (2004)** : 25,1 % et par **Zrelli et al. (1990)** : 22,8 %.

Des taux importants ont été signalés par Reynolds et al. (1986), Snodgrass et al. (1986), De La Fuente et al. (1998), Izzo et al. (2011b) et Khamees (2015), avec respectivement, des pourcentages de 42%, 50%, 42,7% 79,9% et 43,5%.

Les associations

Les infections mixtes ont affiché une prévalence globale de 8% ; ce résultat est proche à ceux obtenus par Selles et Niar (2007) et Zrelli et al. (1990) qui ont enregistré un taux de 6,1 % et 5,8%, respectivement. Alors que des pourcentages supérieurs ont été rapportés par Reynolds et al. (1986) 20%, Snodgrass et al. (1986) 15%, De La Fuente et al. (1998) 28%, Izzo et al. (2011b) 71%, Içen et al (2013) 34,22% et Khamees (2015) 37%.

La différence dans la détection des entéropathogènes peut être attribuée aux différentes méthodes de diagnostic utilisées (Ok et al., 2009), les pratiques d'élevage, l'état d'hygiène (Mayameei et al., 2010 et Ok et al., 2009), l'environnement et les emplacements géographiques (conditions climatiques).

Cependant, la différence entre les résultats obtenus dans notre présente étude, et celle qu'on a menée en 2007 (Selles et Niar, 2007) peut être liée à l'utilisation plus fréquente des vaccins dirigés contre les Rotavirus, les Coronavirus et les *E. coli* F5.

L'augmentation de la prévalence des Cryptosporidies pourrait s'expliquer par la différence entre les deux kits ELISA utilisés, le deuxième (celui de la présente étude), n'est pas spécifique d'espèce.

1-5-2 Prévalence des agents entéropathogènes détectés par le test ELISA selon les tranches d'âge

Tableau 7 : Prévalence des agents entéropathogènes détectés par le test ELISA selon différentes tranches d'âge.

Tranche d'âge	Nombre de cas	Nombre de cas positif	Cryp	<i>E. coli</i> K99	BVCo	BRV
0-7j	10	70 % (7/10)	30% (3/10)	20% (2/10)	20% (2/10)	10% (1/10)
8-14j	15	80 % (12/15)	60 % (9/15)	13,33 % (2/15)	6,66 % (1/15)	13,33 % (2/15)
15-21j	18	61,11 % (11/18)	38,88 % (7/18)	16,66 % (3/18)	11,11% (2/18)	-----
22-30j	7	42,86 % (3/7)	14,29 % (1/7)	14,29 % (1/7)	-----	14,29 % (1/7)

Cryptosporidium

La prévalence de *Cryptosporidium* spp en fonction des tranches d'âge a été comme suit :

La première tranche a affichée un taux de 30%, ce taux est assez proche à celui cité par **Safavi et al. (2011)** (36%), mais supérieur à celui rapporté par **Darbus et al. (2001)** 5% **Khelef et al. (2007)** 19,3 %. Cependant, une prévalence bien supérieure a été citée par **De La Fuente et al. (1999)** : 43,8 %.

En deuxième tranche d'âge, cette prévalence était de 60%, donc, inférieure à celle rapportée par **Içen et al. (2013)**, **Darbus et al. (2001)**, **Safavi et al. (2011)** et **De La Fuente et al. (1999)** avec des taux respectifs de 69,9%, 74,5%, 74,5% et 71,9%. Cependant, en Algérie **Selles et Niar (2007)** et **Khelef et al. (2007)** ont cité des taux respectifs, de 38,46% et 39,6% ce qui est inférieur à celui noté par cette étude.

Pour la troisième tranche d'âge, une prévalence de 38,88% a été notée, ce qui est proche à celle rapportée par **Khelef et al. (2007)** et **Safavi et al. (2011)** avec des prévalences respectives de 32,1 % et 40%. Mais elle est inférieure à celles obtenues par **Darbus et al. (2001)** avec 51,13 % et **De La Fuente et al. (1999)** avec 63,2 %. La prévalence obtenue dans cette étude est supérieure à celle enregistrée par **Selles et Niar (2007)** : 18,75%.

La prévalence de l'ordre de 14,29% obtenue pour la quatrième tranche d'âge est similaire à celle citée par **Khelef et al. (2007)** qui était de 17,6 %. Des taux inférieurs ont été enregistrés par **Selles et Niar (2007)**, **Darbus et al. (2001)** et **De La Fuente et al. (1999)** avec des prévalences de 7,4%, 10,2 % et 6,9 %, respectivement. Cependant, **Safavi et al. (2011)** ont cité une prévalence supérieure de 23,8%.

E. coli K99 (F5)

La prévalence d'*E. coli* F5 en fonction des tranches d'âge a affiché les résultats suivants : 20% en première tranche d'âge, ce qui est très proche à celle de 21,2% citée par **Abraham et al. (1992)**.

Pour ce qui est de la deuxième et troisième tranche, il n'y a été nullement fait mention dans la bibliographie consultée.

Pour la quatrième tranche d'âge la prévalence était de 14,29 %. La seule bibliographie y faisant mention parmi celles consultées (**Abraham et al., 1992**) ne fait état d'aucun cas d'*E. coli* F5 isolé.

Coronavirus

L'infection par le *Coronavirus* a permis d'enregistrer des prévalences différentes selon les tranches d'âge, les 20% en première tranche d'âge sont similaire à ceux obtenus par

Selles et Niar (2007) avec un taux de 19,24%, mais inférieurs à ceux rapportés par **Abraham et al. (1992)** avec une prévalence de 63,6 %.

En 2^{ème} tranche d'âge la prévalence a été de 6,66 %, celle ci est inférieure aux prévalences citées par **Selles et Niar (2007)** et **Abraham et al. (1992)** qui étaient respectivement, de l'ordre de 15,13% et 57,1%.

En troisième tranche d'âge la prévalence a été de 11,11%, cette prévalence est supérieure à celle décrite par **Selles et Niar (2007)** (6,25%), mais inférieure à celle notée par **Abraham et al. (1992)** avec 60,9%.

La dernière tranche s'est soldée par une absence de détection de cet agent pathogène. Mais lors de l'étude antérieure (**Selles et Niar, 2007**) déjà citée plus haut, cette détection a été positive d'autant que la prévalence était assez élevée soit 33,33%, très proche de celle de **Abraham et al. (1992)** avec 30,8 %.

Rotavirus

L'infection par les rotavirus en fonction des quatre tranches d'âge a été de :

10 % en première tranche, ce qui est faible par rapport à celles enregistrées par **Selles et Niar (2007)** 19,24%, **Alfieri et al. (2006)** 18,2% et **Abraham et al. (1992)** 30,3%.

La deuxième tranche d'âge a montré une prévalence de 13,33%, inférieure donc à celles citées par **Selles et Niar (2007)** (30,77%), **Alfieri et al. (2006)** (25,3%), **Abraham et al. (1992)** (42,9%).

Cependant, pour la troisième tranche d'âge, cette détection a été négative. Le même constat a été rapporté par **Selles et Niar (2007)**. Au contraire, **Abraham et al. (1992)** et **Alfieri et al. (2006)** ont rapporté des prévalences respectives de 4,3% et 36%.

Cette absence de détection peut être expliquée par l'acquisition de l'immunité chez les veaux et l'hygiène au niveau de l'étable.

La tranche d'âge de 8-14j a affiché la fréquence la plus élevée. Cette tranche d'âge a été considérée comme la plus sensible à l'infection par les cryptosporidies (60%). En plus, les 3 premières semaines de vie ont été caractérisées par les taux les plus élevés d'infection par les quatre agents infectieux. Plusieurs études antérieures ont mentionnées la même situation (**Selles et al., 2014, Safavi et al., 2011, Alfieri et al., 2006, Arslan et al., 2001 et Fassi-Fehri et al., 1988**).

Cela peut s'expliquer par la diminution de l'immunité passive et l'absence de la résistance naturelle contre l'infection par ces agents entéropathogènes.

Ainsi, l'infection s'installe après élimination des immunoglobulines colostrales ; les veaux privés de colostrum développent une infection expérimentale plus sévère, et éliminent le virus en quantité plus grande que les témoins (**Fassi-Fehri et al., 1988**).

1-5-3 L'effet du sexe

Tableau 8 : Pourcentage des cas positifs mâles et femelles selon différentes tranches d'âge.

Tranche d'âge	Nombre de cas positifs	Mâle	Femelle
0-7 jours	7	71,43% (5/7)	28,57% (2/7)
8-14 jours	12	58,33% (7/12)	41,67% (5/12)
15-21 jours	11	45,45% (5/11)	54,55%(6/11)
22-30 jours	3	33,33% (1/3)	66,67% (2/3)
Total	33	54,55% (18/38)	45,45% (15/33)

D'après le tableau ci-dessus, lors des deux premières tranches d'âge, le nombre de cas positifs mâles est supérieur à celui des femelles, situation qui s'inverse pour les deux dernières tranches d'âges.

Globalement, la fréquence de l'infection des veaux (54,55%) a été supérieure à celle des vèles (45,54%) qui prennent le dessus en 2^{ème} et 3^{ème} tranches. On peut supposer que la taille du mâle à la naissance induit une dystocie, et par conséquent diminue l'absorption de colostrum (Selles et al., 2014). Les femelles semblent avoir des taux sériques d'immunoglobulines (reflétant une absorption accrue de colostrum) significativement plus élevés que chez les mâles. Ce résultat étant certainement influencé par une facilité du vêlage. Cependant, les veaux, généralement plus gros au moment du vêlage, souffrent davantage à ce moment, et tardent à se lever et téter (Odde, 1988). Un résultat similaire a été affiché par Clement et al. (1993), qui ont remarqué que la sensibilité des mâles est deux fois supérieure à celle des femelles pour les agents entéropathogènes responsables des diarrhées néonatales du veau.

Deuxième partie :
Etude
Phyto-chimique
et Activité
Anti-oxydante

1- Huile essentielle

1-1 Rendement

Les huiles essentielles ont été extraites des matériaux végétaux secs de deux plantes : feuilles desséchées de *Mentha spicata* et écorce de *Cinnamomum aromaticum* à l'aide d'un hydro distillateur.

Tableau 9: Rendement en huiles essentielles.

	HE <i>Mentha spicata</i>	HE <i>Cinnamomum aromaticum</i>
Rendement	1,97 ± 0,09	1,46 ± 0,05

Le tableau 9 montre les rendements moyens (moyenne ± écart type) en huiles essentielles calculés en fonction de la matière végétale sèche de la plante.

▪ ***Cinnamomum aromaticum***

Le rendement moyen obtenu en huile essentielle de la cannelle a été de 1,46 ± 0,05% (p/p). Un résultat similaire a été obtenu par **Kasim et al. (2014)** avec un rendement moyen de 1,82%. Alors que les niveaux d'huile essentielle de l'écorce de *Cinnamomum cassia*, provenant des provinces du Guangxi et du Guangdong (Chine du Sud), variaient entre 1,69 ± 0,67 et 3,21 ± 0,12% (p/p) (**Deng et al., 2014**). De même, des rendements plus élevés ont été enregistrés par **Geng et al. (2011)** (2,7-3,3% (p/p)), **Li et al. (2013)** (2,38%) et **Huang et al. (2014)** (2,76% (p/p)). **Jeyaratnam et al. (2016)**, ont également obtenu un rendement élevé (2,55% (p/p)) d'huile essentielle de *C. cassia* en utilisant une hydro distillation assistée par micro-ondes.

Des études précédentes ont montré que la partie d'écorce de la branche a tendance à produire plus d'huile essentielle par rapport à l'ensemble de la branche, ce qui indique que la sélection de l'écorce en fonction des étapes de croissance des arbres ainsi que la séparation de l'écorce de la tige dans les sections supérieures, améliorent l'efficacité d'extraction des huiles essentielles (**Rao et al., 2014**). Par ailleurs, la situation géographique, la culture, la variété de la cannelle, le temps de récolte et la méthode d'extraction affecte le rendement et la composition de l'huile essentielle (**Bernard et al., 1989 ; Adinew, 2014**).

▪ ***Mentha spicata***

Le rendement en huile de *M. spicata* a été de 1,97 ± 0,09%. Des résultats similaires ont été rapportés par **Soković et al. (2010 et 2007)** avec 1,5%. Le rendement en huiles essentielles de feuilles de *M. spicata* récoltées dans trois autres régions d'Algérie à savoir Bejaia, Saida et Sétif ont été de 1,1%, 1,3% et 0,89%, respectivement (**Brahmi et al., 2016 ; Allali et al., 2013 ; Boukhebtí et al., 2011**). Toutefois, le rendement d'extraction de la

menthe tunisienne a été de 1,1% (Snoussi et al., 2015), de la menthe verte du Pakistan (1,2%) (Hussain et al., 2010a), de l'Inde, de 0,4 à 0,8% (Paladia et al. 2013), et du Bangladesh a été de 0,33% (Chowdhury et al., 2007). Tandis que Roldán et al. (2010) et Martins et al. (2012) ont montré des taux très faibles avec 0,08% et 0,1%, respectivement.

Des études précédentes ont attribué cette différence du rendement à la saison de récolte de la plante d'où un rendement en huile essentielle plus élevé en été (quand les plantes étaient en pleine floraison) qu'en hiver (lorsque les plantes atteignent la fin de leur développement) (Brahmi et al., 2016 ; Hossain et al., 2010b ; Kofidis et al., 2004).

En outre, le rendement en huile essentielle et la composition relative des constituants de celle-ci peuvent à la fois varier considérablement en fonction de la phase de développement de la plante (Miguel et al., 2004 ; Roldán et al., 2010).

1-2 Composition chimique des huiles essentielles : analyse par CG/MS CG/FID

L'identification des composants des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse grâce à un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS). Les analyses de la composition chimique des deux huiles essentielles effectuées à la Sarl Pyrenessences Analyse (France) ont donné lieu à 116 composés soit environ 99,92 % de la composition totale pour *Mentha spicata* contre 89 composés soit environ 99,99% de la composition totale pour *Cinnamomum aromaticum* (tableau 10).

La composition quantitative de l'huile essentielle de *Mentha spicata* est représentée principalement par le carvone (63,95%), le limonène (5,85%), l'acétate de dihydrocarvyle (4,17%), le 1,8-cineole + β -phellandrene (3,75%), le *trans*-thuyanol (2,74%), le *cis*-dihydrocarvone (1,68%), le β -caryophyllène (1,37%), le Terpinène-4-OL (1,23%), le borneol (1,11%) et l'acétate de *cis*-carvyle (1,07%). Alors que, celle de *Cinnamomum aromaticum* est dominée par le *E*-cinnamaldéhyde (94,67%).

Tableau 10 : Composition chimique des huiles essentielles de *Mentha Spicata* et *Cinnamomum aromaticum* par CG/MS – CG/FID.

TR (min)	Constituants	M. s (%)	C. a (%)
5,3	ACETONE	-	0,01
6,3	ACETATE D'ETHYLE	-	0,01
7,2	ETHANOL	0,10	0,25
10,5	α -PINENE	0,48	-
10,6	α -PINENE	-	0,03
	α -THUYENE	0,08	-
11,4	TRANS-2,5-DIETHYL TETRAHYDROFURANE	0,01	-
11,7	2-METHYLBUTYRATE D'ETHYLE	0,01	-
12,6	CAMPHENE	0,20	-

12,7	CAMPHENE	-	0,03
14,7	β -PINENE	0,74	-
15,4	SABINENE	0,56	-
15,7	O-XYLENE	-	0,01
17,6	β -MYRCENE	0,61	-
18,0	α -PHELLANDRENE	0,01	-
18,2	ψ -LIMONENE	0,02	-
18,9	α -TERPINENE	0,17	-
20,1	LIMONENE	5,85	0,03
20,8	1,8-CINEOLE	-	0,10
20,9	1,8-CINEOLE + β -PHELLANDRENE	3,75	-
21,2	1,3,8-P-MENTHATRIENE	0,03	-
21,4	2-HEXENAL	0,02	-
22,1	CIS- β -OCIMENE	0,18	-
23,1	γ -TERPINENE	0,34	0,01
23,3	TRANS- β -OCIMENE	0,05	-
23,9	STYRENE	-	0,01
24,8	P-CYMENE	0,23	0,01
25,1	2-METHYLBUTYRATE DE 2-METHYLBUTYLE	0,01	-
25,3	3-HEPTANOL	0,02	-
25,6	TERPINOLENE	0,10	0,01
28,9	ACETATE DE 1-ETHYLHEXYLE	0,12	-
30,5	ESTER ALIPHATIQUE	0,01	-
32,6	3-OCTANOL	0,40	-
32,8	2-NONANONE	-	-
33,3	NONANAL	0,03	-
35,7	METHYL HEXANOL	-	0,01
35,9	ESTER ALIPHATIQUE	0,02	-
36,2	α ,P-DIMETHYLSTYRENE	0,02	-
36,4	1-OCTEN-3-OL	0,06	-
36,6	ACIDE ACETIQUE	-	0,02
37,0	CIS-1,2-EPOXYDE DE LIMONENE	0,01	-
37,8	TRANS-THUYANOL	2,74	
38,0	TRANS-1,2-EPOXYDE DE LIMONENE	0,06	-
38,4	METHYLBUTYRATE DE CIS-2-HEXENYLE	0,01	-
38,5	MENTHONE	0,01	-
39,3	3-NONANOL	0,01	-
39,4	METHYLBUTYRATE DE CIS-3-HEXENYLE	0,08	-
40,0	α -CAMPHOLENE ALDEHYDE	-	0,01
40,1	α -COPAENE	-	0,03
40,2		0,02	-
40,3	ISOMENTHONE	0,02	-
41,6	α -BOURBONENE	0,03	-
42,0	β -BOURBONENE	0,41	-
	BENZALDEHYDE		0,29
42,2	DIHYDROEDULAN ISOMERE	0,03	
42,9	LINALOL	0,03	0,03
43,1	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,03	-
43,4	CIS-THUYANOL	0,21	-

43,6	1-OCTANOL	0,02	-
44,1	EPOXYDE DE LIMONENE ISOMERE	0,01	-
44,4	TRANS-P-MENTH-2-EN-1-OL	0,10	-
44,9	α ,CIS-BERGAMOTENE	-	0,01
45,3	PINOCARVONE	-	0,01
45,6	FENCHOL	-	0,02
	ϵ -CADINENE	-	-
45,7	ϵ -CADINENE	0,08	-
45,9	ACETATE DE BORNYLE	0,09	0,14
46,4	β -ELEMENE	-	0,01
46,5	β -ELEMENE	0,09	-
46,7	HYDRATE DE CAMPHENE	-	0,01
46,9	β -CUBEBENE	0,06	-
47,0	TERPINENE-4-OL	-	0,10
47,1		1,23	-
47,2	β -CARYOPHYLLENE	-	0,01
47,3		1,31	-
48,0	CIS-DIHYDROCARVONE	1,68	-
48,5	CIS-P-2,8-MENTHADIEN-1-OL	0,06	-
49,1	TRANS-DIHYDROCARVONE	0,15	-
49,2	METHYLENE PROPENYL BENZENE MW=130	-	0,01
49,3	P-METHOXY STYRENE	-	0,04
49,8	CADINA-3,5-DIENE	0,10	-
	BENZENEACETALDEHYDE	-	0,22
50,0	CADINADIENE ISOMERE	0,05	-
50,2	ALLO-AROMADENDRENE	0,03	-
50,3	ACETOPHENONE	-	0,02
50,4	TRANS-PINOCARVEOL	0,02	-
50,8	2-METHYL BENZOFURANE	-	0,01
50,9	E- β -FARNESENE	0,04	-
51,1	ISOBORNEOL	-	0,01
51,2	TRANS-P-2,8-MENTHADIEN-1-OL	0,05	-
	δ -TERPINEOL	-	0,01
51,3	δ -TERPINEOL	0,23	-
	ESTRAGOLE	-	0,01
51,5	ACETATE DE DIHYDROCARVYLE	4,17	-
51,8	α -HUMULENE	-	0,01
51,9		0,14	-
52,0	CIS-4,5-MUUROLADIENE	0,47	-
	ALDEHYDE SALICYLIQUE	-	0,02
52,3	SESQUITERPENE	0,06	-
52,7	γ -MUUROLENE	-	0,01
52,8	α -TERPINEOL	-	0,03
52,9		0,32	-
53,0	ACETATE DE TERPENYLE	-	-
53,2	BORNEOL	1,11	0,14
54,2	GERMACRENE D	-	-
54,3	COMPOSE AROMATIQUE MW=138	-	0,01

54,4	GERMACRENE D	0,96	-
54,7	DIHYDROCARVEOL ISOMERE	0,16	-
54,9	α -MUUROLENE	-	0,01
55,4	ACETATE DE TRANS-CARVYLE	0,03	-
55,2	α -SELINENE	-	0,01
55,7	CARVONE	-	0,02
56,1	CARVONE	63,59	-
56,3	BICYCLOGERMACRENE	0,40	-
56,6	DIMETHYL OXA BICYCLOHEXANE MW=112	-	0,01
56,8	δ -CADINENE	-	0,01
56,9		0,04	-
57,0	COMPOSE MW=132	-	0,02
57,2	γ -CADINENE	0,07	0,01
57,5	ACETATE DE CIS-CARVYLE	1,07	-
58,0	SALICYLATE DE METHYLE	-	-
58,1		0,03	-
58,2	BENZENE PROPANAL	-	0,70
58,8	NEROL	0,02	-
58,9	PERILLALDEHYDE	0,03	-
59,2	α -AMORPHENE	0,09	-
59,3	ALCOOL TERPENIQUE	0,04	-
59,6	HYDROXY PHENYL ETHANONE	-	0,01
59,9	ESTER TERPENIQUE	0,02	-
60,0	2,4-DECADIENAL	-	0,03
60,9	TRANS-CARVEOL	0,21	0,01
61,3	GERANIOL	-	0,01
61,4	CALAMENENE	-	0,01
61,5		0,35	-
61,6	P-CYMENE-8-OL	0,04	0,01
62,0	OXYDE DE CARVONE	0,03	-
62,3	E-GERANYL ACETONE	0,03	-
	2-HYDROXYCINEOLE	-	0,01
62,7	CIS-CARVEOL	0,58	-
	4-PHENYL-2-BUTANONE	-	0,01
63,3	ALCOOL BENZYLIQUE	-	0,01
64,9	PROPIONATE D'ETHYLPHENYLE	-	0,09
65,0	Z-CINNAMALDEHYDE	-	0,01
65,2	ALCOOL PHENYLETHYLIQUE	-	0,01
66,8	PIPERITENONE	0,20	-
67,7	TRANS-JASMONE	0,66	-
67,8	COMPOSÉ AROMATIQUE	-	-
68,5	OXYDE DE PIPERITENONE	0,03	-
69,0	2-METHYLBUTYRATE DE 2-PHENYLETHYLE	0,02	-
69,9	ESTER ALIPHATIQUE + COMPOSE AROMATIQUE	0,05	-
70,4	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,16	-
71,0	METHYLEUGENOL	-	-
71,1	SESQUITERPENOL	0,02	-
72,2	SESQUITERPENOL	0,01	-
72,3	SESQUITERPENOL	0,02	-

73,3	GERMACRA-1,5-DIEN-4-OL	0,05	-
73,9	EPI-CUBENOL	0,37	-
74,1	E-CINNAMALDEHYDE	-	94,67
75,2	P-ANISATE DE METHYLE	0,03	-
75,7	SESQUITERPENOL	-	0,01
77,1	SPATHULENOL	0,17	-
77,4	CINNAMATE D'ETHYLE	-	0,04
78,2	SESQUITERPENOL	-	-
78,3	ACETATE DE CINNAMYLE	-	0,74
78,8	EUGENOL	0,08	-
78,9		-	0,01
79,3	T-CADINOL	-	0,04
79,4		0,07	-
80,1	α -MUUROLLOL	-	0,04
80,2		0,03	-
80,6	CADINOL ISOMERE	-	0,03
80,7	CARVACROL	0,03	0,01
81,5	α -BISABOLOL	0,03	-
82,0	SESQUITERPENOL	-	0,01
82,1	ISOSPATHULENOL ISOMERE	0,03	-
82,3	α -CADINOL	-	0,02
82,4		0,27	-
83,5	SESQUITERPENOL	-	0,02
84,4	ALCOOL CINNAMIQUE	-	0,36
84,7	SESQUITERPENOL	0,07	-
85,0	COMPOSE AROMATIQUE	0,02	-
	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	-	0,01
85,6	CARYOPHYLLA-3,7-DIEN-6-OL	0,02	-
86,3	COMPOSE AROMATIQUE	0,04	-
86,5	SESQUITERPENOL	-	0,02
86,6	CHAVICOL	-	-
86,7		-	0,01
87,3	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	-	0,04
88,4	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,02	-
88,7	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,03	
89,1	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	-	0,03
92,2	TRANS-O-METHOXY-CINNAMALDEHYDE	-	0,05
93,4	COUMARINE	-	0,88
96,4	3-METHOXYCINNAMALDEHYDE	-	0,01
99,6	COMPOSE AROMATIQUE	-	0,05
100,8	BENZOATE DE BENZYLE	-	0,01
106,1	α -PHELLANDRENE DIMERE MW=268	-	0,03
107,3	COMPOSÉ AROMATIQUE	-	0,03
108,9	α -PHELLANDRENE DIMERE MW=268	-	0,03
	Total	99,92	99,99

- *C. aromaticum*

Les composants chimiques de l'huile essentielle de cannelle ont été largement étudiés dans la littérature. Plusieurs études ont mentionné que le trans-cinnamaldéhyde était le composant le plus abondant dans l'huile essentielle *C. aromaticum* mais en concentrations différentes. Pour **Singh et al. (2007)**, **Giordani et al. (2006)**, **Liu et al. (2014)**, **Poaty et al. (2015)**, **Deng et al. (2014)** et **Huang et al. (2014)**, les taux de trans-cinnamaldéhyde dans l'huile essentielle de *C. aromaticum* analysée par CG/MS étaient respectivement de 97,7%, 92,2%, 76,9%, 72,23%, 68,52% et 49,33%.

Chang et al. (2013), utilisant la même technique ont trouvé quant à eux que c'étaient l'acide cis-2-méthoxycinnamique (43,06%) et le cinnamaldéhyde (42,37%), qui représentaient les principaux composés de l'huile essentielle de *C. aromaticum*.

Par analyse plus poussée en utilisant GC-MS et FTIR, **Adinew (2014)** a rapporté que le 2-propanol, 3-phényle, était le principal constituant (87,01%) de l'huile essentielle d'écorce de cannelle poussant dans le Sud-Ouest de l'Ethiopie.

Bruneton (2009) a constaté que le composant principal des huiles essentielles de *C. aromaticum* était *E-cinnamaldéhyde* (90%), alors que l'eugénol n'en représentait qu'une petite fraction. Ce qui est en accord avec la présente étude avec 94,67% de *E-cinnamaldéhyde* et 0,01% d'*Eugénol*.

Le rendement et la composition des huiles essentielles peuvent être affectés par les différentes méthodes d'extraction et d'analyse, la situation géographique, la culture, la variété de la plante et le moment de récolte (**Adinew, 2014 ; Dugoua et al., 2007 ; Bernard et al., 1989**).

- *M. spicata*

La composition qualitative des huiles essentielles des feuilles de *M. spicata* est présentée dans le tableau 3.5. Le constituant principal était le carvone (63,95%), suivi par le limonène (5,85%), l'acétate de dihydrocarvyle (4,17%), le 1,8-cineole + β -phellandrene (3,75%), le trans-thuyanol (2,74%), le cis-dihydrocarvone (1,68%), le β -caryophyllene (1,37%), le terpinene-4-OL (1,23%), le borneol (1,11%) et l'acétate de cis-Carvyle (1,07%).

Des études antérieures ont fait état d'une série de chimiotypes dans la composition de l'huile essentielle de *M. spicata*. En effet, dans le monde, il existe de grandes variations dans la composition chimique de cette plante sauvage et cultivée.

Récemment, **Brahmi et al. (2016)** ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *M. spicata* provenant de la localité de Béjaïa (Algérie) et ont signalé que le carvone (48,5%), le limonène (20,8%), le 1,8-cinéole (5,4%), le β -caryophyllène (3,4%) et le

germacrène D (3,4%) et le β -pinène (1,1%) sont les principaux composants de cette huile essentielle. **Allali et al. (2013)** ont noté que le carvone (48,42%), l'eucalyptol (17,6%) et l'acétate de néo-iso-hydrocarveol (11,7%) sont les principaux composants de l'huile essentielle de cette plante récoltée à Saida (région nord-ouest de l'Algérie). Alors que celle collectée à Amoucha (la localité de Setif, nord-est de l'Algérie) comprenait du carvone (59,40%) suivie de limonène (6,12%), de germacrène-D (4,66%), de 1,8-cinéol (3,8%), de la β -caryophyllène (2,969%), de β -bourbonène (2,796%), de l' α -terpinéol (1,986%) et du terpinène-4-ol (1,120%) dans ses huiles (**Boukhebt et al., 2011**). Le carvone est l'un des principaux constituants de l'huile essentielle de *M. spicata* cultivée dans d'autres pays tel que le Portugal (41,1%) (**Martins et al., 2012**), le Maroc (29,0%) (**Znini et al., 2011**), le Bangladesh (73,29 %) (**Chowdhury et al., 2007**) et la Serbie (49,52%) (**Soković et al., 2007**).

En ce qui concerne le carvone, nos résultats sont en accord avec ceux qui précèdent. Par contre, pour **Dhifi et al. (2013)** les constituants majeurs de *M. spicata* récoltée en Tunisie en étaient le menthone (32,7%) et le pulegone (26,6%). En Turquie pour **Telic et al. (2004)**, le constituant majeur était le Linalol (82,8%).

La différence entre les pourcentages des constituants peut être attribuée à des raisons génétiques, saisonnières et géographiques (**Martins et al., 2012**). Les variations de la composition chimique des huiles essentielles par rapport à la saison pourraient être dues à l'influence du statut phénologique et les conditions environnementales qui influencent la régulation de la biosynthèse des huiles essentielles. Des recherches précédentes ont démontré que la saison de récolte peut modifier la composition chimique des huiles essentielles de *M. spicata* (**Hussain et al., 2010b**). L'écotype, la phénophase, la température, l'humidité relative, la photopériode, l'éclairement, le génotype et les conditions agronomiques (plantation, temps de récolte et densité des cultures) peuvent également être impliqués dans cette différence de composition (**Snoussi et al., 2015**). En outre, la durée de l'ensoleillement, le mouvement de l'air et les précipitations peuvent jouer un rôle (**Boukhebt et al., 2011**).

1-3 Activité Antioxydante

L'activité anti-oxydante a été évaluée par la mesure du pouvoir réducteur et la capacité de piégeage du radical libre DPPH. Les différents tests ont été menés avec des standards et les huiles essentielles à différentes concentrations. Les EC₅₀ et les IC₅₀ calculées sont rapportées dans le tableau 3.6. Pour le test du pouvoir réducteur, une faible EC₅₀ correspond à une forte capacité réductrice (**Chang et al., 2007**). De même, dans les tests aux DPPH un faible IC₅₀ indique une meilleure capacité scavenger des radicaux libres (**Lim et Tee, 2007**).

Tableau 11: Résultats de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles et des molécules de référence.

Echantillon	Pouvoir réducteur (EC ₅₀) µg/ml			DPPH (IC ₅₀) µg/ml		
	Moy ± SD	différence		Moy ± SD	différence	
Quer	21,22 ± 1,66	<i>M. s</i> - <i>C. a</i> **	Vit C - <i>M. s</i> ***	12,02 ± 1,3	<i>C. a</i> - AG ***	Quer - <i>C. a</i> ***
AG	-			5,39 ± 0,41	<i>M. s</i> - AG **	VitC - <i>C. a</i> ***
Vit C	13,98 ± 1,99	Quer - <i>C. a</i> ***	Vit C - Quer **	6,19 ± 0,97	Quer - AG	Quer - <i>M. s</i>
HE <i>C. a</i>	7,85 ± 1,12	Vit C - <i>C. a</i> **		32,03 ± 4,87	VitC - AG	VitC - <i>M. s</i> **
HE <i>M. s</i>	2,28 ± 0,68	Quer - <i>M. s</i> ***		21,19 ± 7,17	<i>M. s</i> - <i>C. a</i> *	VitC - Quer

Dans chaque colonne, la différence avec "***" indique des différences significatives à P < 0,001, "**" indique des différences significatives à P < 0,01, "*" indique des différences significatives à P < 0,05.

Moy ± SD : moyenne ± écart type

Quer : Quercétine, AG : Acide gallique, Vit C : Vitamine C (Acide ascorbique), HE *C. a* : Huile essentielle *C. aromaticum*, HE *M. s* : Huile essentielle *M. spicata*

1-3-1 Pouvoir réducteur

Cette méthode est basée sur la réduction de l'ion ferrique Fe³⁺ de complexe ferricyanure à l'ion ferreux (Fe²⁺) par la donation d'un électron de l'antioxydant. Cette réaction se traduit par la formation du bleu de Prusse qui sera mesuré à une longueur d'onde de 700 nm (Bajpai et al., 2013).

Le pouvoir réducteur de l'huile essentielle de *Mentha spicata* est nettement supérieur à celui de *Cinnamomun aromaticum*. Ces deux huiles essentielles ont même exhibé un pouvoir réducteur plus élevé que ceux des standards. L'acide ascorbique a montré un fort potentiel réducteur par rapport à la quercétine.

Les deux échantillons testés ont été capables de réduire les ions ferriques (Fe³⁺) aux ions ferreux correspondants (Fe²⁺).

▪ *C. aromaticum*

La valeur de l'EC₅₀ de l'huile essentielle a été de 7,85 ± 1,12 µg/mL. Il est difficile de comparer les résultats du pouvoir réducteur de *C. aromaticum* avec ceux d'autres études, vu le peu des travaux consacrés à son huile essentielle ou ses extraits alcooliques.

▪ *M. spicata*

La valeur de l'EC₅₀ de l'huile essentielle de la menthe a été de 2,28 ± 0,68 µg/mL comparativement à 21,22 ± 1,66 µg/mL et 13,98 ± 1,99 µg/mL pour les standards, la quercétine et l'acide ascorbique respectivement. Notre résultat est pratiquement superposable à celui de Snouci et al. (2015), se rapportant à l'huile essentielle de *M. spicata* provenant du nord-est de la Tunisie qui était de 2.49 ± 0,07 µg/ml. Cependant, il est de loin meilleur que

celui de **Brahmi et al. (2016)** pour lesquels l'EC₅₀ de l'huile essentielle de *M. spicata* récoltée du nord de l'Algérie a été de 452.3 ± 0.4 µg/ml.

I-3-2 Activité anti-radicalaire (DPPH)

Le DPPH a été largement utilisé pour l'évaluation de l'activité de piégeage de radicaux libres d'extraits végétaux, de produits alimentaires ou de composés isolés (**Lo Scalzo, 2008**). Il a été établi que le blanchiment de la solution de DPPH augmentait régulièrement avec la quantité croissante de polyphénols (**Lim et Tee, 2007**).

Le test de DPPH mesure la capacité de l'extrait à donner de l'hydrogène au radical DPPH, aboutissant au blanchiment de la solution de DPPH. Plus l'action de blanchiment est élevée, plus l'activité anti-oxydante est élevée, ce qui se traduit par une IC₅₀ basse (**Lim et Tee, 2007**).

Les valeurs d'IC₅₀ (tableau 11) étaient dans l'ordre croissant: acide gallique, acide ascorbique, quercetine, HE de *M. spicata*, HE de *C. aromaticum*.

HE de *M. spicata* a montré une meilleure activité scavenger sur le radical DPPH que celle de *C. aromaticum*.

▪ *C. aromaticum*

Plusieurs études antérieures ont porté essentiellement sur les propriétés anti-oxydantes des extraits alcooliques des différentes parties de cette plante mais non sur ses huiles essentielles, (**Zaidi et al., 2015 ; Rao et Gan, 2014**). Des IC₅₀ élevées ont été rapportées par **Yang et al. (2012)** pour les différentes parties du cannellier variant de 72 µg/ml à 208 µg/ml. Cependant, un certain nombre d'études a été réalisée sur d'autres variétés de cannelle et qui ont montré des concentrations faibles à celle mentionnée par **Brodowska et al. (2016)** avec une valeur de 0,147 µg/ml pour *Cinnamomum verum*.

▪ *M. spicata*

L'IC₅₀ obtenue dans notre étude est supérieure à celles citées par **Snoussi et al. (2015)** avec une valeur de $3,08 \pm 0,07$ µg /ml, **Hussain et al. (2010a)** avec $13,3 \pm 0,6$ µg/ml, et **Dhifi et al. (2013)** avec $10 \pm 0,24$ µg /ml. Mais beaucoup plus bas que ceux enregistrés par **Brahmi et al. (2016)**, **Moldovan et al. (2014)**, **Allali et al. (2013)**, **Soni et Sosa (2013)**, **Ebrahimzadeh et al. (2010)** et **Nickavar et al. (2008)** avec $9544,6 \pm 0,196$ µg/ml, $151,05 \pm 1,95$ µg/mL, 10620 µg/ml, 170 µg/ml, $105,8 \pm 3,98$ µg/ml et 87,89 µg/ml, respectivement.

Cette intéressante activité biologique pourrait s'expliquer par la présence dans l'huile essentielle de *M. spicata* des monoterpènes : limonène, terpinolène, γ-terpinène, 1,8-cineol et carvone (**Snoussi et al., 2015**).

2- Miel

2-1 Origine botanique

« Traditionnellement, l’origine botanique du miel a été et est déterminée dans de nombreux laboratoires par l’analyse du pollen, une méthode qui s’appelle melissopalynologie. La méthode méliissopalynologique, élaborée et proposée en 1970 par la Commission internationale pour la botanique des abeilles et révisée et mise à jour en 1978, est fréquemment utilisée jusqu’à présent. En outre, dans la directive du Conseil de l’UE (2002) relative au miel, il est indiqué que les noms de produits peuvent être complétés par des informations se rapportant à l’origine florale ou végétale, si le produit provient entièrement ou principalement de la source indiquée et possède les caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques et microscopiques de cette source » (Aissat et Benbarek, 2014).

Notre but par la présente analyse est surtout de montrer que les miels utilisés sont non falsifiés et conformes aux normes internationales.

2-2 Analyse pollinique

Les résultats de l’analyse pollinique du miel en fonction de la fréquence d’identification des grains de pollens, sont présentés dans le tableau 12

La densité relative est exprimée par le quotient en pourcentage de la densité absolue d’un type de pollen sur la somme des densités absolues de tous les types de pollen du dit échantillon. Elle est calculée pour chaque échantillon de miel qui compte au moins 1200 grains de pollens. L’appréciation est faite suivant la méthode d’Erdtman (1969) qui distingue : les pollens dominants ($\geq 45\%$), les pollens d’accompagnement (10-40%) et les pollens isolés ($< 10\%$).

Tableau 12: Types de pollens présents dans les échantillons de miels.

Variété de miel	Densité	Pollens dominants	Pollens d’accompagnement (de 10 à 40 %)	Pollens isolés (<10%)
Miel 1	Forte	<i>Eucalyptus</i> (75%)	-	<i>Acacia, Brassicacées, Ericacée, Malvacées, Cistacée, Lamiacées, Astéracées type Pissenlit, Trèfle, Rosacées, Apiacées, Ronces, Astéracées</i>
Miel 2	Moyenne	<i>Apiacées</i> (42%)	<i>Cistacée</i> (16%), <i>Astéracées</i> (22%)	<i>Chénopodiacées, Plantain, Poacées, Fabacée, Ronces, Myrthacées, Rosacées, Brassicacées</i>
Miel 3	Moyenne	<i>Carotte sauvage</i> (74%)	<i>Myrthacées</i> (12%)	<i>Acacia, Chénopodiacées, Cistacée, Plantain, Poacées, Renoncule, Trèfle, Astéracées, Brassicacées, Rosacées, Ronces, Apiacées</i>

Dix-huit taxons ont été identifiés dans les trois miels étudiés. La fréquence de distribution des taxons est représentée dans le Tableau 3.9, qui met en évidence deux types de miel mono-floraux, à savoir le miel d'*Eucalyptus* et le miel de carotte sauvage ainsi qu'un miel multi-floral.

En se basant sur les critères de **Zander (1950)**, un miel est classé comme étant mono-floral lorsque le pourcentage de pollen qui y est le plus abondant est de plus de 45%. Tandis que pour un pourcentage de pollen inférieur à cette valeur, le miel est classé comme étant multi-floral.

Mais ceci n'est nullement une règle absolue, il existe un certain nombre d'exception. En effet, une teneur minimale de 70% de pollen d'*Eucalyptus* est nécessaire pour classer un miel d'*Eucalyptus* comme mono-floral (**Ouchemoukh et al., 2007**).

D'après **Makhloufi et al. (2010)**, les principales plantes productrices du miel en Algérie sont *Eucalyptus* spp, *Hedysarum coronarium* et le trèfle spp. De plus *Daucus carotta* (carotte sauvage) et *Pimpinella anisum* sont des plantes mellifères importantes dans les régions situées entre l'ouest et le centre et *Echium plantagineum* dans les régions localisées entre le centre et l'est. La présence de pollen de *Papaver rhoeas* et d'espèces de *Centaurea* permet la différenciation des miels d'*Eucalyptus* algériens d'autres miels d'*Eucalyptus* produits dans la région de la Méditerranée occidentale.

2-3 Caractéristiques physico-chimiques des variétés de miels étudiés

Le tableau ci-dessous résume les valeurs physico-chimiques des trois variétés de miels étudiés. Le miel d'*Eucalyptus* avait la teneur en eau et d'HMF la plus basse alors qu'il a affiché la valeur la plus élevée pour le pH, l'acidité libre et la conductivité électrique. Au contraire, le miel multi-floral avait le pH le plus bas et les plus hautes valeurs de la teneur en eau et d'indice de saccharase; tandis que le miel de carotte sauvage avait les taux les plus faibles pour l'indice de saccharase, la conductivité électrique, l'acidité libre et la teneur en eau la plus faible. Cependant, il possédait la teneur la plus élevée en HMF.

Tableau 13: Valeurs de différentes propriétés physico-chimiques des trois variétés du miel.

Variété du miel	pH		Teneur en eau (%)		HMF mg/kg		Acidité libre (még/kg)	
	Valeur	Diff	Valeur	Diff	Valeur	Diff	Valeur	Diff
Miel 1	4,34 ± 0,14	M1-M2	15,4 ± 0,2	M1-M2	11,2 ± 1,9	M1-M2 ^{***}	26,74 ± 0,75	M1-M2 ^{***}
Miel 2	4,19 ± 0,14	M1-M3	18,0 ± 0,2	M1-M3 ^{***}	18,2 ± 1,9	M1-M3 ^{***}	21,95 ± 0,75	M1-M3 ^{***}
Miel 3	4,31 ± 0,2	M3-M2	15,4 ± 0,2	M3-M2	> 100 ± 1,9	M3-M2 ^{***}	11,8 ± 0,75	M3-M2 ^{***}
Variété du miel	Indice de saccharase		Indice diastasique (échelle de Schade)		Conductivité électrique mS/cm			
	Valeur	Diff	Valeur	Diff	Valeur	Diff		
Miel 1	16,7 ± 1,9	M1-M2	ND	M1-M2	1,1 ± 0,01	M1-M2 ^{***}		
Miel 2	20,7 ± 1,9	M1-M3	ND	M1-M3	0,81 ± 0,01	M1-M3 ^{***}		
Miel 3	3,2 ± 1,9	M3-M2 ^{***}	11,3 ± 2,8	M3-M2	0,38 ± 0,01	M3-M2 ^{***}		

Dans chaque colonne, la différence avec "***" indique des différences significatives à P < 0,001.
 ND : Non Déterminé, diff : différence, M: miel.

2-3-1 Teneur en eau

La teneur en eau basse du miel est d'une importance majeure pour sa préservation contre la fermentation causée par les levures osmo-tolérantes. De Même qu'elle protège le miel contre l'activité microbienne permettant ainsi sa conservation pour de longues périodes (Snowdon et Cliver, 1996 ; Bogdanov, 2009 ; Buba et al., 2013). Cette teneur en eau dépend de divers facteurs tels que la saison de récolte, le degré de maturité atteint dans la ruche et les facteurs climatiques (Codex Alimentarius, 2001).

Les valeurs de teneurs en eau pour nos miels étaient compris entre 15,4% et 18%, ce qui indique d'après le Codex Alimentarius (2001) un bon degré de maturité et est inférieur à la limite maximale (≤20%) autorisée par les recommandations de la Communauté Européenne (2002).

Le laboratoire belge CARI recommande une valeur ≤ 18 , ce qui est le cas pour notre valeur maximale de 18%.

La teneur en eau des échantillons analysés était élevée par rapport à celles rapportées précédemment pour certains miels algériens avec des valeurs variant de 11,59% à 14,13% (Khalil et al., 2012). Cependant, elles étaient proches de celles citées par Ouchemoukh et al. (2007) pour le miel algérien (14,64 - 19,04), Moniruzzaman et al. (2013b) pour le miel de Malaisie (14,16 - 17,53%), Gomes et al. (2010) pour le miel Portugais (15,9 - 17,2% de), Chakir et al. (2011) pour le miel marocain (14,3 - 20,2%), et Saxena et al. (2010) pour le miel Indien (de 17,2 - 21,6%).

2-3-2 Conductivité électrique

La conductivité électrique du miel est étroitement liée à sa concentration en sels minéraux, acides organiques et protéines. Elle est considérée comme étant un paramètre de grande variabilité selon l'origine florale et est l'un des meilleurs paramètres de différenciation entre le miel de fleurs ($< 0,8$ mS/cm) et celui de miellats ou mélanges de miellat et de nectar ($\geq 0,8$ mS/cm) (Commission Européenne, 2002; Terrab et al., 2004). Il y a cependant quelques exceptions à cette limite, le miel d'*Eucalyptus* étant l'une d'elles (Commission Européenne, 2002).

Une grande variation a été observée entre les échantillons analysés avec 0,38 mS/cm pour le miel de carotte sauvage, 0,81 mS/cm pour le miel multi-floral et 1,1 mS/cm pour le miel d'*Eucalyptus* (tableau 13). La valeur de 1,1 mS/cm obtenue pour le miel d'*Eucalyptus* est très proche de celle citée par Marchini et al. (2007) au Brésil et qui était de 1,0 mS/cm. De même, en Algérie Makhloufi et al. (2010) ont rapporté des taux de 0,1 à 0,90 mS/cm pour les miels d'*Eucalyptus*. Mais cette valeur élevée de la conductivité, ne concernait pas exclusivement les miels d'*Eucalyptus*, vu que certains miels multi-floraux avaient atteint des valeurs de 0,93 mS/cm. Ces mêmes auteurs, ont conclu que les miels algériens sont caractérisés par une conductivité électrique élevée. Cela pouvait être le cas d'un mélange de miel de nectar et de miellat, comme cela pourrait être le cas pour notre miel multi-floral. Cependant, nos résultats sont supérieurs à ceux précédemment rapportés par Mekious et al. (2015) et Khalil et al. (2012) avec des taux respectifs, de 0,36- 0,47 mS/cm et 0,417- 0,806 mS/cm.

L'analyse statistique des valeurs de la conductivité électrique des variétés de miels étudiées par le test HSD de Tukey montre qu'il existe une différence significative entre les trois variétés de miels.

2-3-3 pH du miel

La valeur du pH a une grande importance lors de l'extraction et de stockage du miel, car il affecte la texture, la stabilité et la durée de vie (**Khalil et al., 2012 ; Terrab et al., 2002**). **Pesenti et al. (2008)** ont rapporté un pH faible de 3,3 à 4,5 pour les miels de nectar et un pH plus élevé pour ceux de miellat. Dans la présente étude, tous les échantillons de miel étudiés étaient acides avec des valeurs très proches (pH 4,19- 4,34). Le pH des miels étant inférieur à 4,5, nous permet de conclure que nos échantillons sont tous des miels de nectar, ou avec un certain mélange avec du miellat car étant plus proche de la valeur supérieure de 4,5. Les valeurs de pH étaient similaires à celles rapportées précédemment pour d'autres miels Algériens, Marocains, Slovaques, Indiens et Portugais (pH de 3,53 à 4,72) (**Moniruzzaman et al, 2013a et b ; Kasperová et al., 2012 ; Gomes et al., 2010 ; Saxena et al., 2010 ; Ouchemoukh et al., 2007 et Naman et al., 2005**). Alors qu'elles étaient inférieures à celles mentionnées par **Mekious et al. (2015)** pour les miels steppiques algériens avec des taux variant de 4,52 à 5,17.

2-3-4 Acidité libre

De même que le pH, l'acidité est un critère important de qualité durant le processus d'extraction et de stockage, en raison de son influence sur la texture et la stabilité du miel (**Gomes et al., 2010**). L'acidité des miels est due à la présence de l'acide gluconique issu de la transformation du glucose et est favorisée par des teneurs élevées en eau (**Bogdanov et al., 2004**). Une acidité totale élevée peut signifier que le miel est fermenté (**Zerrouk et al., 2011**). Bien qu'il existe une fluctuation naturelle considérable. L'ancienne norme prescrit une valeur maximale de 40 méq/kg. Dans le projet du Codex Alimentarius, elle a été augmentée à 50 méq/kg. Les valeurs de l'acidité totale des miels analysés variaient de 11,8 à 26,74 méq /kg. Ces valeurs d'acidité libre ont été dans la fourchette normale fixée par le **Codex Alimentarius (2001)** qui est de 50 méq/kg. Cela est en faveur de l'absence de fermentations indésirables.

Des résultats plus faibles ont été signalés pour des miels steppiques algériens par **Mekious et al. (2015)** variant de 5,18 à 9,21 méq /kg. Tandis que **Amri et Ladjama (2013)** ont affiché des taux plus élevés (25,763 à 44,884 méq /kg) dans la région du nord-est de l'Algérie. Alors que **Terrab et al. (2004)** ont rapporté une acidité libre de 17,6 à 34,7 méq /kg dans les miels espagnoles.

L'analyse statistique des résultats de l'acidité libre montre qu'il existe une différence significative entre les trois variétés de miels étudiés.

2-3-5 Hydroxymethylfurfural, invertases et diastases

Une teneur en hydroxymethylfurfural (HMF) basse est largement reconnue comme un paramètre de fraîcheur de miel (**Gomes et al., 2010**). En effet l'HMF y est naturellement présent en très petites quantités car produit habituellement à température ambiante par l'action de l'acidité normale du miel sur les sucres réducteurs et le saccharose (**Morales, 2009**). C'est un produit intermédiaire de la réaction de Maillard (**Machiels et Istasse, 2002**), laquelle est une réaction entre les résidus aminés des protéines ou des acides aminés et des sucres réducteurs, et comme produit typique de dégradation des hexoses lors de la caramélisation. Les niveaux de HMF sont également influencés par plusieurs autres facteurs, tels que le pH, la température, la durée des processus de chauffage, les conditions de stockage et la source florale ; par conséquent, les niveaux HMF fournissent une indication de surchauffage et de mauvaises conditions de stockage (**Moniruzzaman et al., 2013a**).

Si dans le miel frais et non chauffé, le miel ne contient que des traces d'HMF, son taux tend à augmenter lors de chauffage et / ou le vieillissement du miel (**Makhloufi et al., 2010**). Abstraction faite du miel de carotte sauvage qui contenait un taux de HMF > 100 mg / kg, dépassant ainsi les limites maximales fixées selon les recommandations de l'Union européenne (2002) 40 mg/kg. Les deux autres miels sont conformes aux normes recommandées. En tenant compte de ce qui précède, ce miel a probablement été stocké pendant longtemps ou a subi un traitement par sur-chauffage (**Zappalà et al., 2005**). Cette dernière supposition est confortée par le fait que l'indice de saccharase (invertase) de ce miel est de 3.2 ce qui est très en deçà de l'indice minimal de 10 proposé.

L'indice de saccharase (invertase) est considéré comme meilleur indicateur de fraîcheur du miel que l'activité diastasique, en raison de sa plus grande sensibilité aux traitements thermiques. Cependant, malgré ce fait, contrairement à l'indice diastasique, l'indice de saccharase n'est pas actuellement inclus dans les standards internationaux de qualité du miel. Pour l'indice de saccharase, la législation européenne ne donne aucune valeur de référence. La plupart des miels de qualité avait un indice saccharase entre 5 à 20 U.kg-1 (**Oddo et al., 1999**). Ce qui est le cas pour nos échantillons 1 et 2.

Pour l'indice de diastase, la valeur minimale requise par la législation européenne est de 8 unités de Schade. Le miel de carotte sauvage avait un indice supérieur à cette valeur, tandis qu'il a été non quantifié pour les autres miels (tableau 13). En effet au CARI, lorsque l'indice d'invertase est supérieur à 10, donc très acceptable, celui des diastases n'est pas quantifié.

L'analyse statistique des valeurs de l'indice diastasique des variétés de miels étudiées montre qu'il existe une différence significative entre le miel de carotte sauvage et les deux

autres variétés de miels. Tandis qu'aucune différence significative n'est observée entre le miel d'*Eucalyptus* et le miel multi-floral. Pour la teneur en HMF, L'analyse statistique révèle qu'il existe une différence significative entre les trois variétés.

2-4 Pouvoir antioxydant

Une gamme de méthodes analytiques pour la détermination des propriétés anti-oxydantes du miel est disponible. Il est crucial que seules les méthodes validées et normalisées soient utilisées. L'utilisation de l'analyse DPPH couplée à diverses autres méthodes telles que FRAP et ORAC par exemple sont préférables parce qu'elles sont capables de refléter plus précisément les propriétés anti-oxydantes du miel (**Moniruzzaman et al., 2012**). Divers composants du miel sont à l'origine de ses propriétés anti-oxydantes, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les caroténoïdes, les produits de la réaction de Maillard, la catalase, les peroxydases et l'acide ascorbique. La quantité et la qualité de ces composants varient en fonction de l'origine botanique et géographique (**Aljadi et Yusoff, 2003; Estevinho et al., 2008**).

Les miels provenant de diverses sources montrent une forte corrélation entre leur contenu en composés phénoliques et leurs propriétés anti-oxydantes et antibactériennes (**Estevinho et al., 2008 ; Alvarez-Suarez et al., 2010**), l'analyse de la teneur en ces composés pourrait être prédictive de l'activité anti-oxydante du miel. Cependant, les différentes méthodes d'analyses diffèrent les unes des autres en termes de mécanismes de réaction, d'espèces oxydantes, des conditions de réaction et la manière dont les résultats finaux ont été exprimés (**Moniruzzaman et al., 2012**), ce qui rend la comparaison entre les différentes études assez malaisée.

Le tableau 14 résume les résultats concernant la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes, le pouvoir réducteur, la capacité de piégeage du radical libre DPPH et du radical libre ABTS des miels testés. Le miel de la carotte sauvage a montré le contenu en polyphénols et en flavonoïdes le plus élevé. Il en était de même pour le pouvoir réducteur ainsi que l'activité anti-radicalaire (DPPH). Le miel d'*Eucalyptus* a montré la valeur la plus faible. Néanmoins, ce miel possédait la valeur la plus élevée de l'activité anti-radicalaire (ABTS).

Tableau 14: Valeurs des polyphénols totaux (PT), des flavonoïdes totaux (FT), du pouvoir réducteur, et du statut antioxydant total des miels testés.

Variété du miel	PT (mg Eq AG/100g)		FT (mg Eq QE/100g)		Pouvoir réducteur (ABS _{700 nm})	
	Moy ± SD	Diff	Moy ±SD	Diff	Moy ±SD	Diff
Miel 1	67,95 ± 9,02	M1-M2	48,32 ± 4,85	M1-M2*	0,6819 ± 0,052	M1-M2
Miel 2	73,7 ± 11,51	M1-M3*	53,1 ± 4,40	M1-M3***	0,7372 ± 0,081	M1-M3
Miel 3	85,05 ± 16,73	M3-M2	60,74 ± 4,17	M3-M2***	0,771 ± 0,141	M3-M2
Variété du miel	DPPH (ABS _{517 nm})		SAT (mmolEqTrolox/L)			
	Moy ± SD	Diff	Moy ±SD	Diff		
Miel 1	50,36 ± 4,70	M1-M2	1,7637 ± 0,8596	M1-M2		
Miel 2	51,78 ± 3,18	M1-M3***	1,3678 ± 0,3369	M1-M3**		
Miel 3	57,15 ± 3,52	M3-M2**	0,9623 ± 0,2691	M3-M2		

Dans chaque colonne, la différence avec "***" indique des différences significatives à P <0,001, "**" indique des différences significatives à P <0,01, "*" indique des différences significatives à P <0,05.
Moy ± SD : moyenne ± écart type.

2-4-1 Les polyphénols totaux

Les polyphénols totaux du miel de carotte sauvage ont été supérieurs à ceux du miel multi-floral, et ceux de ce dernier, supérieurs à ceux du miel d'*Eucalyptus*. L'analyse statistique des valeurs de polyphénols totaux des trois variétés de miels montre qu'il existe une différence significative entre le miel de carotte sauvage et celui d'*Eucalyptus* (tableau 14).

Les polyphénols totaux constituent un groupe de composés important qui influencent non seulement l'apparence, mais aussi les propriétés fonctionnelles du miel (**Moniruzzaman et al; 2013b ; Cimpoiu et al; 2013**). Leur teneur est très dépendante de l'origine botanique du miel (Khalil et al; 2012). Il est généralement admis que les miels sombres ont une teneur plus élevée en polyphénols que les miels de couleur claire (**Blasa et al, 2006 ; Bertonceli et al, 2007**).

Le miel de carotte sauvage est le plus sombre de nos échantillons et sa teneur en polyphénols totaux est plus élevée que celle rapportée précédemment par **Alzahrani et al. (2012a)**. Concernant ce même miel, ayant la même origine géographique mais des dates de

récoltes différentes ($50,30 \pm 8,29$ mg Eq AG/100g). Globalement, la teneur en polyphénols totaux de tous les miels testés étaient plus élevée que celle signalée par **Khalil et al. (2012)** pour les miels algériens qui variait de $41,11 \pm 1,55$ à $49,81 \pm 1,32$ mg Eq AG/100g et les miels malaysiens cités par **Moniruzzaman et al. (2013a)** ($18,670 \pm 0,84$ à $35,273 \pm 0,81$ mg Eq AG/100g), mais inférieure à celles affichées par **Ouchemoukh et al. (2007)** et **Doukani et al. (2014)** qui variait de 64 à 1304 mg Eq AG/100g et 166,11 à 427,14 mg Eq AG/100g de miel, respectivement.

La teneur et le type des composés poly-phénoliques dépendent de l'origine florale du miel (**Küçük et al., 2007**). Plusieurs chercheurs ont constatés que le miel avec des taux élevés en polyphénols possédait des propriétés anti-oxydantes élevées. Des études récentes ont montré une forte corrélation entre la teneur en composés phénoliques des miels de différentes sources florales et leur capacité anti-oxydante (**Alzahrani et al., 2012a ; Alvarez-Suarez et al., 2010**).

2-4-2 Flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire qui affectent l'arôme et les propriétés anti-oxydantes du miel (**Khalil et al., 2012**). Dans les systèmes biologiques, les polyphénols jouent un rôle important dans l'inhibition des enzymes génératrices des radicaux. Parmi ces polyphénols, en regard de nombreux travaux, il est admis que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (**Lin et al., 2002**), par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des dérivés réactifs de l'oxygène (**Dangles et Dufour, 2006 et 2008**).

Le tableau 14 représente le contenu total des flavonoïdes des miels testés. Les flavonoïdes totaux du miel de la carotte sauvage sont supérieurs à ceux du miel multi-floral et ce dernier est supérieur au miel d'*Eucalyptus*.

L'analyse statistique des valeurs de la teneur en flavonoïdes totaux de miels montre qu'il existe une différence significative entre les trois variétés de miels étudiées.

La teneur totale en flavonoïdes de nos échantillons a été plus élevée par rapport à celles de miels algériens dans l'étude de **Khalil et al. (2012)** qui variait de 27,07 à 71,78 mg de catechine /kg.

Cependant, **Nedji et Loucif-Ayad (2014)** ont cité pour des miels du nord-est algériens des teneurs supérieures aux nôtres avec une moyenne de 68,74 mg EQ/100g ($44,56 \pm 3,88$ à $95,94 \pm 5,97$ mg EQ/100g).

Pour **Rebiai et al. (2015)**, ces teneurs étaient moindres, mais il est utile de préciser dans ce dernier cas que l'étalon utilisé était la rutine.

La différence dans la teneur totale en flavonoïdes peut être attribuée soit à l'origine botanique et/ou géographique du miel ou à la méthode et/ou la durée nécessaire du test effectué pour le dosage des flavonoïdes.

La richesse du miel en polyphénols (flavonoïdes et acides phénoliques), antioxydants naturels potentiels, fait qu'il soit l'objet d'un intérêt croissant en raison de leurs rôles potentiels contribuant à la santé humaine (**Gheldof et Engeseth, 2002; Gheldof et al., 2002; Aljadi et Kamaruddin, 2004; Beretta et al., 2005 ; Estevinho et al., 2008**).

2-4-3 Pouvoir réducteur

« De nombreuses protéines ont un rôle antioxydant puisqu'elles vont pouvoir capter, stocker et transporter des métaux de transition (albumine qui piège le cuivre, ferritine qui stocke le fer) : en séquestrant ainsi ces métaux, ces protéines préviendront par exemple la formation de radical hydroxyle (\bullet OH) par la réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$. Dans les conditions physiologiques normales, du fait de l'efficacité des systèmes de défense, ces radicaux libres n'auront pas d'effets néfastes majeurs. Toutefois, si des quantités importantes de radicaux sont générées, dépassant les possibilités de protection enzymatique et épuisant le pool de divers capteurs, ces radicaux libres sont à l'origine de grands dommages pour l'organisme. Pour cela l'intérêt métabolique des antioxydants alimentaires fait, à l'heure actuelle, l'objet d'un grand nombre de travaux » (**Hadi, 2007**).

Le pouvoir réducteur est une méthode largement utilisée pour la détermination et l'évaluation de l'activité anti-oxydante ainsi que la capacité du miel à réduire le couple $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$. Il donne une estimation directe des antioxydants ou réducteurs présents dans un échantillon (**Islam et al; 2012**). Une valeur d'absorption relativement élevée indique plus de réduction des ions ferriques en ions ferreux. La valeur d'absorbance du pouvoir réducteur des échantillons de miel variait de $0,6819 \pm 0,052$ à $0,771 \pm 0,141$. Cette valeur pour le miel de la carotte sauvage a été supérieure à celle du miel multi-floral, laquelle a été supérieure à celle du miel d'*Eucalyptus* (tableau 14).

Alzahrani et al. (2012a) ont mentionné une valeur du pouvoir réducteur de miel de carotte sauvage inférieure à $0,6386 \pm 0,05$. Des valeurs faibles ont été mentionnées pour les miels indiens (**Saxena et al., 2010**).

2-4-4 Activité anti-radicalaire (DPPH)

Le DPPH est un radical à base d'azote stable qui est largement utilisé pour tester le piègeur de radicaux libres et la capacité de diverses substances. Une forte activité de piégeage de DPPH confère des niveaux élevés d'activité anti-oxydante de l'échantillon (**Saxena et al.,**

2010). Pour évaluer le potentiel anti-radicalaire des miels, le dosage de DPPH est fréquemment utilisé parce que le potentiel antioxydant du miel a été montré pour être directement associé à son contenu en flavonoïdes phénoliques (Beretta et al., 2005).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire déterminée à l'aide du test de DPPH sont représentés dans le tableau 14. L'activité de piégeage de DPPH du miel de la carotte sauvage était supérieure à celui du miel multi-floral, lui même supérieure à celui du miel d'*Eucalyptus*. L'analyse statistique des valeurs d'activité anti-radicalaire (DPPH) des miels testés montre qu'il existe une différence significative entre le miel de la carotte sauvage et les deux autres variétés du miel étudiées.

Les valeurs de pourcentage d'inhibition des échantillons des miels étudiés varient entre $50,36 \pm 4,70$ et $57,15 \pm 3,52$ %. Saxena et al. (2010), ont affiché des pourcentages similaires d'inhibition allant de $44 \pm 0,6$ à $71 \pm 1,3$ %. Des pourcentages plus faibles ont été rapportés par Doukani et al. (2014) avec des taux de 3,42 à 22,06%.

2-4-5 Activité anti-radicalaire (ABTS)

Les résultats de l'activité anti-radicalaire déterminée à l'aide du test de ABTS sont représentés dans le tableau 14. L'activité anti-radicalaire (ABTS) constitue une méthode de mesure de l'activité anti-oxydante par opposition à un antioxydant, qui peut inclure une proportion d'antioxydants biologiquement inactifs. L'ABTS permet la mesure de l'activité anti-oxydante de mélanges de substances, et aide à distinguer entre les effets additifs et synergiques (Moniruzzaman et al., 2012). Les avantages de l'activité anti-radicalaire (ABTS) sont la simplicité, la reproductibilité, la diversité et son utilisation dans plusieurs milieux pour déterminer à la fois, la capacité anti-oxydante hydrophile et lipophile des extraits d'aliments et les liquides physiologiques (Awika et al., 2003).

Malgré que nos miels ont montré des contenus phénoliques importants, ce qui implique la présence de nombreux groupes hydroxyles capables de chélater les radicaux libres, les miels étudiés ont exercé une faible activité de piégeage contre le radical libre ABTS. Nos résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par Alzahrani et al. (2012b) et d'autres études antérieures portant sur le SAT de miel.

L'analyse statistique des valeurs d'activité anti-radicalaire (ABTS) des miels testés montre qu'il existe une différence significative entre le miel d'*Eucalyptus* et celui de la carotte sauvage.

Pour les trois miels testés, l'effet obtenu avec la méthode DPPH et le FRAP n'est pas corrélé avec celui obtenu par la méthode ABTS ; les résultats vont à l'encontre les uns des autres (ABTS Vs DPPH et FRAP). De telles différences quant à la corrélation entre les

résultats par rapport aux méthodes utilisées et notamment entre DPPH et ABTS, ont été constatées dans plusieurs études (Yu et al., 2002 ; Soares et al., 2003 ; Bayala et al., 2014). Ces variations peuvent s'expliquer par les mécanismes impliqués dans les réactions anti-oxydantes.

La solubilité des miels dans différents solvants (eau, méthanol) peut influencer sur leur effet. En effet, l'activité anti-oxydante des composés testés dépend de l'agent utilisé et sur le mécanisme d'action de l'antioxydant (Soares et al., 2003). D'autres facteurs, tels que la stéréo-sélectivité des radicaux ou la solubilité des composés dans les systèmes de tests différents peuvent aussi influencer sur la capacité de chaque miel à réagir et à réduire les différents radicaux (Yu et al., 2002). Le miel est une mixture éminemment complexe et aucun miel n'est semblable à un autre.

Troisième partie :
Etude In-vitro
De l'Activité
Antibactérienne

1- Activité antibactérienne des huiles essentielles

1-1 Détermination de la sensibilité bactérienne

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es de *Cinnamomum aromaticum* et *Mentha spicata* sur la croissance des souches bactériennes testées: *E. coli* F5, *E. coli* F17 et *E. coli* ATCC 25922 sont représentées dans le tableau 15 et la figure 15.

Tableau 15 : Halos d'inhibition en (mm) (moyenne ± écart type) provoqués par les huiles essentielles testées.

Souches	Cannelle	Menthe
<i>E. coli</i> F17	35 ± 2,65	10± 1
<i>E. coli</i> F5	29,33 ± 1,53	10,33 ± 1,15
<i>E. coli</i> ATCC 25922	26,33 ± 5,51	10,33 ± 0,58
Appréciation	Extrêmement sensible	Sensible

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

La sensibilité des bactéries aux H.Es est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose (figure 15).

Les deux huiles essentielles ont montré leur efficacité vis-à-vis des différentes souches d'*E. coli*. L'H.E de *Mentha spicata* a manifesté l'activité antibactérienne la plus faible, avec un diamètre d'inhibition de 10 ± 1 à 10,33 ± 1,15 mm. Alors que l'HE de *Cinnamomum aromaticum* a montré l'activité antibactérienne la plus élevée et ce pour les trois souches testées, avec un diamètre d'inhibition compris entre 26,33 ± 5,51 à 35 ± 2,65 mm. Ces résultats nous permettent d'apporter un jugement sur la sensibilité des souches testées vis-à-vis de ces deux huiles essentielles (**Ponce et al., 2003**).

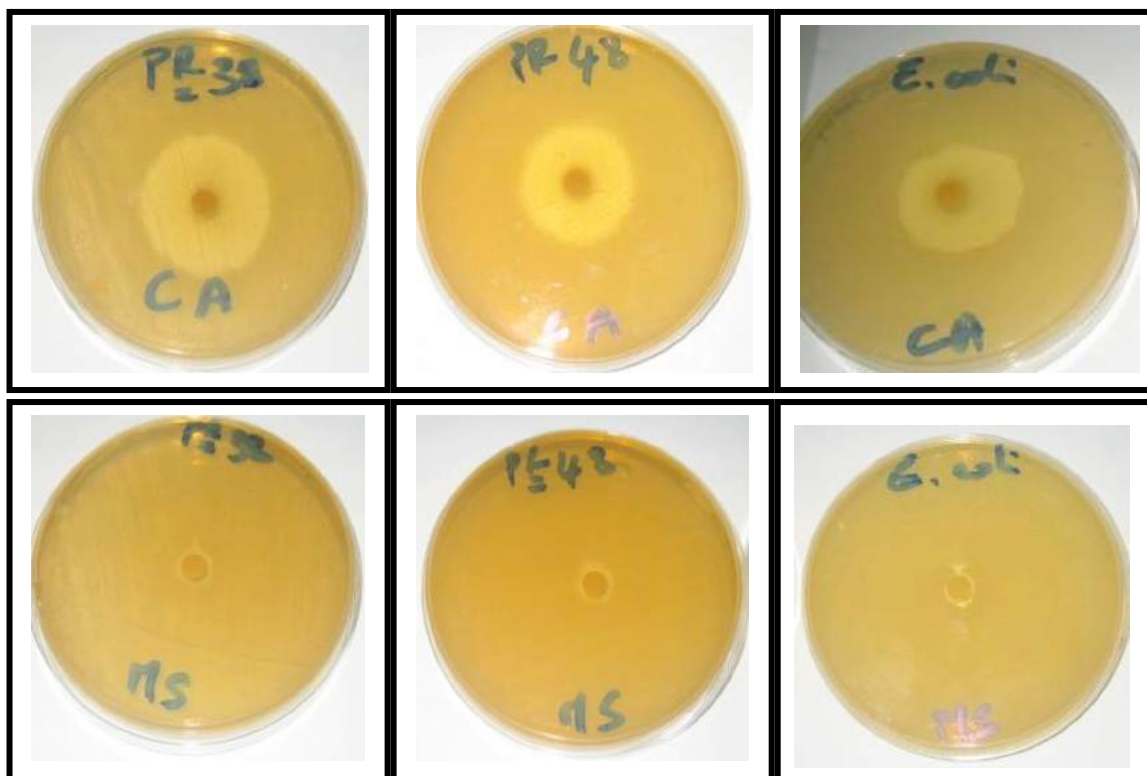


Figure 15: Effet de l'H.E de *C. aromaticum* et de *M. spicata* sur *E. coli* F5, F17 et ATCC 25922.

1-2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de la cannelle

Le tableau 16 montre les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *C. aromaticum*. Cette huile essentielle a exercé une forte activité antibactérienne. La concentration 1/1600 v/v (0.625µl.ml⁻¹) a été suffisante pour inhiber la croissance d'*Escherichia coli* F17, d'*Escherichia coli* F5, de *Kluyvera* sp. et de *Klebsiella* sp.

Tableau 16. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *C. aromaticum*

Isolat	Dilution v/v						
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Control
<i>E. coli</i> F17	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> F 5	-	-	-	-	-	+	+
<i>Kluyvera</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+

- : inhibition; +: développement.

1-3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Les huiles essentielles ont été testées par la méthode de dilution en milieu liquide (micro-dilution) sur 30 isolats cliniques de diarrhées néonatales et une souche de référence (*E. coli* ATCC 25922). Les CMI et les CMB des huiles essentielles étudiées sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) mg/ml (n =3).

Isolats	H E cannelle		H E Menthe	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E. coli</i> F5 (1)	0,17	0,67	> 9,5	> 9,5
<i>E. coli</i> F5 (2)	0,17	5,35	2,37	> 9,5
<i>E. coli</i> F5 (3)	0,17	> 10,7	4,75	> 9,5
<i>E. coli</i> F5 (4)	0,17	5,35	2,37	> 9,5
<i>E. coli</i> F5 (5)	0,17	> 10,7	2,37	> 9,5
<i>E. coli</i> F5 (6)	0,17	5,35	0,59	> 9,5
<i>E. coli</i> CS31A (1)	0,17	> 10,7	1,19	> 9,5
<i>E. coli</i> CS31A (2)	0,17	10,7	2,37	9,5
<i>E. coli</i> F17	0,17	1,34	> 9,5	> 9,5
<i>E. coli</i> sp. (1)	0,17	> 10,7	2,37	> 9,5
<i>E. coli</i> sp. (2)	0,33	2,67	2,37	> 9,5
<i>E. coli</i> sp. (3)	0,33	5,35	2,37	> 9,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,17	10,7	2,37	> 9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (1)	0,17	10,7	2,37	> 9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (2)	0,17	0,67	2,37	> 9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (3)	0,17	2,67	2,37	9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (4)	0,17	2,67	2,37	9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (5)	0,17	1,34	2,37	> 9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (6)	0,17	1,34	2,37	> 9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (7)	0,17	10	4,75	> 9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (8)	0,17	2,67	2,37	> 9,5
<i>Klebsiella</i> sp. (9)	0,17	5,35	2,37	9,5
<i>Kluyvera</i> sp. (1)	<0,17	10,7	4,75	> 9,5
<i>Kluyvera</i> sp. (2)	0,17	1,34	2,37	> 9,5
<i>Kluyvera</i> sp. (3)	0,17	10,7	4,75	> 9,5
<i>Kluyvera</i> sp. (4)	0,17	10,7	2,37	> 9,5
<i>Kluyvera</i> sp. (5)	0,17	2,67	2,37	>9,5
<i>Salmonella</i> sp. (1)	0,17	1,34	> 9,5	> 9,5
<i>Salmonella</i> sp. (2)	0,33	2,67	1,19	> 9,5
<i>Salmonella</i> sp. (3)	0,17	5,35	2,37	> 9,5
<i>Serratia</i> sp.	0,17	1,34	4,75	> 9,5

- *C. aromaticum*

L'huile essentielle de *C. aromaticum* a été la plus active par rapport à *M. spicata*, avec des CMI de 0,17mg/ml pour la quasi totalité des souches étudiées, à l'exception d'une souche de *Kluyvera* sp. avec une CMI inférieure à 0,17 mg/ml, deux souches d'*E. coli* sp. et une de *Salmonella* sp. où la CMI a été de 0,33mg/ml.

Lu et al. (2011) ont rapporté des résultats pratiquement similaires, avec des CMI comprises entre 0,1-0,4 $\mu\text{l.ml}^{-1}$. Plusieurs études ont montré que l'huile essentielle de cannelle présentait une forte activité inhibitrice contre divers agents pathogènes (**Matan et al., 2006 ; Prabuseenivasan et al., 2006**).

Huang et al. (2014) ont rapporté des valeurs de CMI d'huiles essentielles de *C. cassia* plus élevées envers deux bactéries Gram-négatives, à savoir *S. typhimurium* et *E. coli*, avec une concentration de 10 mg.ml^{-1} .

De plus, **Mith et al. (2015)** ont montré une CMI d'huiles essentielles de *C. cassia* avec 0,5/1 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ et 0,25/0,25 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ contre *E. coli O157: H7 ATCC 35150* et *E. coli O157: H7 S0575*, respectivement.

Chao et al. (2000) ont testé l'activité antimicrobienne de 45 huiles essentielles sur les bactéries, les champignons et les levures, et ont constaté que l'huile essentielle d'écorce de cannelle présentait une activité antimicrobienne à large spectre. Cette activité antibactérienne marquée était principalement due à ses constituants, parmi lesquels le cinnamaldéhyde, a été le plus actif (**Singh et al., 2007 ; Chang et al., 2001**). Le cinnamaldéhyde est un composant principal des huiles essentielles de cannelle, efficace contre certaines bactéries Gram positif et Gram négatif (**Unlu et al., 2010**). Selon **Nazzaro et al. (2013)** « le cinnamaldéhyde possède au moins trois mécanismes d'action contre les bactéries. A faible concentration, il inhibe les enzymes impliquées dans les interactions entre cytokines ou d'autres fonctions cellulaires moins importantes. A des concentrations plus élevées, il agit comme un inhibiteur de l'ATPase. A concentration létale, le cinnamaldéhyde perturbe la membrane bactérienne. Certaines études ont rapporté des informations contradictoires sur la perturbation des membranes par le cinnamaldéhyde. Par exemple, une concentration sub-létale n'affecte pas l'intégrité de la membrane d'*E. coli*, mais peut inhiber la croissance et la bioluminescence du microorganisme *Photobacterium leiognathi*; Cela suggère que le cinnamaldéhyde accède au periplasme et peut-être aussi au cytoplasme. Le cinnamaldéhyde est en effet capable de modifier le profil lipidique de la membrane cellulaire microbienne ».

- *Mentha spicata*

L'huile essentielle de *M. spicata* s'est montrée moins active que celle de *C. aromaticum*. Un isolat d'*E. coli* F5 a montré le plus de sensibilité (CMI = 0,59 mg/ml). Pour les autres isolats confondus, les CMI ont été de l'ordre de 1,19 à 4,75 mg/ml sauf pour les isolats suivants *E. coli* F5, *E. coli* F17 et une *Salmonella* qui ont eut une CMI > à 9,5 mg/ml (un isolat de chaque).

Des études antérieures ont rapporté une faible CMI allant de 0,21 à 0,349 mg/ml vis-à-vis d'*E. coli* (Hussain et al., 2010a et b). Martins et al. (2012) ont montré des valeurs de CMI allant de 250 µg/ml à 500 µg/ml contre *E. coli*, *Salmonella enteritidis* et *Klebsiella pneumonia*. La valeur la plus faible de CMI (<3,5 µg/ml) a été rapporté par Şarer et al. (2011).

Il semble que cette huile – pour les concentrations utilisées- possède un effet principalement bactériostatique puisque les CMB ont été > à 9,5 mg/ml à l'exception de quatre isolats où la CMB a été égale à 9,5 mg/ml. Des résultats comparables ont été notés par Roldan et al. (2010) contre *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157: H7, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Cependant, une CMB plus faible a été signalée par Sokovic et al. (2010) avec 3 µg/ml.

Le mécanisme de l'activité antibactérienne du carvone, principal composant de cette huile, n'est pas entièrement élucidé. Il a été démontré que le carvone agit sur les micro-organismes en croissance par : déstabilisation de la structure phospholipidique, interaction avec les enzymes membranaires et les protéines (Shahbazi, 2015), il agit comme un échangeur de protons réduisant le gradient de pH à travers la membrane (Shahbazi, 2015 ; Nazzaro et al., 2013) et il pourrait agir en perturbant l'état du métabolisme énergétique des cellules. En revanche, une autre étude a constaté que le carvone était inefficace contre la membrane externe d'*E. coli* et *S. typhimurium* et n'a pas d'incidence sur leur réserve d'ATP intracellulaire (Nazzaro et al., 2013).

2- Activité antibactérienne du miel

2-1 Détermination de la sensibilité

Par la méthode d'incorporation en gélose, les trois variétés de miels se sont avérés efficaces contre les trois souches testées, la valeur de CMI étant de 7% (v/v) sauf en ce qui concerne le miel 2 envers *E. coli CS31A* où cette CMI a été de 8% (tableau 18).

Tableau 18: Pouvoir antibactérien des miels testés à l'égard de trois souches d' *E. coli* (n = 3).

Les variétés des miels	CMI % (v/v)		
	<i>E. coli F5</i>	<i>E. coli F17</i>	<i>E. coli CS31A</i>
Miel 1	7	7	7
Miel 2	7	7	8
Miel 3	7	7	7

Miel 1 : Miel d'*Eucalyptus*, **Miel 2 :** Miel Multi-floral, **Miel 3 :** Miel de la carotte sauvage

2-2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

L'activité bactériostatique et l'activité bactéricide des trois variétés de miels Algériens ont été testées par la méthode de dilution en milieu liquide (micro-dilution) sur 30 isolats cliniques provenant de diarrhées néonatales, ainsi que sur une souche de référence (*E. coli ATCC 25922*). Les CMI et les CMB de ces miels sont énumérées dans le tableau 19. Sauf rares exceptions, à la dilution 12,5% (p/v) Les trois échantillons de miel ont pratiquement exercé la même CMI envers les isolats étudiés.

Le miel 1 a manifesté une CMI plus basse 6,25% (p/v) vis-à-vis d'un isolat de *Kluyvera spp*, tandis qu'une CMI plus élevée de l'ordre de 25% (p/v) a été affichée par les trois miels contre un isolat d'*E. coli F5*.

Pour ce qui est de l'activité bactéricide, ces miels ont exhibé une CMB >50% (p/v) vis-à-vis de la majorité des isolats étudiés. Néanmoins le miel 3 a été bactéricide à la dose de 50 % (p/v) sur deux isolats d'*E. coli F5*, deux isolats d'*E. coli sp.*, deux isolats de *Klebsiella sp.*, un isolat de *Kluyvera sp.* et un isolat de *Salmonella sp.*, de même il a été bactéricide à la concentration de 25% (p/v) sur *E. coli ATCC 25922* et un isolat de *Salmonella sp.*

Des résultats similaires pour la méthode de la micro-dilution ont été cités par **Zainol et al. (2013)** concernant le miel de Gelam à l'égard d'*E. coli* et **Sherlock et al. (2010)** pour le

miel Ulmo et Manuka contre *E. coli* ATCC 35218. **Hanna et al. (2009)** ont enregistré une CMI de 12% et de 11 à 12% avec le miel de Shain envers *E. coli* et *Salmonella typhi* et *paratyphi A et B*, respectivement.

De même **Boorn et al. (2010)** ont affiché des CMI qui variaient de 8 à 16 % (p/v) de la plupart des miels testés vis-à-vis d'*E. coli* NCTC 10538 , *Klebsiella pneumoniae* NCTC 8172et *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311.

Tan et al. (2009) ont noté des CMI pour le miel de Tualang et Manuka de 22.5% (p/v) et 17,5 % (p/v) contre *E. coli*, respectivement. Ces mêmes auteurs ont montré qu'une concentration de 15% (p/v), permet d'inhiber *Salmonella enterica* Serovar *typhi*. Alors que **Jimenez et al. (2016)** ont affiché une CMI très élevée avec une valeur de 350 mg/ml vis-à-vis *E. coli* ATCC 35218.

Tandis que **Shehu et al. (2015)** ont enregistré une CMI plus faible de l'ordre de 25 mg/ml à l'égard d'*E. coli* ATCC 85218.

La différence du pouvoir antimicrobien entre les différents miels peut être de plus de 100 fois. Cette différence est fonction de son origine géographique et botanique, de la saison de la récolte et les diverses transformations subies lors de son stockage (**Sherlock et al., 2010**).

Les composés tels que le glucose oxydase, la catalase, l'acide ascorbique, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les acides organiques, les acides aminés et les protéines ont été trouvés dans le miel et peuvent être responsables de son activité (**Bogdanov et al., 2008**).

Mais ce qui attire l'attention, en ce qui concerne le miel dans notre étude est qu'en contradiction avec ce qui est généralement admis (voir synthèse bibliographique), c'est le miel avec la teneur la plus élevée en HMF et la plus basse en invertase donc ayant probablement subi un sur-chauffage ou stocké pendant longtemps qui a globalement présenté le meilleur effet antioxydant et antibactérien. Ce taux élevé en HMF et bas en invertase reflète une réaction de Maillard. La réaction de Maillard est une source connue de composés bioactifs dans divers aliments et pour cette raison, elle pourrait également être d'un intérêt particulier dans le miel (**Brudzynski, 2012**).

Les principaux substrats de la réaction de Maillard sont les sucres réducteurs tels que le fructose et le glucose, composants majeurs du miel ainsi que les acides aminés/protéines et le groupement amine libre des acides aminés ou des protéines avec le groupement carbonyle des sucres réducteurs ou certains produits du catabolisme des lipides (ces derniers sont en très large minorité dans le miel) ce qui conduit à la formation de certains produits intermédiaires et finaux tels que les mélanoidines, le HMF, le méthylglyoxal et le glyoxal, qui sont bien

connus dans le miel comme des produits de la réaction de Maillard (**Fayle et Gerrard, 2002; bogdanov, 2008 ; Brudzinsky et Miotto 2011a et b**).

Le méthylglyoxal, composant dominant du fameux miel de Manuka et tenant une très large part dans l'activité antibactérienne est un produit intermédiaire de la réaction de Maillard (**Mavric et al., 2008; Adams et al., 2008**). L'activité antibactérienne du méthylglyoxal est probablement due à son activité pro-oxydante à l'origine de la génération de radicaux libres (**Yim et al., 2001; Kalapos, 2008**), ces radicaux libres peuvent entraîner des effets délétères pour les cellules (**Majtan, 2011**).

Les polyphénols sont capables d'influencer le niveau de l'activité anti-oxydante du miel ainsi que la taille des polymères de mélanoidines dans le miel. Le traitement thermique du miel ou son stockage prolongé accélère l'incorporation des complexes de polyphénol-proteine dans les mélanoidines, ce qui augmente leur capacité anti-oxydante. Les produits intermédiaires et finaux de la réaction de Maillard sont donc à l'origine d'une dualité fonctionnelle dépendant de l'équilibre entre les activités anti-oxydantes et pro-oxydantes (**Brudzinsky, 2012**). Ce statut antioxydant des mélanoidines semble paradoxalement important pour le potentiel antibactérien du miel. Il est bien connu que les ions métalliques sont cruciaux pour la croissance et la survie bactérienne. Leur chélation par les mélanoidines est l'un des mécanismes proposés pour l'activité antibactérienne du miel (**Rufián-Henares et De la Cueva, 2009**).

Tableau 19: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) des différentes variétés de miels testées exprimée en %(p/v) (n =3)

Isolats	Miel 1		Miel 2		Miel 3	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>E. coli</i> F5 (1)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>E. coli</i> F5 (2)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>E. coli</i> F5 (3)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>E. coli</i> F5 (4)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	50
<i>E. coli</i> F5 (5)	12,5	>50	12,5	>50	25	50
<i>E. coli</i> F5 (6)	25	>50	25	>50	25	50
<i>E. coli</i> CS31A (1)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>E. coli</i> CS31A (2)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>E. coli</i> F17	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>E. coli</i> sp. (1)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	50
<i>E. coli</i> sp. (2)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	50
<i>E. coli</i> sp. (3)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,5	>50	12,5	>50	12,5	25
<i>Klebsiella</i> sp. (1)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Klebsiella</i> sp. (2)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Klebsiella</i> sp. (3)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Klebsiella</i> sp. (4)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Klebsiella</i> sp. (5)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Klebsiella</i> sp. (6)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Klebsiella</i> sp. (7)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	50
<i>Klebsiella</i> sp. (8)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Klebsiella</i> sp. (9)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	50
<i>Kluyvera</i> sp. (1)	6,25	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Kluyvera</i> sp. (2)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Kluyvera</i> sp. (3)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	50
<i>Kluyvera</i> sp. (4)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Kluyvera</i> sp. (5)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Salmonella</i> sp. (1)	12,5	>50	12,5	>50	25	50
<i>Salmonella</i> sp. (2)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	25
<i>Salmonella</i> sp. (3)	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50
<i>Serratia</i> sp.	12,5	>50	12,5	>50	12,5	>50

Conclusion

Notre étude nous a permis de contribuer à établir un état des lieux concernant un certain nombre de données en matière des diarrhées néonatales bovines, et de proposer quelques moyens naturels pour les contrôler.

La fréquence d'isolement la plus élevée, quant aux agents étiologiques ciblés a concerné *E. coli*, suivie par *Klebsella*, *Kluyvera* et *Salmonella*. Parmi les souches d'*E. coli* isolées, les frimbiae F5, F17 ont été les plus identifiées et à moindre degré CS31A. Ces frimbiae ont été détectés par séro-agglutination.

La deuxième tranche d'âge a été caractérisée par la fréquence d'infection la plus élevée. De plus, les mâles ont été plus infectés que les femelles. Malgré cela, aucune différence significative n'a été observée entre les tranches d'âge et le sexe.

Une résistance élevée des souches étudiées à l'égard des antibiotiques fréquemment utilisés sur le terrain à savoir amoxicilline +acide clavulinique, ampicilline, tétracycline et trimethoprime/Sulfaméthoxazole a été noté.

Sur le plan séro-coprologie, *Cryptosporidium* qu'il soit seul ou en association s'est affiché en tête de liste des agents diarrhéiques, suivi par l' *E. coli* K99, le *Coronavirus* et enfin le *Rotavirus*.

En conformité avec d'autres études, la présente étude a révélé que les principaux composants des huiles essentielles de *M. spicata* et *C. aromaticum* étaient le carvone et le cinnamaldehyde.

L'activité antioxydante des huiles essentielles, la plus élevée a été attribuée à l'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum* par rapport à celle de *Mentha spicata*.

De même pour l'activité antibactérienne, *C. aromaticum* a été la plus active en comparaison avec celle *M. spicata* qui a montré une activité antibactérienne modérée à faible.

Notre étude, a également porté sur les propriétés physico-chimiques, les effets antioxydants et les activités antibactériennes de trois échantillons de miels provenant de trois régions différentes de l'Algérie.

Comme pré-requis à toute étude, nos échantillons de miels ont été confirmés conformes aux normes requises (Directive CE 2001/110) avec des différences significatives pour le pH, l'indice de diastases et d'invertases, la teneur en eau et la conductivité électrique. De plus, ces miels contenaient une quantité importante de polyphénols, se situant entre $679,49 \pm 90,17$ à $850,48 \pm 167,29$ mg d'acide gallique / kg.

Pour ce qui est de l'activité anti-oxydante, les résultats étaient plus mitigés. En effet, en fonction des tests utilisés, ces miels ont exercé des activités anti-oxydantes différentes. Ainsi pour le pouvoir réducteur et pour les pouvoirs anti-radicalaires (pouvoir réducteur et DPPH), c'est le miel de la carotte sauvage qui a été le plus efficace, alors que pour le test ABTS c'est plutôt le miel d'*Eucalyptus* qui a été le plus efficace.

Nos trois échantillons de miel soient : d'*Eucalyptus*, multi-floral et de carotte sauvage se sont révélés être dotés d'une puissante activité antibactérienne contre les bactéries à l'origine des diarrhées chez les jeunes veaux.

Ces résultats peuvent fournir une base utile concernant les effets thérapeutiques présumés du miel et des huiles essentielles pouvant appuyer leur application comme traitement alternatif. Cependant, d'autres investigations *in vivo* confortées par des essais cliniques seraient nécessaires pour justifier l'utilisation potentielle de ces miels et ces huiles essentielles comme agents thérapeutiques pour le contrôle des diarrhées néonatales des veaux.

*Références
Bibliographiques*

A

1. Abd-Elrahman A H. 2011. Colibacillosis in Newly Born Buffalo Calves and Role of Lacteol Fort in Preventing Recurrence of Calf Diarrhea. Life Science Journal, 8(4): 497- 502.
2. Abid M. 2017. Evaluation de l'activité antifongique des miels Algériens vis-à-vis deux souches de *Candida albicans*. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
3. Abraham G, Roeder P L et Zewdu R. 1992. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. Tropical Animal Health production, 24: 74-80.
4. Abrahamsen M S. 1998. Bovine T cell responses to *Cryptosporidium parvum* infection. International Journal for Parasitology, 28 : 1082-8.
5. Achá S J, Kuhn I, Jonsson P, Mbazima G, Katouli M et Mollby R S. 2004. Studies on calf diarrhoea in Mozambique: prevalence of bacterial pathogens. Acta Vet Scand, 45:27–36.
6. Adams C J, Boulton C H, Deadman B J, Farr J M, Grainger M N C, Manley-Harris M, et al. 2008. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. Carbohydr Res, 343 : 651–659.
7. Adebolu T. 2005. Effect of natural honey on local isolates of diarrheacausing bacteria in southwestern Nigeria. Afr J Biotechnol, 4:1172–1174.
8. Adinew B. 2014. GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from Cinnamon bark growing in South-west of Ethiopia. Int J Herbal Med, 1: 22-31.
9. AFNOR. 1986. Association Française de Normalisation, “Huiles essentielles”, Paris. NF T 75-006.
10. AFNOR. 2000. Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
11. Aissat S et Benbarek H. 2014. Importance of botanical origin of honey. In Honey in Traditional and Modern. Chap 5. CRC PressTaylor & Francis Boca Raton, FL 33487-2742.
12. Aissat S, Benbarek H, Franck T, Deby-Dupont G, Serteyn D et Mouithys-Mickalad A. 2015. Effect of Honey on Hydroxyl Radical Generation, Glutathione Depletion And on Myeloperoxidase Released in the Extra-Cellular Milieu by Activated Neutrophils. Global Veterinaria, 15 (1): 72-81, 2015.
13. Ak T et Gulçin I. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chemico-Biological Interactions, 174: 27–37.
14. Akam A, Bouyoucef A, Rahal Kh, Lafri M, Kaidi R, Khelef D et Chirilă F. 2007. Fréquences d'isolement et antibiorésistances des souches d'*Escherichia coli* F5+ isolées chez les veaux de la Mitidja (Algérie). Bulletin USAMV-CN, 64(1-2) :20-25.

15. Akam A, Khelef D, Kaidi R, Rahal KH, Tali-Maamar H, Yabrir B, Laoun A, Mostfaoui A, Boutaiba S et Cozma V. 2011. The Frequency of the Shedding of *Cryptosporidium parvum*, F5 *Escherichia coli*, Rotavirus, Coronavirus and *Salmonella* spp. in Young Dairy Calves in Mitidja Area (Algeria). *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 68(2): 16-25.
16. Al-Waili N S, Salom K, Butler G et Al Ghamdi A A. 2011. Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control *J Med Food*, 14 (10): 1079–1096.
17. Al-Waili N S. 2003. *J Med Food*, 6 (2003) 135
18. Al-Waili N, Akmal M, Al-Waili F, Saloom K, Ali A .2005. The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. *Med Sci Monit* 11:433–438.
19. Al-Waili N. 2004. Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J Med Food*, 7:210–222.
20. Albin C. 2002. Entérite diarrhéiques du veau charolais etude de la diversité des tableaux hydro-électrolytiques et acido-basiques. Thèse, Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, Tou3-4149.
21. Alfieri A A, Parazzi ME, Takiuchi E, Medici KC et Alfieri AF. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop Anim Health Prod*, 38: 521-526.
22. Ali S S, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A et Bora U. 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41: 1-15.
23. Aljadi A M et Kamaruddin M Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85 : 513– 518.
24. Aljadi A M et Yusoff K M. 2003. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medicine and Sciences*, 33 : 229–236.
25. Allali H, Chikhi I, Dib M E, Muselli A, Fekih N, Meliani N, Kamal M A, Tabti B et Costa J. 2013. Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and hydro-distillation. *Nat Prod I J*, 9(6) : 258–263.
26. Allen K L, Molan P C et Reid G M. 1991. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J Pharm Pharmacol*, 43:817–822.
27. Allen K, Hutchinson G et Molan P .2000. The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. In: *First world healing congress*, Melbourne.
28. Altindis M, Arikan Y, Cetinkaya Z, Polat C, Yilmaz S, Akbulut G, Dilek ON et Gokce O. 2004. Octenidine hydrochloride in hydatid disease. *J Invest Surg*, 17:41-44.

29. Alvarez-Suarez J M, Tulipani S, Díaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F, Damiani E, Astolfi P, Bompadre S et Battino M. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2490-2499.
30. Alzahrani H A, Alsabehi R, Boukraâ L, Abdellah F, Bellik Y et Bakhotmah B A. 2012a. Antibacterial and Antioxidant Potency of Floral Honeys from Different Botanical and Geographical Origins. *Molecules*, 17: 10540-10549.
31. Alzahrani HA, Boukraâ L, Bellik Y, Abdellah F, Bakhotmah BA, Kolayli S et Sahin H. 2012b. Evaluation of the Antioxidant Activity of Three Varieties of Honey from Different Botanical and Geographical Origins. *Global Journal of Health Science*, 4 (6): 191-196.
32. Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A et Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M et Chaouch A. 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, 14: 141-148.
33. Ansari ARMIH, Rahman MM, Islam MZ, Das BC, Habib A, Belal SMSH et Islam K. 2014. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* and salmonella isolated from diarrheic calves. *J Anim Health Prod*, 2 (1): 12 – 15.
34. Anton R et Lobstein A. 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522p.
35. Arslan O M, Gicik Y, Erdogan M H et Sari B. 2001. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. Oocysts in diarrhoic calves in Kars province. *Turkey J Vet Anim Sci*, 25: 161-164.
36. Arvouet-Grand, A. Vennat, B. Pourrat, A. and Legret, P. 1994. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 49: 462-468.
37. Asadi-Pooya A, Pnjehshahin M et Beheshti S. 2003. The antimycobacterial effect of honey: an in vitro study. *Riv Biol*, 96: 491–495.
38. Assie, Descottes B. 2004. Le miel comme agent cicatrisant. Thèse d'exercice : Médecine. Toulouse : Toulouse III
39. Astani A, Reichling J et Schnitzler P. 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid Based Complement Alternat Med*, ID 253643.
40. Athanassious R, Marsolais G, Assaf R, Dea S, Descoteaux J P, Dulude S et Montpetit C. 1994. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: Evaluation of three diagnostic methods. *Can Vet J*, 35: 163-169.

41. Aurongzeb M et Azim M K. 2011. Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature Pak. J. Biochem. Mol. Biol, 44(3): 118-124
42. Avlessi F, Alitonou G A, Djenontin T S, Tchobo F, Yèhouénu B, Menut C et Sohounhloué D. 2012. Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. ISCA Journal of Biological Sciences, 1(3): 7-13.
43. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL et Cisneros-Zevallos L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*sorghum bicolor*) and sorghum products. J Agric Food Chem, 51: 6657-6662.

B

44. Bajpai V K, Sharma A, Kim S H et Baek K H. 2013. Phenolic content and antioxidant capacity of essential oil obtained from sawdust of *Chamaecyparis obtusa* by microwave-assisted hydrodistillation. Food Technol Biotechnol, 51:360–369.
45. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D et Idaomar M M. 2008. Biological effects of essential oils- a review. Food Chem Toxicol, 46: 446-475.
46. Balas F. 2015. Les propriétés thérapeutiques du miel et leurs domaines d'application en médecine générale : revue de la littérature. Thèse Pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en médecine, Université de Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine de Nice.
47. Baratta M T, Dorman H J D et Deans S G. 1998. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. J Essential Oil Res, 10: 618-627.
48. Barrington G M, Gay J M et Evermann J F. 2002. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice ,18(1) : 7-34.
49. Bartels C J M, Holzhauer M, Jorritsma R, Swart W A J M et Lam T J G M. 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. Prev Vet Med, 93 : 162–169.
50. Bey-Ould Si Said Z. 2014. Activités biologiques des huiles essentielles des feuilles et du fruit d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Thèse pour l'obtention du diplôme de Magister En Biologie. Université Abderrahmane Mira – Bejaïa.
51. Benazzouz M A. 2011. Les huiles essentielles, importance et potentialités : Mise à jour bibliographique des dernières recherches sur leur emploi et toxicité et analyse de la composition des huiles essentielles de quinze plantes des plus consommées au Maroc. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie, Université Mohamed V,

Rabat.

52. Bendali F, Bichet H, Sanaa M et Schelcher F. 1999. Risk factors associated with diarrhea in new born calves. *Veterinary Research*.
53. Bendali F. 1998. Epidémiologie des gastro-entérites néonatales chez le veau. Thèse doctorat. Université de Franche-Comte.
54. Benjelali B, Tantaoui A et Esmaili-Alaoui M. 1986. Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 20 : 155-167.
55. Benoit A. 2004. Le miel comme agent cicatrisant. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine. Université Toulouse III – Paul Sabatier – Faculté de Médecine
56. Berchtold J. 2009. Treatment of Calf Diarrhea: Intravenous Fluid Therapy. *Vet Clin Food Anim*, 25: 73–99.
57. Beretta G, Granata P, Ferrero M, Orioli M et Maffei FR. 2005. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal Chim Acta*, 533: 185–191.
58. Bernard T, Perineau F, Delmas M et Gaset A. 1989. Extraction of essential oils by refining of plant materials. II. Processing of products in the dry state: *Illicium verum* Hooker (fruit) and *Cinnamomum zeylanicum* Nees (bark). *Flavour Fragrance J*, 4: 85-90.
59. Bertoneceli J, Dobersek U, Jamnik M et Golob T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem*, 105:822–828.
60. Björkman C, Svensson C, Christensson B et de Verdier K. 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta Vet Scand*, 44(3-4): 145-52.
61. Blaser G, Santos K, Bode U, Vetter H et Simon A. 2007. Effect of medical honey on wounds colonized or infected with MRSA. *J Wound Care*, 16 (8): 325-8.
62. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R et Gallmann P. 2008. Honey for Nutrition and Health: A Review, *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6): 677-689.
63. Bogdanov S, Ruoff K et Persano Oddo L. 2004. Physico- chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35: 4-17.
64. Bonnet J. 2014. Utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage porcin. démarche d'accompagnement dans sept élevages. Thèse, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
65. Boorn KL, Khor Y-Y, Sweetman E, Tan F, Heard TA et Hammer KA. 2010. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 108:1534–1543.
66. Bosni T, Softi D et Gruji-Vasi J. 2006. Antimicrobial activity of some essential oils and major

- constituents of essential oils. *Acta Med Bot*, 35: 9-14.
67. Boukhebti H, Chaker AN, Belhadj H, Sahli F, Ramdhani M, Laouer H et Harzallah D. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, 3 (4) : 267-275.
68. Boukrâa L et Bellik Y. 2011. Honey and microbes. In: Honey current. Research and clinical applications. Ed. J. Majtan. Nova Science Publishers, USA, pp. 61–82.
69. Boukraâ L., Sulaiman SA. 2009. Rdiscovering the antibiotics of the hive Recent Pat. *Anti infect. Drug Discov.* 4(3):206-13.
70. Boussenna S et Sfaksi A. 2009. Incidence et etiologie des diarrhées néonatales du veau nouveau-ne dans l'est algérienne, *Sciences et technologie*, 30 : 16-21.
71. Boyle W. 1955. Spices and essential oils as perspectives. *American Perfurmer Essential Oil Review*, 66: 25-28.
72. Bradford P et Smith DVM. 2008. *Large Animal Internal Medicine*. 4th edition. Mosby, 1872 p.
73. Brahmi F, Adjaoud A, Marongiu B, Falconieri D, Yalaoui-Guellal D, Madani K et Chibane M. 2016. Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata* L. leaf from Bejaia in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 28 (3): 211–220.
74. Brandão PE, Villareal LY, De Souza SL, Richtzenhain LJ et Jerez JA. 2007. Mixed infections by bovine coronavirus, rotavirus and *Cryptosporidium parvum* in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)*, 74: 33-34.
75. Brudzynski K et Miotto D. 2011b. Honey melanoidins. Analysis of a composition of the high molecular weight melanoidin fractions exhibiting radical scavenging capacity. *Food Chem*, 127 : 1023–1030.
76. Brudzynski K et Miotto, D. 2011a. The recognition of high molecular weight melanoidins as the main components responsible for radical-scavenging capacity of unheated and heat-treated Canadian honeys. *Food Chem*, 125 : 570–575
77. Brudzynski K. 2012. Honey Melanoidins: Emerging Novel Understanding on the Mechanism of Antioxidant and Antibacterial Action of Honey. In: *Honey: Current Research and Clinical Applications*. In: *Honey: Current Research and Clinical Applications*. Nova Science Publishers, Inc.
78. Bruneton J. 1999. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
79. Bruneton J. 2009. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 4th Edn., Lavoisier, Paris.
80. Buba F, Gidado A et Shugaba A. 2013. Analysis of biochemical composition of honey

samples from North-East Nigeria. *Biochem Anal Biochem*, 2 (3) : 139.

81. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*, 94: 223-253.
82. Bywter RJ. 1977. Aspects physiopathologiques des flux d'eau, du glucose et des ions dans l'intestin du veau. Journées G.T.V. le Donjon du 14 octobre 1977, *Document Beecham*, 35-39.

C

83. Carman P S et Hazlett M J. 1992. Bovine coronavirus infection in Ontario, 1990- 1991. *Can Vet J*. 33: 812-814.
84. Carmoi T, Farthouat P, Nicolas X, Debonne M et Klotz F. 2008. Kystes hydatiques du foie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) hépatologie, 1-18.
85. Centre d'Analyse Stratégique. 2012. Les bactéries résistantes aux antibiotiques. Note d'analyse n° 299.
86. Chakir A, Romane A, Marcazzan G L et Ferrazzi P. 2011. Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. *Arab J Chem*. In press
87. Chalmers RM, Smith R, Elwin K, Clifton-Hadley FA et Giles M. 2011. Epidemiology of anthroponotic and zoonotic human cryptosporidiosis in England and Wales, 2004-2006. *Epidemiol Infect*, 139 : 700-712.
88. Chan EWC, Lim YY, Wong L F, Lianto F S et Lim K K. 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem*, 109: 477-483
89. Chang HC, Huang GJ, Agrawal D C, Kuo C L, Wu C R et Tsay H S. 2007. Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as “Gusuibu”. *Botanical Studies*, 48: 397–406.
90. Chang ST, Chen PF et Chang SC. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol*, 77: 123-127.
91. Chao SC, Young DG et Oberg CJ. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res*, 12: 639-649.
92. Chardon H et Brugere H. 2014. Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes. Cahiers Sécurité Sanitaire Santé Animale ; CIV. Impression: BLG Pôle Industriel Toul Europe –54200 TOUL
93. Chen L, Mehta A, Berenbaum M, Zangeri A R et Engeseth N J. 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *J Agric Food Chem*, 48 (10) : 4997–5000.
94. Chevalley A. 2016. Utilisation de la phytothérapie et de l'aromathérapie dans le cadre du

- conseil vétérinaire chez le chat, le chien et le cheval. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. faculté de pharmacie, Université de Lorraine.
95. Chinsangaram J, Schore CE, Guterbock W, Weaver LD et Osburn BI. 1995. Prevalence of group A and group B rotaviruses in the feces of neonatal dairy calves from California. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 18(2):93–103.
 96. Cho Y L et Yoon K J. 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15(1) : 1-17.
 97. Cho Y-I, Han J-I, Wang C, Cooper V, Schwartz K, Engelken T et Yoon K-J. 2013. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 166: 375–385.
 98. Chowdhury JU, Nandi NC, Uddin M et Rahman M. 2007. Chemical constituents of essential oils from two types of spearmint (*Mentha spicata* L. and *M. cardiaca* L.) introduced in Bangladesh. *Bangl J Sci Ind Res*, 42: 79–82.
 99. Cimpoi C, Hosu A, Miclaus V et Puscas A. 2013. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochimica Acta Part A*, 100: 149–154.
 100. Clark M A. 1993. Bovine Coronavirus. *Brit Vet J*, 149 : 51-70.
 101. Clement JC, King ME, Salman MD, Wittum TE, Casper HH et Odde KG. 1995. Use of epidemiologic principles to identify risk factors associated with the development of diarrhea in calves in five beef herds. *J Am Vet Med Assoc*, 207: 1334-1338.
 102. CLSI. 2006. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, 7th Ed.*
 103. Codex Alimentarius, Alinorm 01/25. 2000. Draft Revised Standard for Honey at Step 8 of the Codex Procedure; EU Directive /1/110/2001 of 02/12/2001 (L 10/47).
 104. Codex Alimentarius. 2001. Commission Standards, Codex Standards for Honey, (1981/ revised 1987/ revised 2001), FAO– Rome. pp. 1–7.
 105. Commission Européenne. 2002. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey, *Off J Eur Communities L10*, 47–52.
 106. Constable P.D. 2009. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatments. *Vet. Clin. North Am.: Food. Anim. Pract*, 25: 101-120.
 107. Cooper R, Jenkins L, Henriques A, Duggan R et Burton N. 2002. Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. *J Clin Microbiol Infect Dis*, 29:1237–1241
 108. Cornaglia E M, Fernandez F M, Gottschalk M, Barrandegay M E, Luchelli A, Pasini M I, Suif L J, Parraud J R, Romat A et Schudel A A. 1992. Reduction in morbidity due to diarrhea

in nursing beef calves by use of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus- *Escherichia coli* vaccine in the dam. *Vet Microbiol*, 30 : 191-202.

109. Cuvillier A. 2015. Miel, Propolis, Gelée royale : Les abeilles alliées de notre système immunitaire. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. VETAGRO SUP CAMPUS, vétérinaire de Lyon.

D

110. Darbus GH, Cosoroaba I, Oprescu I et Morariu S. 2001. Epidémiologie de la cryptosporidiose chez les animaux dans l'ouest de la Roumanie. *Rev Méd Vét*, 152(5): 399-404.
111. Dash S K, Kumar K, Goel A et Bhatia A K. 2012. Detection of Corona virus antigen by ELISA from diarrhoeic cow calves in Mathura, India. *Vet World*, 2012, 5(3):166-168.
112. De La Fuente R, Garcia A, Ruiz-Santa-Quiteria J A, Luzon M, Cid D, Garcia S, Orden J A et Gomez-Bastita M. 1998. Proportionnal morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 36: 145-152.
113. De La Fuente R, Luzon M, Ruiz-Santa-Quiteria J A, Garcia A, Cid D, Orden J A, Garcia S et Gomez-Bastita M. 1999. Cryptosporidium and occult infections with other major enteropathogens in 1 to 30 day old diarrheic dairy calves in central Spain. *Vet Parasito*, 80: 179-185.
114. de Rycke J, Bernard S, Laporte J, Naciri M, Popoff M R et Rodolakis A. 1986. Prevalence of various enteropathogenes in the feces of diarrheic and healthy calves. *Ann Rech Vet*, 17 : 159-168.
115. De Verdier K, Nyman A, Greko C et Bengtsson B. 2012. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54: 2.
116. Deans S G et Ritchie G. 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol*, 5: 165-80.
117. Décret n°2003-587 du 30 juin 2003 pris pour l'application de l'article L. 214-1 du code de la consommation en ce qui concerne le miel.
118. Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
119. Deng X, Liao Q, Xu X, Yao M and Zhou Y. et al. 2014. Analysis of essential oils from cassia bark and cassia twig samples by GC-MS combined with multivariate data analysis. *Food Anal Methods*, 7: 1840-1847.

120. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R et Pandian SK. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130:107–115.
121. Dhama K., Chauhan R S, Mahendran M et Malik S V S. 2009. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun*. 33: 1–23.
122. Dhifi W, Jelali N, Mnif W, Litaïem M et Hamdi N. 2013. Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata* from Tunisia and its biological activities. *J Food Biochem*. 37 : 362–368.
123. Doukani K, Tabak S, Derriche A et Hacini Z. 2014. Etude physicochimique et phytochimique de quelques types de miels Algériens. *Revue Ecologie-Environnement* (10) : 37-49.
124. Dramane S, et al ; 2010 ; Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire ; *Euro Journal of Scientific Research* 40 (2) ; p: 307-317.
125. Drew A K et Myers S P. 1997. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. *Med J Aust*, 166: 538-541.
126. Dubourguier H C, Contrepois M et Gouet P h. 1979. Antibiorésistance des *E. coli* isolés de veaux sains et diarrhéiques. *Bull GTV*. 80, 4 bis, B, 192 : 61-69.
127. Dufrasne V. 2003. Diarrhée néonatale des veaux et réhydratation par voie orale. Thèse Doctorat Vétérinaire. ENV. Alfort.
128. Dugoua JJ, Seely D, Perri D, Cooley K, Forelli T, Mills E et Koren G. 2007. From type 2 diabetes to antioxidant activity: A systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark. *Can J Physiol Pharmacol*, 85: 837-847.

ℰ

129. Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM et Nabavi SF. 2010. Biological activities of *Mentha spicata* L. *Pharmacologyonline*, 1: 841-848.
130. El-Seedy FR, Abed AH, Yanni HA et Abd El-Rahman SAA. 2016. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. *beni-suef university journal of basic and applied sciences*, 5 : 45–51.
131. Enemark H L, Ahrens P, Lowery C J, Thamsborg S M, Enemark J M, Bille-Hansen V et Lind P. 2002. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterization. *Vet Parasitol*, 107: 37-49.
132. Erdtman G. 1969. *Handbook of Palynology*. Munksgaard, Copenhagen.

133. Estevinho L, Pereira A P, Moreira L, Luís G. Dias L G et Pereira E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey . Food and Chemical Toxicology. 46 : 3774–3779.
134. Eyob S, Martinsen B K, Tsegaye A, Appelgren M et Skrede G. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* ((Braun) P.C.M. Jansen). African Journal of Biotechnology, 7: 2585–2592.

F

135. Farouk A, Hassan T, Kashif H, Khalid S, Mutawali I et Wadi M .1988. Studies of Sudanese bee honey: Laboratory and clinical evaluation. International Journal of Crude Drug Research 3, 161-168.
136. Fassi-Fehri MM, Johnson DW, Taoudi A et Berrada J. 1988. Epidemiology of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* and rotavirus in calves and lamb in Morocco. Vet Rech Ann, 19: 59-64.
137. Fayle S E et Gerrard J A. 2002. RSC food analysis monographs: The Maillard reaction. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
138. Fedida M, Martel J.L, Pewin B, Moussa A et Courdet M. 1983. Enquêtes épidémiologiques réalisées sur les diarrhées néonatales. Rec Méd Vét, 1: 191-201.
139. Ferreira ICFR, Baptista P, Vilas-Boas M et Barros L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chemistry, 100: 1511–1516.
140. Fichou E. 2003. Enquête de terrain sur l'étiologie microbienne des diarrhées néonatales de veaux et sur la sensibilité aux anti-infectieux des colibacilles isolés. Thèse Méd. Vét., Nantes, n°92, 104p.
141. Fischer J, Rodriguez I, Schmogger S, Friese A, Roesler U, Helmuth R et Guerra B. 2013. *Salmonella enteric subsp. enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. J Antimicrob Chemother, 68 (2) : 478–480.
142. Foster DM et Smith GW. 2009. Pathophysiology of Diarrhea in Calves. Vet Clin Food Anim, 25 :13-36.
143. Fournier R et Naciri M. 2007. Prévalence des agents de diarrhée chez le jeune veau. Point Vét, 273 (38): 58-63.
144. Franchomme, Jollois et Pénéoël. 2001. L'aromathérapie exactement. dans Pierron C (2014). Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gériatologie et soins palliatifs Thèse pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie.

G

145. Gati AE. 1992. La cryptosporidiose: Diagnostic parasitologique, infections naturelles chez onze espèces animales et l'homme et étude des effets de l'immunodifférence et de l'immunostimulation expérimentales chez le lapereau. Thèse de doctorat de troisième cycle. Option parasitologie. Faculté des sciences de l'université Cadi Ayyad. Marrakech.
146. Geng S, Cui Z, Huang X, Chen Y, Xu D et Xiong P. 2011. Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. *Ind Crops Prod*, 33: 248-252.
147. George N M et Cutting K F. 2007. Antibacterial honey (Medihoney_®): in-vitro activity against clinical isolates of MRSA, VRE, and other multiresistant Gramnegative organisms including *Pseudomonas aeruginosa*. *Wounds*, 19 (9): 231-6
148. Gharbi M. 2011. Les produits de la ruche : Origines - Fonctions naturelles - Composition Propriétés thérapeutiques Api-thérapie et perspectives d'emploi en médecine vétérinaire. Thèse en vue d'obtenir le grade de Docteur Vétérinaire.
149. Gheldof N et Engeseth N J. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem*, 50: 3050-3055.
150. Gheldof N, Wang X-H et Engeseth N J. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chemistry*, 50: 5870–5877.
151. Ghosh S, Varghese V, Samajdar S, Sinha M, Kobayashi N et Naik TN. 2007. Molecular characterization of bovine group A rotavirus G3P [3] strains. *Arch. Virol*, 152:1935–1940.
152. Giordani R, Regli P, Kaloustian J et and Portugal H. 2006. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytother Res*, 20: 58-61.
153. Golparvar AR, Hadipanah A et Mehrabi AM. 2015. Diversity in chemical composition from two ecotypes of (*Mentha longifolia* L.) and (*Mentha spicata* L.) in Iran climatic conditions. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6 (4) : 26-33.
154. Gomes S, Dias LG, Moreira LL, Rodrigues P et Estevinho L. 2010. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food Chem Toxicol*, 48: 544-548.
155. Guardabassi L et Courvalin P. 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup F.M. (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press : Washington. P : 1-18.

156. Guerin-Faubleé V et Carret G. 1999. L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV- INRA, 5-12.
157. Güler L, Gündüz K et OK Ü. 2008. Virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from calves in Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 55: 249-257.
158. Guo L, Xie M Y, Yan A P, Wan Y Q et Wu Y M. 2006. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(6), 1881-1887.

H

159. Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U et Ullah MF. 2007. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Semin Cancer Biol*, 17(5):370-376.
160. Hamnes I S, Gjerde B et Robertson L. 2006. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet Parasitol*, 140 : 204- 216.
161. Hannan A, Barkaat M, Usman M, Gilani WA et Sami W. 2009. In vitro antibacterial activity of honey against clinical isolates of multi-drug resistant typhoidal salmonellae. *Pakistan J Zool*, 41(1): 1–6.
162. Herrera-Luna C, Klein D, Lapan G, Revilla- Fernandez S, Haschek B, Sommerfeld-Stur I, Moestl K et Baumgartner W. 2009. Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Veterinarni Medicina*, 54 (1) : 1–11.
163. Holland RE. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev*, 3: 345-375.
164. Hotchkiss E, Thomson S, Wells B, Innes E et Katzer F. 2015. Update on the role of cryptosporidiosis in calf diarrhoea. *Livestock*, 20 (6).
165. Hoyle D V, Davison H C, Knight H I, Yates C M, Dobay O, Gunn G J, Amyes S G B et Woolhouse M E J. 2006. Molecular characterisation of bovine faecal *Escherichia coli* shows persistence of defined ampicillin resistant strains and the presence of class 1 integrons on an organic beef farm. *Vet Microbiol*, 115, 250–257.
166. Hoyle D V, Knight H I, Shaw D J, Hillman K, Pearce M C, Low J C, Gunn G J et Woolhouse M E J. 2004a. Acquisition and epidemiology of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a cohort of newborn calves. *J Antimicrob Chemother*. 53, 867–871.
167. Hoyle D V, Shaw D J, Knight H I, Davison H C, Pearce M C, Low J C, Gunn G J et

- Woolhouse M E J. 2004b. Age-related decline in carriage of ampicillin-resistant *Escherichia coli* in young calves. *Appl Environ Microbiol.* 70, 6927–6930.
168. Hoyle D V, Yates C M, Chase-Topping M E, Turner E J, Davies S E, Low J C, Gunn G J, Woolhouse M E J et Amyes S G B. 2005. Molecular epidemiology of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains in a cohort of newborn calves. *Appl Environ Microbiol.* 71, 6680–6688.
169. Huang D F, Xu J G, Liu J X, Zhang H et Hu Q P. 2014. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. *Microbiology*, 83: 357-365.
170. Huetink R E C, van der Giessen J W B, Noordhuizen J P T M et Ploeger H W. 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Vet Parasitol*, 102 : 53-67.
171. Hussain AI, Anwar F et Shahid M. 2010a. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata L.*) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*, 22 (1): 78-84.
172. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M et Gilani AH. 2010b. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J Sci Food Agric*, 90: 1827–1836.

1

173. Ibrahim M A, Kainulainen P, Aflatuni A, Tiilikkala K et Holopainen J K. 2001. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and Phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agr Food Sci*, 10: 243-259.
174. Içen H, Arserim N B, Işık N, Özkan C et Kaya A. 2013. Prevalence of Four Enteropathogens with Immunochromatographic Rapid Test in the Feces of Diarrheic Calves in East and Southeast of Turkey. *Pak Vet J*, 33(4): 496-499.
175. ICTV (2011) the International Committee on Taxonomy of Viruses I.C.O.T.O.V. <http://www.Ictvonline.org/virus-taxonomy.asp>. version 2011
176. ICTV et King AMQ. 2012. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic press. (Immunology and microbiology 2011. ISBN 9780123846846)
177. Isidorov V A, Bagan R, Bakier S et Swiecicka I. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of Polish herb honeys. *Food. Chem*, 171: 84–88.

178. Islam A, Khalil I, Islam N, Moniruzzaman M, Mottalib A, Sulaiman SA et Gan SH. 2011. Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12: 177.
179. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T et Yankova T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 96: 145–150.
180. Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VI, Perkins NR, Gunn AA et House JK. 2011b. Prevalence of major enteric pathogens in Australia dairy calves with diarrhea, *Australian Veterinary Journal*, 89(5) : 167-173.
181. Izzo MM, Mohler VL et House JK. 2011a. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates recovered from calves with diarrhoea in Australia. *Aust Vet J*, 89:402–408.

J

182. Jenkins RE et Cooper R. 2012. Synergy between oxacillin and manuka honey sensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Antimicrob Chemother*, 67 (6): 1405-1407.
183. Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE et Gasser RB. 2008. *Cryptosporidium*-Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotech. Adv*, 26 : 304-317.
184. Jeyaratnam N, Nour A H, Kanthasamy R, Nour A H, Yuvaraj A R et Akindoyo J O. 2016. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Ind Crops Prod*, 92: 57-66.
185. Jimenez M, Beristain CI, Azuara E, Mendoza MR et Pascual LA. 2016. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. *Journal of Apicultural Research*, 55 (2) : 151–160.

K

186. Kalapos M P. 2008. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact*, 171 : 251–271.
187. Kalembe D et Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
188. Kamatou G P P et Viljoen A M. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc*, 87: 1-7.
189. Kapikian AZ et Chanock RM. 1996. Rotaviruses, p.1657-1708. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 2. Lippincott-Raven Press,

- Philadelphia, Pa.
190. Karaođlanođlu1 M, AKINCI Ö F, Ulukanligil M, Metin1 M R, Çetin H et Çay N. 2011. Hydatid cyst viability: the eff ect of scolicial agents on the scolex in the daughter cyst. *Turk J Med Sci*, 41 (6): 1001-1006
 191. Kasim NN, Ismail SNAS, Masdar ND, Ab Hamid F et Nawawi WI. 2014. Extraction and potential of cinnamon essential oil towards repellency and insecticidal activity. *Int J Scient Res Publ*, 4: 1-6.
 192. Kasperová J, Nagy J, Popelka P, Dičáková Z, Nagyová A et Mařa P. 2012. Physico-chemical indicators and identification of selected Slovak honeys based on colour measurement. *ACTA VET BRNO*, 81: 057–061.
 193. Kavanaugh N L et Ribbeck K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 78: 4057-4061.
 194. Khalef D, Saïb MZ; Akam A, Kaidi R, Chirila V; Cozma V et Adjou KT. 2007. Epidemilogie de la cryptosporidiose chez les bovins en Algérie. *Rev Méd Vét*, 158(5): 260-264.
 195. Khalil M I, Moniruzzaman M, Boukraâ L, Benhanifia M, Islam MA, Islam M N, Sulaiman S A et Gan SH. 2012. Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey. *Molecules*, 17 (9): 11199–11215.
 196. Khalil M I, Sulaiman S A et Boukraâ L. 2010. Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3 : 6-16
 197. Khamees AKS. 2015. Detection of Rota and Corona viral antigens in diarrheic newly born calves in Menofiya governorate. *Benha Veterinary Medical Journal*, 29 (1): 9-16.
 198. Kilicoglu B, Kismet K, Kilicoglu S S, Erel S, Gencay O, Sorkun K, Erdemli E, Akhan O, Akkus M A et Sayek I. 2008. Effects of honey as a scolicial agent on the hepatobiliary. system. *World J Gastroenterol*, 14(13): 2085-2088
 199. Kilicoglu B, Kismet K, Koru O, Tanyuksel M, Oruc M T, Sorkun K et Akkus M A. 2006. The scolicial effects of honey. *Advances in Therapy*, 23 (6):1077–1083
 200. Kingsley A. 2001. The use of honey in the treatment of infected wound. *Br J Nurs*, 10(22 Suppl): S13–6, S18, S20.
 201. Kofidis G, Bosabalidis A et Kokkini S. 2004. Seasonal variation of essential oils in a linalool-rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *J Essent Oil Res*, 16: 469–472.
 202. Koudela B et Jiri V. 1997. Experimental cryptosporidiosis in kids. *Vet Parasitol*, 71, 273-281.

203. Kubiça T F, Alves S H, Weiblen R et Lovato LT. 2014. In vitro inhibition of the bovine viral diarrhoea virus by the essential oil of *Ocimum basilicum* (basil) and monoterpenes. *Braz J Microbiol*, 45(1): 209–14.
204. Küçük M, Kolayh S, Karaogiu S, Ulusoy E, Baltaci C et Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem*, 100 : 526-530.
205. Kwakman P H S et Zaat S A J. 2012. Antibacterial Components of Honey. *IUBMB Life*, 64(1): 48–55.

ℒ

206. Lacroute H. 2016. Place de la colibacillose chez le jeuneveau et antibiorésistance dans l'Allier (2011-2013). *Bull. Acad. Vét. France*, Tome 169, 2 :100-109.
207. Langoni H, Linhares AC, Avila FA, Da Silva AV et Elias AO. 2004. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in Sao Paulo state, Brazil, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 41(5) : 313-319.
208. Lazaro NS, Rodrigues DL, Mendonça CL. et al. 1994. *Escherichia coli* enteropatogênica isolada de bezerros no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Med Vet*, 16 : 55-61.
209. Li YQ, Kong DX et Wu H. 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind Crops Prod*, 41: 269-278.
210. Lienard H. 2012. Intérêts, limites et toxicité des huiles essentielles en infectiologie ORL. Enquête sur la place qu'elles occupent au sein des médecines actuelles. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lille 2.
211. Lim TT et Tee JJ. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103: 1003–1008.
212. Liu XC, Cheng J, Zhao NN et Liu ZL. 2014. Insecticidal activity of essential oil of *Cinnamomum cassia* and its main constituent, trans-Cinnamaldehyde, against the booklice, *Liposcelis bostrychophila*. *Trop J Pharmaceut Res*, 13: 1697-1702.
213. Lo Scalzo R. 2008. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chemistry*, 107:40-43.
214. Lorino T, Daudin JJ, Robin S et Sanaa M. 2005. Factors associated with time to neonatal diarrhoea in French beef calves; *Preventive Veterinary Medicine*, 68: 91-102.
215. Lu F, Ding Y C, Ye X Q et Ding Y T. 2011. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. *Agric Sci China*, 10: 1482-1487.

M

216. Maclachlan N J, Dubovi E J et Fenner F. 2011. Fenner's veterinary virology. 4TH. ED. Amsterdam; Boston: Elsevier/ap. ISBN 9780123751584.
217. Maes P. Étiologie des diarrhées néonatales et transfert colostral chez le veau : enquête dans la Creuse. *Thèse Méd. Vét. Alfort*. 2010, 139p.
218. Maestri D M, Nepote V, Lamarque A L et Zygadlo J A. 2006. Natural products as antioxidants. In *Phytochemistry: Advances in Research*; Imperato, F., Ed.; Research Signopost: Kerala, India, pp. 105-135.
219. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice L B, Stelling J, Struelens M J, Vatopoulos A, Weber JT et Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18: 268–281.
220. Majtan J, Bohova J, Garcia-Villalba R, Tomas-Barberan FA, Madakova Z, Majtan T, Majtan V et Klaudiny J. 2013. Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing. *Arch Dermatol Res*, 305: 619–27.
221. Majtan J. 2014. Honey: An immunomodulator in wound healing. *Wound Rep Reg*, 22 : 187–192.
222. Makhloufi C, Kerkvliet JD, D'albore GR, Choukri A et Samar R. 2010. Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods. *Apidologie*, 41: 509–521.
223. Marsolais G, Assaf R, Monpetit C et Marois P. 1978. Diagnosis of viral agents associated with neonatal calf diarrhea. *Can J Comp Med*, 42: 168-171.
224. Martella V, Banyai K, Matthijnsens J, Buonavoglia C et Ciarlet M. 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol*, 140: 246–255.
225. Martins MR, Tinoco MT, Almeida AS et Cruz-Morais J. 2012. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from Portuguese flora. *J Pharmacogn*, 3: 39–44.
226. Matan N, Rimkeeree H, Mawson A J, Chompreeda P, Haruthaithanasan V et Parker M. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol*, 107: 180-185.
227. Mau J L, Chao G R et Wu K T. 2001. Antioxidant properties of methanolic extracts from several mushrooms. *J Agric Food Chem*, 49(11): 5461–5467.
228. Mavric E, Wittmann S, Barth G et Henle T. 2008. Identification and quantification of

- methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Molecular nutrition & food research*, 52(4): 483-489.
229. Mavric E, Wittmann S, Barth G et Henle T. 2008. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr. Fd. Res*, **52**: 483-489.
230. Mayameei A, Mohammadi G, Yavari S, Afshari E et Omid A. 2010. Evaluation of relationship between Rotavirus and Coronavirus infections with calf diarrhea by capture ELISA. *Comp Clin Pathol*, 19: 553-557.
231. Mayer F . 2012. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite. Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Faculte de pharmacie. Université de Lorraine.
232. Mekious S, Houmani Z, Bruneau E, Carine Masseaux C, Guillet A et Hance T. 2015. Caractérisation des miels produits dans la région steppique de Djelfa en Algérie. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 19(3): 221-231.
233. Mercado E C, Rodríguez S M, D'Antuono A L, Cipolla A L, Elizondo A M, Rossetti CA, Malen R et Méndez MA. 2003. Occurrence and Characteristics of CS31A Antigen-Producing *Escherichia coli* in Calves with Diarrhoea and Septicaemia in Argentina. *J Vet Med*, B 50: 8–13.
234. Miguel G, Simoes M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG et Carvalho L. 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphorates* and *Thymus mastichina*. *Food Chem*, 86:183-188.
235. Millemann Y et Maillard R. 2007. Les agents entéropathogènes du veau. *Point Vét*, 38: 53-60
236. Millemann Y. 2009. Diagnosis of neonatal calf diarrhea. *Revue Méd Vét*, 160 (8-9) : 404-409.
237. Mith, H, Dure R, Delcenserie V, Zhiri A, Daube G et Clinquart A. 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci Nutr*, 2: 403-416.
238. Mitiulafi D, Vukovi-Gai B, Kneevi-Vukevi J, Stankovi S et Simi D. 2005. Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis L.*). *Archiv Bio Sci*, 57: 173-178.
239. MoARD. 2008. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria, 4th Edn.

240. MoARD. 2011. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria, 6th Edn.
241. Molan P. 1992. The antibacterial activity of honey, *Bee world*, 73: 5-28 und 59-76.
242. Molan PC et Betts JA. 2004. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update *J. Wound Care*, 13(9):353-356.
243. Moldovan RI, Oprean R, Benedec D, Hanganu D, Duma M, Oniga I et Vlase L. 2014. LC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities for five species of Mantha cultivated in Romania. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9 (2): 559-566.
244. Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA et Gan SH. 2012. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: A review. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 9(1): 36-42.
245. Moniruzzaman M, Khalil MI, Sulaiman SA et Gan SH. 2013a. Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 43.
246. Moniruzzaman M, Sulaiman SA, Khalil MI et Gan SH. 2013b. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey. *Chemistry Central Journal*, 7: 138.
247. Monzote L, Alarcón O et SETZER W N. 2012. Antiprotozoal Activity of Essential Oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 77 (4) : 167-175.
248. Moure A, Cruz J M, Franco D, Dominguez J M, Sineiro J, Dominguez, H., et al. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145–171.
249. Muylaert A et Mainil J G. 2012. Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann Méd Vét*, 156 :109- 123.



250. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sanchez E, Daglia M et Nabavi SM. 2015. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, 7: 7729-7748.
251. Naciri M, Lacroix-Lamande S et Laurent F. 2007. La cryptosporidiose chez les jeunes ruminants non sevrés le pouvoir pathogène de *Cryptosporidium parvum*. *Nouv Pract Vét élevage et santé*, 4 : 15-20.
252. Nagai T, Inoue R, Kamamori N, Suzuki N et Nagshima T. 2006. Characterization of honey

- from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. *Food Chem*, 97:256–62.
253. Nagy B et Fekete PZ. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30: 259-284.
254. Nagy B et Fekete PZ. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 295: 443–454.
255. Naik M I, Fomda B A, Jaykumar E et Bhat J A. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific J Tropical Med*, 3: 535-538.
256. Naman M, Faid M et EL Adlouni C. 2005. Microbiological and Physico-Chemical Properties of Moroccan Honey. *Int J Agri Biol*, 7 (5): 773-776.
257. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test, 9th International Supplement. M100-S9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
258. Naveed R, Hussain I, Mahmood MS et Masood Akhtar. 2013. In vitro and in vivo evaluation of antimicrobial activities of essential oils extracted from some indigenous spices. *Pak Vet J*, 33(4): 413-417.
259. Nazzaro F, Fratianni F, de Martino L, Coppola R et de Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6: 1451-1474.
260. Nedji N et Loucif-Ayad W. 2014. Antimicrobial effects of Algerian honey on pathogenic food-related bacteria. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6 (11): 1194-1200.
261. Nguyen TD, Vo TT et Vu-Khac H. 2011. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J Vet Sci*, 12(2): 159-164.
262. Nickavar B, Alinaghi A et Kamalinejad M. 2008. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iran J Pharm Res*, 7: 203–209.
263. Niki E. 2010. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 49: 503–515.
264. Nilforoushzadeh M A, Jaffary F, Moradi S, Derakhshan R et Haftbaradaran E. 2007. Effect of topical honey application along with intralesional injection of glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 7:13.
265. Nostro A. 2006. Activity of plant extracts and plant-derived compounds against drug-resistant microorganisms. In: Ahmad I, Aqil F, Owais M, editors. *Modern Phytomedicine*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. pp. 199–231.

266. Odde KG. 1988. Survival of neonatal calf. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 4: 501-508.
267. Oddo L P, Piazza M G et Pulcini P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30 : 57–65.
268. Ok M, Gu L, Turgut K, Ok U, Sen I, Gündüz IK, Birdane M F et Güzelbektes H. 2009. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses Public Health*, 56: 94-101.
269. Olaitan PB, Adeleke OE et Ola IO. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, 7(3): 159-165.
270. Oliveira Filho J P, Silva D P G, Pacheco M D, Mascarini L M, Ribeiro M G, Alfieri A A, Alfieri A F, Stipp D T, Barros B J P et Borges A S. 2007. Diarrhea in Nelore calves: Clinical and etiologic study. *Braz J Vet Res*, 27: 419-424.
271. OMS .2013. Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. ISBN 978 92 4 250609 9 (classification NLM : WB 55).
272. Orden J A, Ruiz-Santa-Quiteria J A, Garcia S, Cid D et De La Fuente R. 2000. In Vitro Susceptibility of *Escherichia coli* Strains Isolated from Diarrhoeic Dairy Calves to 15 Antimicrobial Agents. *J Vet Med*, B 47, 329–335.
273. Ou Said M A, Pohl P, De Rycke J et Contrepois M. 1998. Toxines et fimbriae produites par les souches *Escherichia coli* isolées de fèces de veaux diarrhéiques en Algérie. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop*, 51(3): 195-200.
274. Ouchemoukh S, Louaileche H et Schweizer P. 2007. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honey. *Food Control*, 18: 52–58.
275. Oussou K R. 2009. Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l’Université de Cocody-Abidjan, 241p
276. Oustric E. 2014. la gale sarcoptique humaine : maladie, epidemiologie, diagnostic, traitements et prise en charge a l’officine. Thèse pour le diplome d’état de docteur en pharmacie universite toulouse III, paul sabatier faculte des sciences pharmaceutiques .

P

277. Padalia RC, Verma RS, Chauhan A, Sundaresan V et Chanotiya CS. 2013. Essential oil composition of sixteen elite cultivars of *Mentha* from western Himalayan region, India. *Maejo Int J Sci Technol*, 7(01), 83-93.
278. Payagalage N K. 2013. La gastro-entérite paralysante chez le veau : enquête sur les critères

- diagnostiques et les aspects thérapeutiques actuels en France. Thèse, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
279. Perez E, Kummeling A, Janssen MMH, Jimenez C, Alvarado R, Caballero M, Donado P et Dwinger RH. 1998. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilaran. Costa Rica. *Prev Vet Med*, 33: 195-205.
280. Pérez S G, Ramos-López M A, Sánchez-Miranda E, Fresán-Orozco M C et Pérez-Ramos J. 2012. Antiprotozoa activity of some essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(15): 2901-2908.
281. Persano Oddo L et Piro R. 2004. Main European uni-floral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35 (Suppl. 1); S38–S81.
282. Persano Oddo L et Pulcini P. 1999. A scientific note on the Phadebas method for honeys with low enzyme content. *Apidologie*, 30: 347–348.
283. Pesenti ME, Spinelli S, Bezirard V, Briand L, Pernollet J-C, Tegoni M et Cambillau C. 2008. Structural Basis of the Honey Bee PBP Pheromone and pH-induced Conformational Change. *Journal of Molecular Biology*, 380 (1): 158-169.
284. Piaru S P, Mahmud R et Perumal S. 2012. Determination of antibacterial activity of essential oil of *Myristica fragrans* using tetrazolium microplate assay and its cytotoxic activity against Vero cell line. *Int J Pharmacol*, 8: 572-576.
285. Picco NY, Alustiza FE, Bellingeri RV, Grosso MC, Motta CE, Larriestra AJ, Vissio C, Tiranti KI, Terzolo HR, Moreira AR et Vivas AB. 2015. Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 47(2): 95-102.
286. Pierron C. 2014. Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gériatrie et soins palliatifs Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie.
287. Pillai S, Mahmud R, Lee W C et Perumal S. 2012. Anti-parasitic Activity of *Myristica fragrans* Houtt. Essential Oil against *Toxoplasma Gondii* Parasite. /APCBEE Procedia 2: 92 – 96.
288. Piochon M. 2008. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Thèse de doctorat en ressources renouvelables. Université du Québec.
289. Poaty B, Lahlah J, Porqueres F et Bouafif H. 2015. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest. *World J Microbiol Biotechnol*, 31: 907-919.

290. Ponce AG, Fritz R, del Valle C et Roura SI. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, 36 : 679–684.
291. Pourtaghi H et Sodagari H R. 2016. Antimicrobial Resistance of Enteroxigenic and Non-Enteroxigenic *Escherichia coli* Isolated From Diarrheic Calves in Iran. *Int J Enteric Pathog*, 4(2): e34557.
292. Pourtaghi H, Dahpahlavan V et Momtaz H. 2013. Virulence genes in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhoea in Iran. *Comp Clin Pathol*, 22:513–515.
293. Prabuseenivasan S, Jayakumar M et Ignacimuthu S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oil. *BMC Complement Altern Med*, Vol. 6. 10.1186/1472-6882-6-39.
294. Prasad P, Praveen Kumar P, Satyavathi K et Prabhakar M C. 2011. Comparative studies on anthelmintic activity of natural sweeteners. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1 (3): 510–514.

Q

295. Quigley J D, Martin K R, Bemis D A, Potgieter L N D, Reinemerger C R, Rohrbach B W, Dowlen H H et Lamar K C. 1995. Effects of Housing and Colostrum Feeding on Serum Immunoglobulins, Growth, and Fecal Scores of Jersey Calves. *J Dairy Sci* 78 : 893-901.
296. Quilez J, Sánchez-Acedo C, Del Cacho E, Clavel A et Causape A C. 1996. Prevalence of cryptosporidium and giardia infections in cattle in Aragón (northastern Spain). *Vet Parasito*, 66: 139-146.

R

297. Radostits OM, Gay CC, Blood DC et Hinchclif KW. 2001. Viral diarrhea in calves, lambs, kids, piglets and foals. In *Veterinary Medicine*, Edition Saunders, 9ème Edition. Part. I-6, 1117-1126.
298. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW et Constable PD. 2007. *Veterinary Medicine - A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*, 10th ed , USA: Saunders Elsevier, Vol 1 and 2, p. 260 – 268 and 1286 -1299.
299. Radulovic N, Dekic M, Radic ZS et Palic R. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turk J Chem*, 35: 499 – 512.
300. Rai RB, Hansha A, Rai S, Singh B, Kumar H, Singh AK, Damodaran T et Dhama K. 2011. Prevalence of rota and coronavirus infections in calves of Barabanki and Raebareli districts of Uttar Pradesh. *Indian J Vet Pathol*, 35: 73-74.

301. Rao P V et Gan S H. 2014. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. Evidence-Based Complement Altern Med, Vol. 4. 10.1155/2014/642942.
302. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M et Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26: 1231–1237.
303. Rebiai A, Lanez T et Chouikh A. 2015. Physicochemical and biochemical properties of honey bee products in south Algeria. Scientific Study et Research, Chemistry et Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry, 6 (2):133 – 142.
304. Reichling J, Schnitzler P, Suschkea U et Saller R. 2009. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties – an Overview. Forsch Komplementmed, 16: 79–90.
305. Reiner V A. 2008. Virus's bacteria cannot develop resistance to natural ingredients. Essential oils versus MRSA
306. Reynolds DJ, Morgan J H, Chanter N, James P W, Bridger J C; Debrney T G et Bunch K J. 1986. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. Vet Rec, 119: 34-39.
307. Ribereau Gayon P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris.
308. Rieux A. 2013. Cryptosporidiose chez les ruminants domestiques en France : épidémiologie moléculaire et potentiel zoonotique. Thèse de doctorat. Université de Poitiers.
309. Rigobelo EC, Gamez HJ, Marin JM, Maced OC, Ambrosin JA et Ávila FA. 2006. Virulence factors of Escherichia coli isolated from diarrheic calves. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, 58 (3): 305-310.
310. Roldán LP, Gonzalo J Díaz GJ et Durringer JM. 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria. Rev Colomb Cienc Pecu, 23:451-461.
311. Rollin F, Réhydratation orale raisonnée du veau atteint de gastro-entérite néonatale. Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, Oeiras (Portugal), 10-12 October 2002, SPCV, 2002, 79-93.
312. Roopnarine R, Ammons D et Adesiyun A A. 2009. Frequency of antimicrobial resistance of E. coli isolates from dairy farms in Trinidad by source and presence of virulence markers. Veterinarski Arhiv, 79 (3): 229-243.
313. Rousseau F. 2006. Les diarrhées des veaux sous la mère :il est impossible de les éviter totalement, mais sachez les prévenir et les guérir. Comité Interprofessionnel "Veau Sous la Mère". <https://www.veausouslamere.com/img/upload/production/conseils/plaquette-diarrhees.pdf>
314. Roy J H B. 1990. The Calf. 5^{ème} Edit. Vol. 1 : Management of Health. British Library

Cataloging in Publication Data. Vol. 1 : 1-117.

315. Rufián-Henares J A et De la Cueva S P. 2009. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins A Study of Their Metal-Chelating Properties. *J. Agric. Food Chem.* 57 : 432–438
316. Rusenova N et Parvanov P. 2009. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia Journal of Sciences*, 7 (1) : 37-43.

S

317. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S et Radice M. 2005 : Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem*, 91: 621–632.
318. Safavi E S, Gholam Reza Mohammadi G R, Naghibi A et Rad M. 2011. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. infection in some dairy herds of Mashhad (Iran) and its association with diarrhea in newborn calves. *Comp Clin Pathol*, 20:103 -107.
319. Saif L J. 2010. Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 26(2): 349-64.
320. Salvadori M R, Valadares G F et Leite D S. 2003. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Braz J Microbiol*, 34: 230-235.
321. Sanon A, M.Garba M, J. Auger J et Huiganrt J. 2002. *Journal of Stored Products Research*, 38: 129.
322. Şarer E, Yağmur Toprak S, Otlu B et Durmaz R. 2011. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Mentha spicata* L. subsp. *Spicata*. *ournal of Essential Oil Research*, 23:1, 105-108.
323. Saxena S, Gautam S et Sharma A. 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, 118: 391–397.
324. Scherrer R et Laporte J. 1983. Rotaviroses et Coronaviroses du veau. *Rec Méd Vét*, 159(3): 173-183.
325. Schnitzler P, Koch C et Reichling J. 2007. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains of essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrob Agents Chemother*, 51:1859–1862.
326. Schramm D D, Karim M, Schrader H R, Holt R R, M. Cardetti M et Keen C. 2003. *J Agric Food Chem.* 51: 1732.
327. Schumann F J, Townsend H G G et Naylor J M. 1990. Risk Factors for Mortality from Diarrhea in Beef Calves in Alberta. *Can. J. Vet Res*, 54 : 336-372.

328. Schwarz S et Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *J Vet Res*, 32: 201-25.
329. Scott P R, Hall G A, Jones P W et Morgan J H. Calf Diarrhoea. In: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG, editors. *Bovin medicine diseases and husbandry of cattle*. Oxford: Wiley- Blackwell; 2004, p. 185-214.
330. Scott P R, Penny C D et Macrae A I. 2011. *Cattle medecine*. Manson Publishing
331. Selles SMA et Niar A. 2007. Prévalence de quelques agents entéropathogènes associés aux diarrhées néonatales du veau âgé de 1 à 30 jours dans la région de Tiaret. Thèse magister, Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires.
332. Selles SMA, Kouidri M, Belhamiti BT, Ait Amrane A, Benia AR, Bellik Y, Hammoudi SM, Niar A et Boukrâa L. 2014. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4 (Suppl 1): S318-S322.
333. Sevenic F, Irmak K et Sevenic M. 2003. The prevalence of cryptosporidium parvum infection in the diarrhoeic and non diarrhoeic calves. *Rev Med Vet*, 154(5): 357-361.
334. Shahbazi Y. 2015. Chemical Composition and In Vitro Antibacterial Activity of Mentha spicata Essential Oil against Common Food-Borne Pathogenic Bacteria. *Journal of Pathogens* . Volume 2015.
335. Shahrani M, Dehkordi F S et Momtaz H. 2014. Characterization of Escherichia coli virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. *Biological Research*, 47:28.
336. Shams Z, Tahamtan Y, Pourbakhsh A, Hosseiny MH, Kargar M et Hayati M. 2012. Detection of enterotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal sample of calves by molecular and serological methods. *Comp Clin Pathol*, 21: 475.
337. Sharaf A, Mishra M S et Sharma K. 2011. Antibacterial activity of commercial and wild Cinnamon species. *J Phytol*, 3: 102-106.
338. Shehu A, Rohin MAK, Aziz AA et Ismail S. 2015. Antibacterial Activity and Antioxidant Capacity of Malaysian Tualang Honey. *International Journal of Science and Research*, 4 (4) : 1758-1762.
339. Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S et Humphreys H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10: 47.
340. Singh B R, Agarwal R K, Singh K P, Pawde A M, Sinha D K, Dubey S, Bhardwa M et Vadhana P. 2015. Antibacterial activity of Caraway essential oil against bacteria isolated from

- veterinary clinical cases. *Nat Prod An Indian J*, 11: 69-74.
341. Singh B R, Singh V et Singh R K Ebibeni N. 2011a. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin. *Int Res J Pharmacy Pharmacol* 1: 228-236.
342. Singh B R, Singh V, Singh R K, Toppo S, Haque N et Ebiben N. 2012. Antimicrobial activity on common pathogens in essential oil of aerial parts of *Selinum wallichianum*. *Nat Prod : An Indian J*, 8: 233-237.
343. Singh B R, Singh V, Singh R K, Toppo S et Haque N. 2011. Antimicrobial effect of *Artemisia vulgaris* essential oil. *Nat Prod: An Indian J*, 7: 5-12.
344. Singh B R. 2013. Evaluation of antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. Sage oil on veterinary clinical isolates of bacteria. *Noto-are: Med*.
345. Singh BB, Sharma R, Kumar H, Banja RSA, Gill JPS et Sharma JK. 2006. Prevalence of *cryptosporidium parvum* infection in Punjab. India and its association with diarrhea in neonatal dairy calves. *Vet Parasito*, 140: 162-165.
346. Singh G, Maurya S, de Lampasona MP et Catalan CAN. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1650-1661.
347. Singleton VL et Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16: 144-158.
348. Sipailiene A, Venskutonis P R, Baranauskiene R et Sarkinas A. 2006. Antimicrobial Activity of commercial samples of thyme and marjoram oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 698-703.
349. Smith B P. *Large Animal Internal Medicine*. 4^{ème} edition. Mosby, 2008, 1872p.
350. Snodgrass DR, Tezolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD et Syngé BA. 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Veterinary Record*, 119: 31-34.
351. Snoussi M, Noumi E, Trabelsi N, Flamini G, Papetti A et De Feo V. 2015. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, 20:14402-14424.
352. Snowdon J A et Cliver d o. 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31 : 1-26.
353. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D et van Griensven LJ. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11): 7532-7546.
354. Soković M, Marin PD, Brkić D et van Griensven LJLD. 2007. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic

Bacteria. Food.

355. Soni A et Sosa S. 2013. Phytochemical Analysis and Free Radical Scavenging Potential of Herbal and Medicinal Plant Extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4): 22-29.
356. Stipp DT, Barry AF, Alfieri AF, Takiuchi E, Amude AM et Alfieri AA. 2009. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assays in faeces of calves from Brazilian cattle herds. *Trop Anim Health Prod*, 41: 1563-1567.

T

357. Tajik J, Nazifi S, Naghib SM et Ghasrodasht AR. 2012. Comparison of electrocardiographic parameters and serum electrolytes and microelements between single infection of rotavirus and coronavirus and concurrent infection of *Cryptosporidium parvum* with rotavirus and coronavirus in diarrheic dairy calves. *Comp Clin Pathol*, 21: 241-244.
358. Tan HT, Abdul Rahman R, Gan SH, Halim AS, Hassan SA, Sulaiman SA et Kirnpal-Kaur BS. (2009). The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(34): 1–8.
359. Telci I, Sahbaz N, Yilmaz G et Tugay M E. 2004. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. *Econ Bot*, 58 : 721–728.
360. Terrab A, Díez M J et Heredia F J. 2002. Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chem*, 79: 373-379.
361. Terrab A, Escudero ML, Gonzalez-Miret ML et Heredia FJ. 2004. Colour characteristics of honeys as influenced by pollen grain content: a multivariate study. *J Sci Food Agric*, 84: 380-386.
362. Tien Y Y, Ng C C, Chang C C, Tseng W S, Kotwal S et Shyu Y T. 2005. Studies on the lactic-fermentation of sugar apple (*Annona squamosa* L.) puree. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13: 377–381.
363. Tomczak C. 2010. Utilisation du miel dans le traitement des plaies. *Revue bibliographique Thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.*
364. Tonks A, Cooper R A, Price A J, Molan P C et Jones K P. 2001. Stimulation of TNF-alpha release in monocytes by honey. *Cytokine*. 14: 240–2.
365. Trefz F M, Lorch A, Feist M, Sauter-Louis C et Lorenz I. 2012. Construction and validation of a decision tree for treating metabolic acidosis in calves with neonatal diarrhea. *BMC*

Veterinary Research, 8:238.

366. Tzipori S. 1985. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med*, 29 : 103-206.

U

367. Uhde F L, Kaufmann T, Sager H, Albini S, Zanoni R, Schelling E et Meylan M. 2008. Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *Vet Rec*, 163:362–366.
368. Umpiérrez A, Acquistapace S, Fernández S, Oliver M, Acuña P, Reolón E et Zunino P. 2016. Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*, 10(5): 472-477.
369. Unlu M, Ergene E, Unlu G V, Zeytinoglu H S et Vural N. 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food Chem Toxicol*, 48: 3274-3280.
370. Upcroft J A, Campbell RW, Benakli K, Upcroft P et Vanelle P. 1999. Efficacy of new 5-nitroimidazole- susceptible and resistant *Giardia*, *Trichomonas* and *Entamoeba* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 73-76.
371. Upcroft P et Upcroft J A. 2001. Drugs target mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev*, 14: 150-164.

V

372. Vadhana P, Singh B R, Bharadwaj M et Singh S V. 2015. Emergence of Herbal Antimicrobial Drug Resistance in Clinical Bacterial Isolates. *Pharm Anal Acta* , 6:10

W

373. Waltner-Toews D, Martin S W et Meek A H. 1986. An epidemiological study of selected calf pathogens on Holstein dairy farms in southwestern Ontario. *Can J Vet Res*, 50: 307-313.
374. Warnke P H, Becker S T, Podschun R, Sivananthan S, Springer I N, Russo P A, Wiltfang J, Fickenscher H et Sherry E. 2009. The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J*

- Cranio-Maxillofacial Surg, 37: 392-397
375. Wasihun A G et Kasa B G. 2016. Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia, SpringerPlus. 5:842
376. Williams G M. 1994. Interventive prophylaxis of liver cancer. European Journal of Cancer Prevention, 3: 89-99.
377. Windeyer M C, Leslie K E, Godden S M, Hodgins D C, Lissemore K D et LeBlanc S J. 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. Prev Vet Med, 113 : 231–240.
378. Woolhouse M E et Ward M J. 2013. Sources of antimicrobial resistance. Science 341, 1460–1461.
379. Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B et Farrar J. 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Phil Trans R Soc, B 370: 20140083.
380. Wyatt C R, Riggs M W et Fayer R. 2010. Cryptosporidiosis in neonatal calves. Vet Clin Food Anim, 26: 89-103.

γ

381. Yang C H, Li R X et Chuang L Y. 2012. Antioxidant activity of various parts of Cinnamomum cassia extracted with different extraction methods. Molecules, 17: 7294-7304.
382. Yap P S X, Lim S H E, Huc C P et Yiap B C. 2013. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. Phytomedicine, 20: 710-713.
383. Yates C M, Pearce M C, Woolhouse M E J et Amyes S G B. 2004. High frequency transfer and horizontal spread of apramycin resistance in calf faecal Escherichia coli. J Antimicrob Chemother. 54, 534–537.
384. Yen G C et Duh P D. 1993. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. Journal of the American Oil Chemists' Society, 70: 383–386.
385. Yim M B, Yim H S, Lee C, Kang S O et Chock P B. 2001. Protein glycation: creation of catalytic sites for free radicals generation. Annals of New York Academy of Science, 928 : 48-53.
386. Yimer M, Gezhagne M, Biruk T et Dinaol B. 2015 . A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. J. Vet. Med. Anim. Health, 7(5) : 173-185.
387. Younis E E, Ahmed A M, El-Khodery S A, Osman S A et El-Naker Y F I. 2009. Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in diarrheic neonatal calves in Egypt. Research in Veterinary Science, 87: 373–379.

Z

388. Zaidi S F, Aziz M, Muhammad J S et Kadowaki M. 2015. Diverse pharmacological properties of *Cinnamomum cassia*: A review. Pak J Pharm Sci, 28 (4): 1433-1438.
389. Zainol MI, Yusoff KM et Yusof MYM. 2013. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13:129.
390. Zander E. 1950. The service palynology study of honey. Annals Spanish Institute Soil Science, 9: 195-209.
391. Zappalà M, Fallico B, Arena E et Verzera A. 2005. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. Food Control, 16: 273–277.
392. Zareie P P. 2011. Honey as an antiviral agent against respiratory syncytial virus. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science in Biological Sciences at The University of Waikato
393. Zeina B, Othman O et Al-Assad S. 1996. Effect of Honey versus Thyme on Rubella Virus Survival in Vitro. J Altern Complement Med, 2(3):345-8.
394. Zeina B, Zohra BI et al-assad S: The effects of honey on Leishmania parasites: an in vitro study. Trop Doct 1997, 27:36-8.
395. Zerrouk SH, Fallico BG, Arena EN, Gabriele F. Ballistreri GF et Boughediri LA. 2011. Quality Evaluation of Some Honey from the Central Region of Algeria, 4 (4): 243 – 248.
396. Znini M, Bouklah M, Majidi L, Kharchouf S, Aouniti A, Bouyanzer A, Hammouti B, Costa J et Al-Dyab SS. 2011. Chemical composition and inhibitory effect of Mentha spicata essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. Int J Electrochem Sci, 6 : 691–704.
397. Zrelli M, Messadi L; Ben Miled L, Jemli MH et Haddad N. 1990. Les agents infectieux associés aux diarrhées néonatales du veau en Tunisie. Rev Méd Vét, 141(11): 861-872.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture utilisés**Milieu de MacConkey.**

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Peptone pancréatique de gélatine	17,00g
Tryptone	1,00g
Peptone pepsique de viande	1,50g
Lactose	10,0g
Sels biliaires	1,50g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	30mg
Cristal violet	1mg
Agar bactériologique	13,5g
pH	7.1 ± 0.2.

Gélose Müller –Hinton

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Infusion de viande de bœuf	2,00g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1.50g
Agar	17.0g
pH	7.4 ± 0.2

Bouillon Müller –Hinton

Formule en gramme par litre d'eau distillée

Infusion de viande de bœuf	2,00g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1.50g

Annexe 2 : Coloration de Gram (Delarras, 2007).

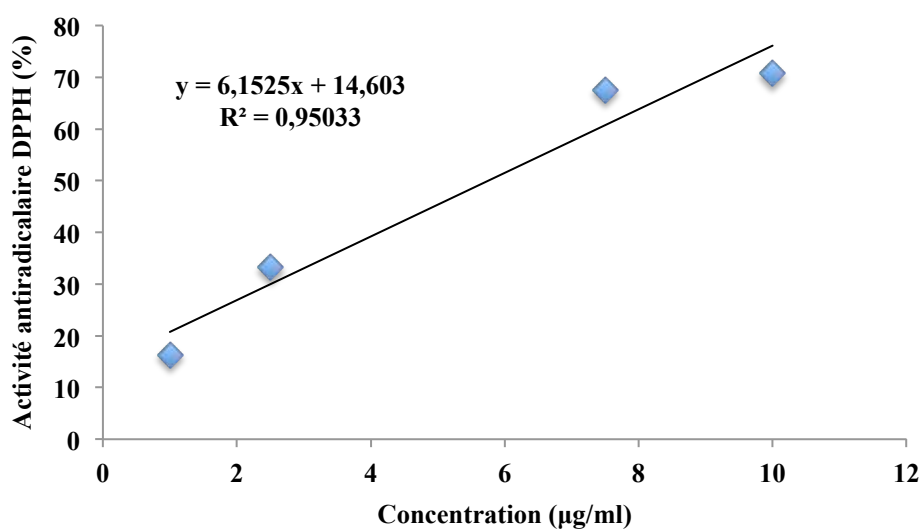
- Préparer un frottis de la souche test ;
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ;

Lecture

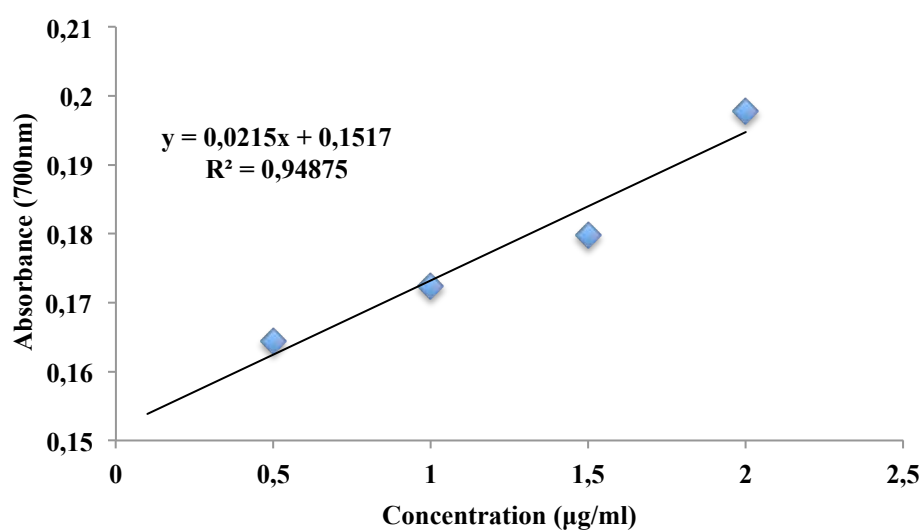
- Observation sous microscope optique (X 100).

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

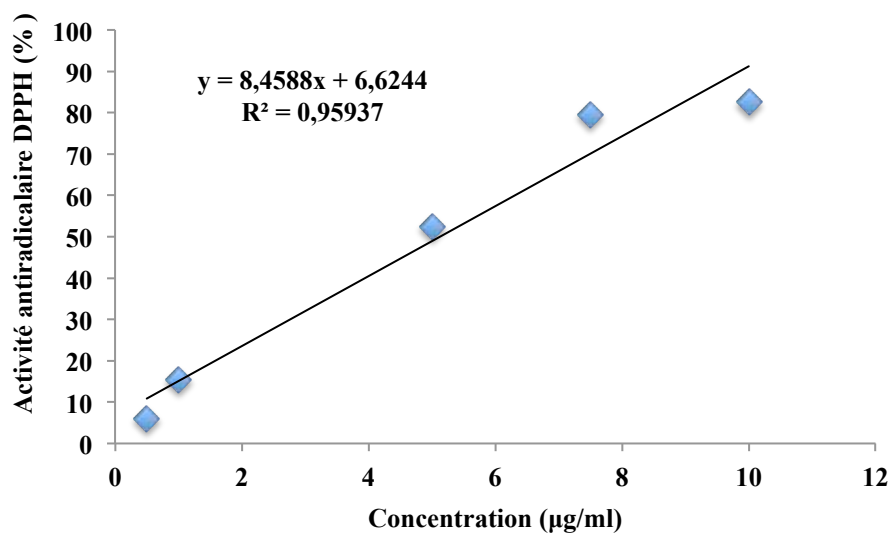
Annexe 3 : Activités anti-oxydantes des molécules de référence (Huiles essentielles)



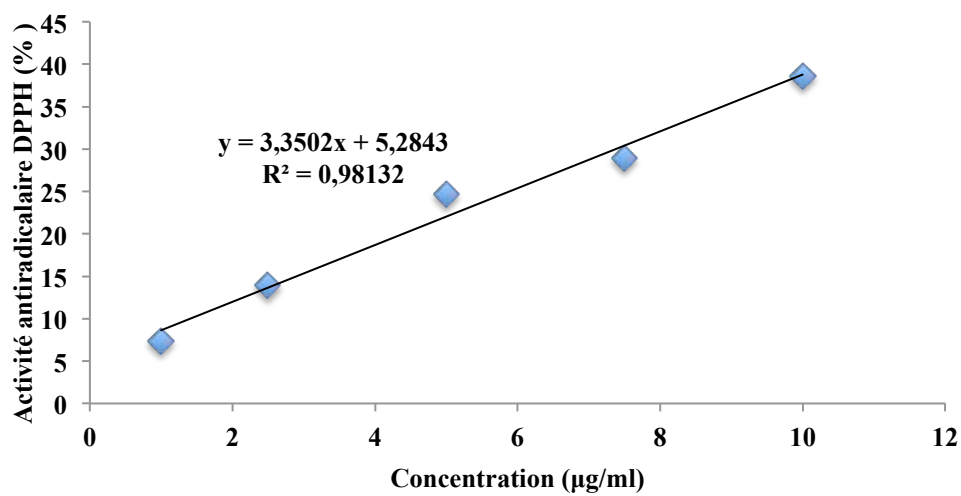
Activité antiradicalaire de l'acide gallique



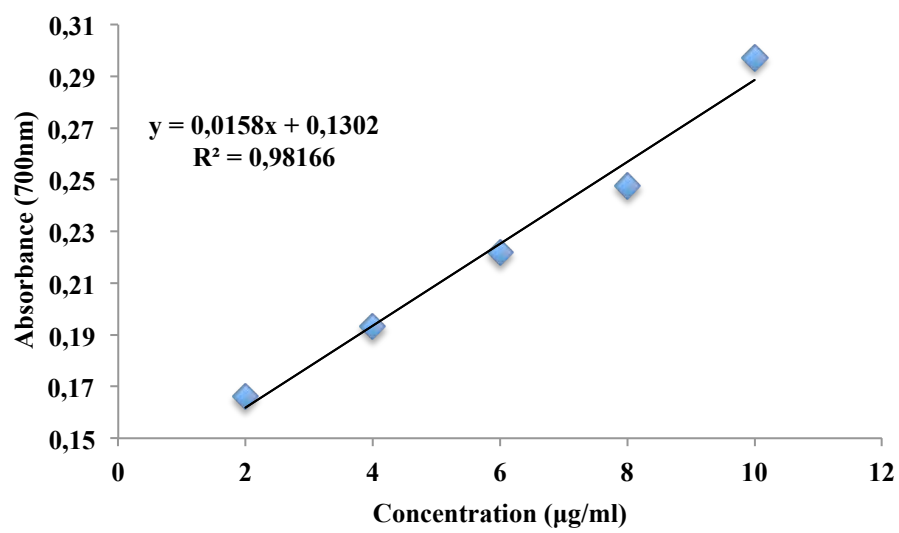
Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique



Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique

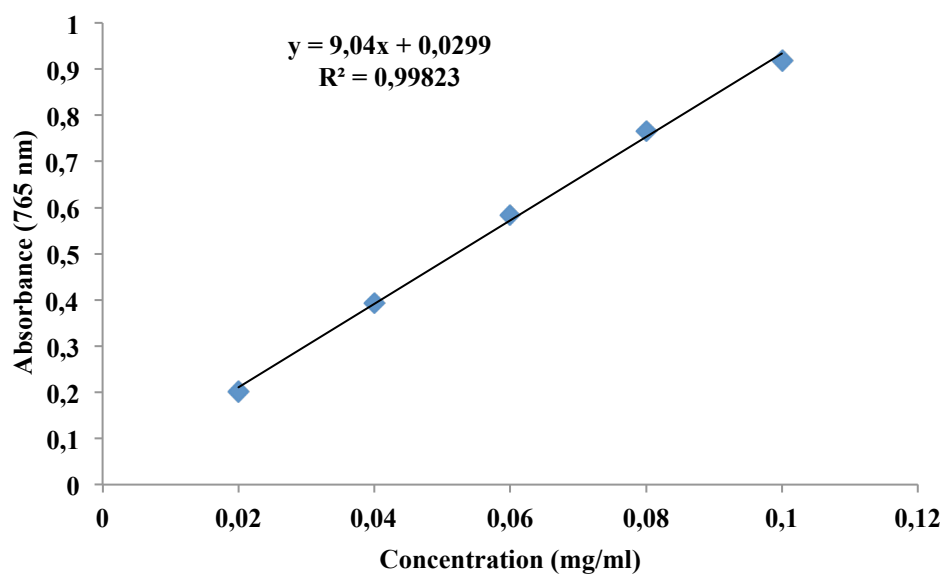


Activité antiradicalaire de la quercétine

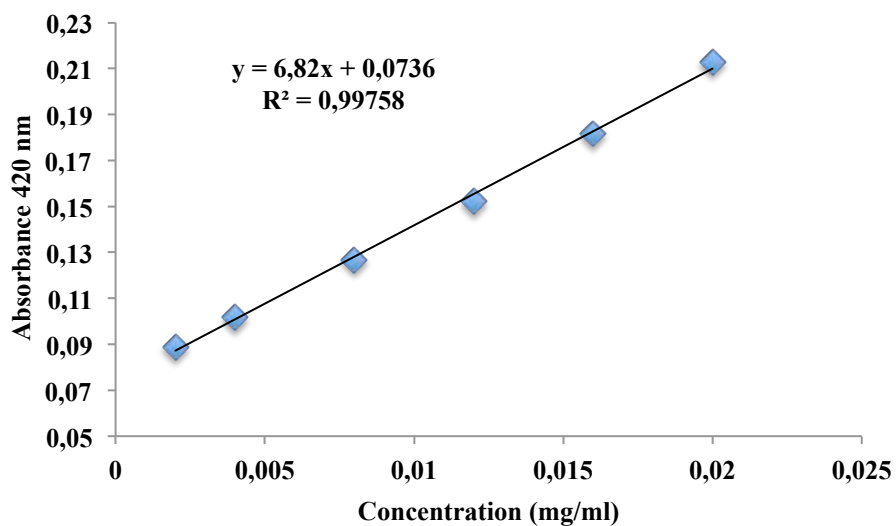


Pouvoir réducteur de la quercétine

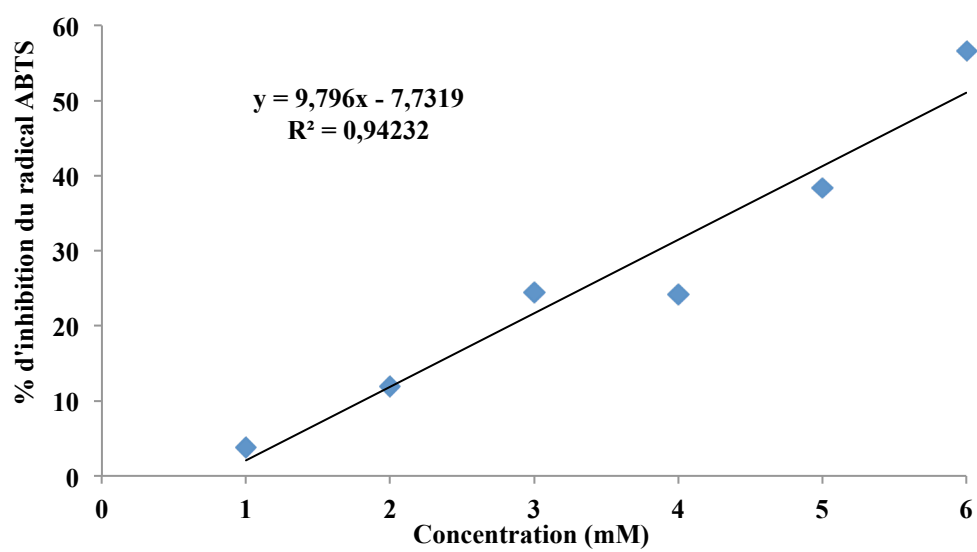
Annexe 4 : Courbes d'étalonnages (Miel)



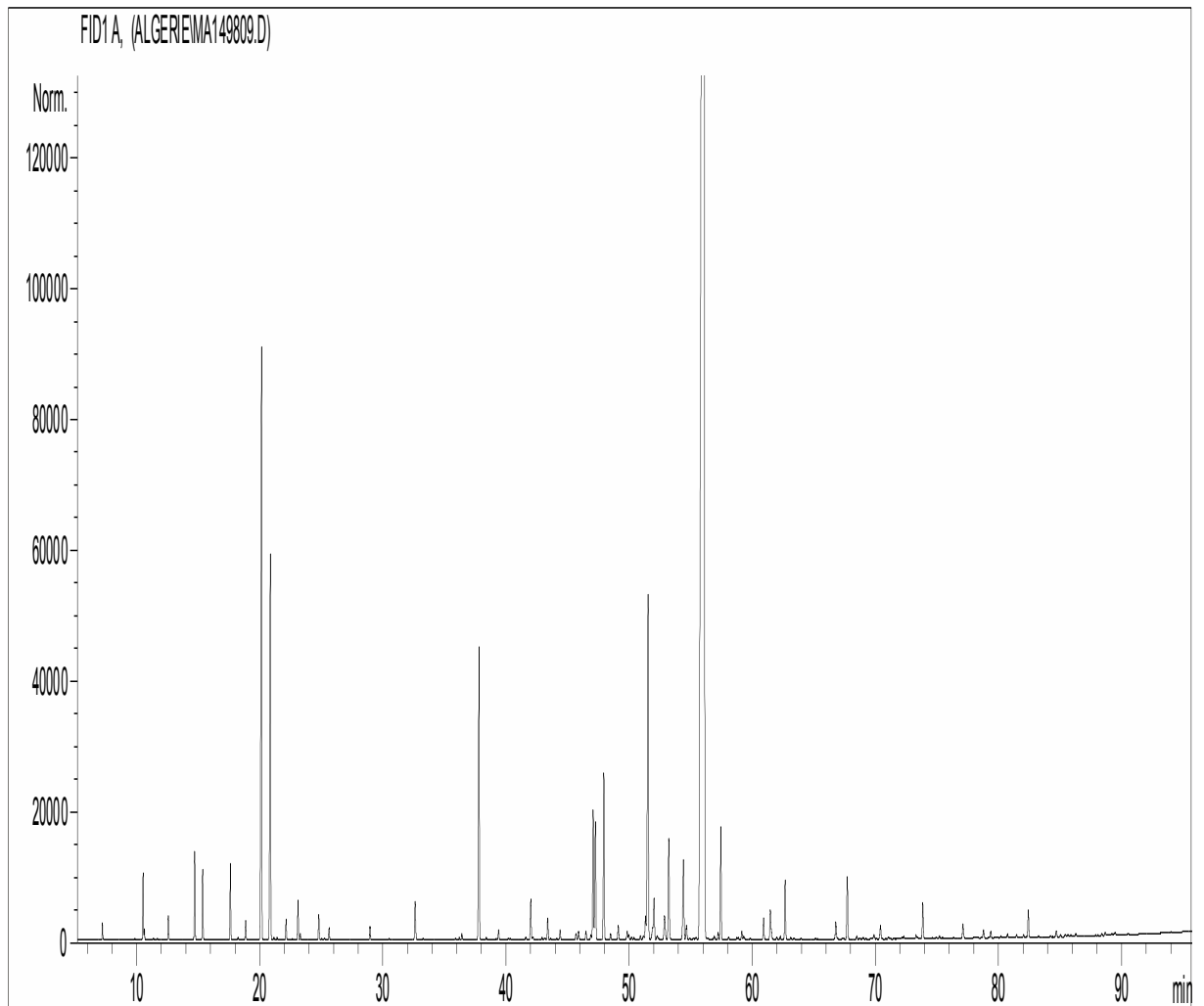
Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

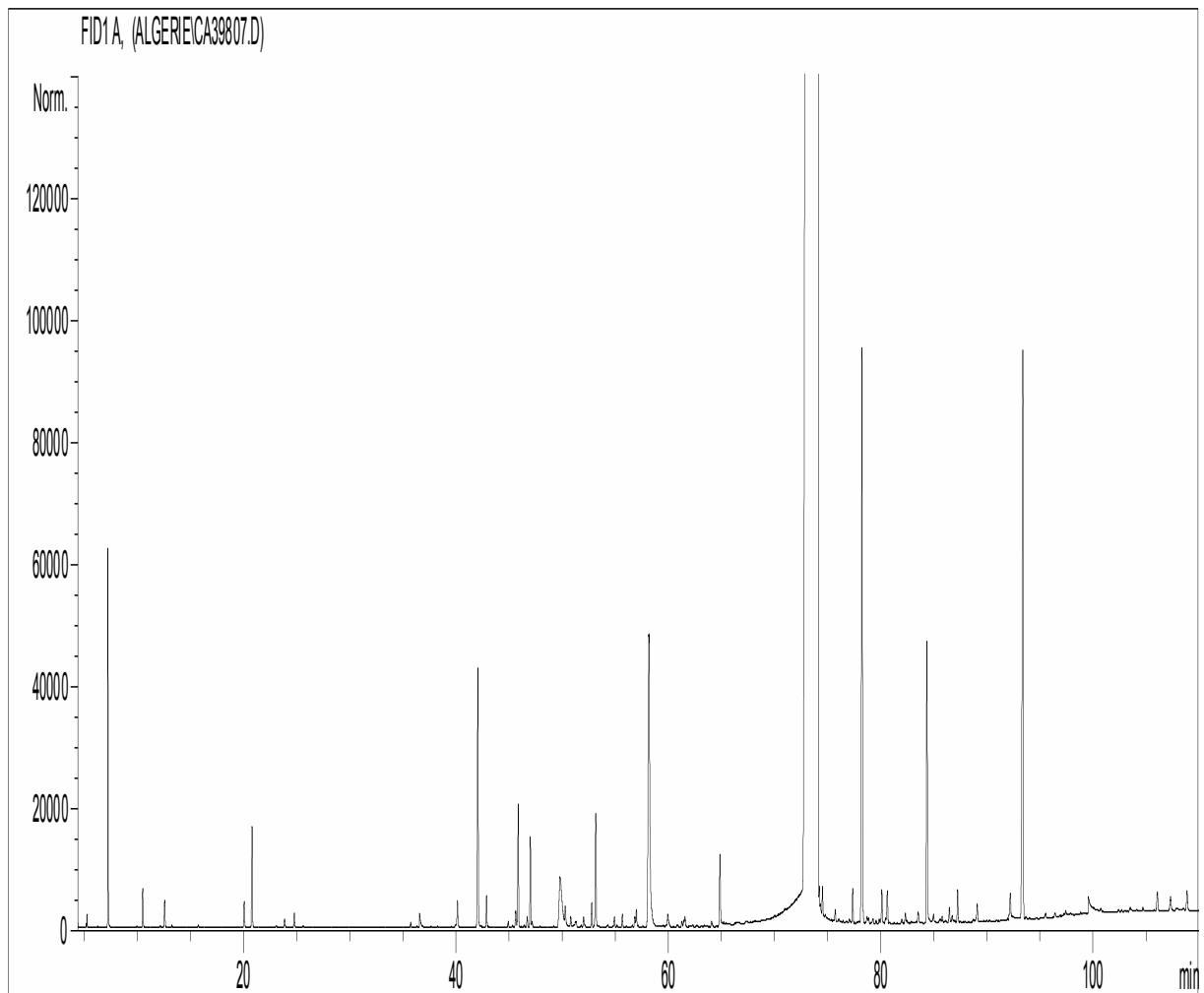


Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux



Courbe d'étalonnage du Trolox pour le dosage du statut antioxydant total.

Annexe 5: Profil chromatographique (GC/FID)**Profil chromatographique (GC/FID) d'huile essentielle de *Mentha spicata***



Profil chromatographique (GC/FID) d'huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum*

Volume 17, Number 1
June, 2018

ISSN: 1816-1820 (Print version)
1816-1839 (Online version)

The Dhaka University Journal of
**Pharmaceutical
Sciences**



A Publication of the Faculty of Pharmacy
University of Dhaka, Dhaka-1000, Bangladesh

A PEER REVIEWED JOURNAL
Articles in this journal are available
online ahead of the print issue
www.dujps.com
www.pharmadu.net

Chemical Composition, Antioxidant and *In vitro* Antibacterial Activities of Essential Oils of *Mentha spicata* Leaf from Tiaret Area (Algeria)

Sidi Mohammed Ammar Selles^{1,2,3}, Mokhtaria Kouidri², Yuva Bellik⁴,
Amar Ait Amrane^{1,2}, Belkacem Tahar Belhamiti^{1,2}, Ahmed Redha Benia^{1,2},
Si Mohamed Hammoudi¹ and Laid Boukraa^{1,2}

¹Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria

²Institute of veterinary science, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria

³Faculty of Life and Nature Sciences, Mascara University, Algeria

⁴Faculty of Life and Nature Sciences, Mohamed El Bachir El Ibrahimi University, Bordj Bou Arreridj, 34000 Algeria

(Received: 9 August, 2017; Accepted: 17 April, 2018; Published (web): 10 June, 2018)

ABSTRACT

The antioxidant and antibacterial activities and the composition of essential oil of *Mentha spicata* from Tiaret area were evaluated. The essential oil was obtained by hydrodistillation. The antioxidant activity was determined by DPPH radical scavenging assay and reducing power. The antimicrobial activity was evaluated by the broth micro-dilution method against seven strains isolated from diarrhea of young calves. The essential oil was analyzed by GC-MS/GC-FID. A total of 116 compounds amounting of 99.92% of the total component of the oil were identified. The major component of the oil was carvone (63.59%). The antioxidant activity by DPPH assay showed IC₅₀ value of 21.1 ± 7.17 µg/ml, while the reducing power assay have resulted an EC₅₀ value of 2.28 ± 0.68 µg/ml. The results showed that the essential oil exhibited an MIC against all tested bacteria at 2.37 mg/ml to 4.75 mg/ml. The essential oil of *M. spicata* showed strong antioxidant and weak to moderate antibacterial activities.

Key words: *Mentha spicata*, essential oil, antimicrobial activity, antioxidant activity, enteropathogens bacteria.

INTRODUCTION

In the livestock industry, antimicrobial agents are used in chemoprophylaxis, chemotherapy and as growth promoters, but the misuse or abuse of these agents has the potential to result in a serious increase in resistance amongst bacteria.¹ Additionally, antimicrobial resistance is an emerging and serious public health concern due to the compromised efficacy of antimicrobial agents used in the treatment of infectious diseases.²

Medicinal plants are the boon of nature to cure a number of ailments of human beings. In many parts of the world, medicinal plants are used against

bacterial, viral and fungal infections.³ In fact, medicinal plants are rich sources of bioactive secondary metabolites, including polyphenols and essential oils. The latter are especially obtained from aromatic plants by steam distillation or solvent extraction. Essential oil contains several chemical compounds exhibiting different biological activities. It can reduce foodborne pathogens and decrease the use of synthetic and semisynthetic antimicrobial compounds.⁴

The genus *Mentha* includes 25-30 species that grow under cultivation from tropical to temperate climate of many countries.⁵ *Mentha spicata* is one the most common and popular mint cultivated throughout the world.⁶ In Algeria, this species is locally known as 'Naanaa' and is cultivated all over

Correspondence to: Selles Sidi Mohammed Ammar
E-mail: nuider10@yahoo.fr; Tel: +213-554-200-199
Fax: + 213 46 42 71 61.

Dhaka Univ. J. Pharm.Sci. 17(1): 87-96, 2018 (June)

the country for culinary purposes as well as for its medicinal properties.⁷ The leaves are popularly used as tea flavouring agent and the whole plant is used as carminative. The fresh and dried plants and their essential oils are widely used in the food, cosmetic, confectionary, chewing gum, toothpaste, and pharmaceutical industries.⁵ Likewise, *M. spicata* has been extensively applied to treat various diseases such as nausea, vomiting, and gastrointestinal disorders and also as breath freshener, antiseptic mouth rinse, and in toothpaste.⁶

The aim of the present study was to determine the chemical composition of the essential oil of Algerian spearmint, growing in the Dahmouni Locality (Tiaret), and to evaluate their antioxidant and antimicrobial effects against several pathogenic bacteria isolated from diarrhea of young calves.

MATERIALS AND METHODS

Extraction of essential oil. Aerial part of *M. spicata* was harvested in June, July and August 2014 in Ouled Bougadou (Dahmouni, Tiaret) located at west Algeria. The collected leaves were cut into small pieces and shade dried at room temperature and obscurity. The essential oil was extracted by hydro-distillation for 1h 30' by mixing 25g of *M. spicata* in 500 ml of distilled water. The oil obtained was collected and dried over anhydrous sodium sulfate and stored in sealed glass vials in a refrigerator at 4°C prior to analysis. The percentage yield of *M. spicata* essential oil has been calculated using the following formula.

$$\text{Yield of essential oil} = \frac{\text{Essential oil weight (g)}}{\text{Sample weight (g)}} \times 100$$

Analysis of essential oil. The essential oil from leaves of *M. spicata* was analysed by gas chromatography (GC-FID) and gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) realized by Pyrenessences Analysis. Briefly, the oil was analyzed using a Hewlett Packard 5973 instrument, with HP INNOWAX polar column (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm). One microliter of essential oil solution diluted in ethanol (10%) was injected and analysed. Helium

was the carrier gas with a flow rate of 30 psi/FID, 23 psi/MS. Column temperature was initially kept at 60°C for 6 min and then gradually increased to 250°C at 2°C/min rate and finally held for 10 min at 250°C. The temperature of the injector was fixed to 250°C and one of the detectors (FID) to 270°C. The compounds were identified by a combined search of retention time and mass spectra (NKS library, 75.000 spectra). The percentages were calculated from the peak areas given by the GC/ FID, without the use of correction factor.

Antimicrobial study

Microorganisms. The antimicrobial activity of the essential oil of *M. spicata* was evaluated against seven strains of Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* F5, *E. coli* F17, *E. coli* CS31A, *Kluyvera* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Serratia* spp.). The microbial strains used in this study were isolated from diarrhea of young calves.

Preparation of inoculum. Prior to the experiment, the strains were inoculated onto the surface of MacConkey agar media, the inoculum suspensions were obtained by taking five colonies from 24 h cultures. The colonies were suspended in 5 ml of sterile saline (0.85% NaCl) and shaken for 15 seconds. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard (equivalent to 1 - 5 × 10⁸ cfu/ml).

Minimum inhibitory concentration (MIC) measurement. The broth micro-dilution method employed for the determination of antimicrobial activities of the essential oils was performed according to the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards.⁸ Minimum inhibitory concentration determination was performed by a serial dilution method in 96 well microtiter plates. The starting concentration of the essential oil solution was 9.5 mg/ml. Further, stock solutions of the essential oils were prepared in 10% aqueous Tween 20 and then double serial dilutions of the oils were made. The inoculum was added to all wells and the plates were incubated at 37°C for 24 h. The bacterial growth was visualized by adding 20 μl

of 0.5% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) aqueous solution.⁹ Minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the oils that inhibited visible growth (red-colored pellet at the bottom of the wells after the addition of TTC), while the minimum bactericidal concentration (MBC) was defined as the lowest concentration that killed 99.9% of bacterial cells. To determine MBC, broth was taken from each well without visible growth and inoculated on Mueller Hinton agar for 24 h at 37°C. The experiments were done in triplicate.

Antibiotic susceptibility test. Susceptibility to a panel of antimicrobial agents was determined by the standardized disc diffusion assay on Mueller-Hinton agar with commercial antimicrobial susceptibility discs according to the recommendations of committee on standardization of susceptibility testing in veterinary medicine.^{10,11} The antibiotics tested and their corresponding disc concentrations were as follows: amoxicillin + clavulanic acid (20/10 µg), ampicillin (10 µg), gentamicin (10µg), tetracycline (10µg), colistin (10 µg), trimethoprim/ sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), ofloxacin (5 µg) and cefotaxime (30 µg). The plates were then incubated at 37 °C for 24h to 48h. The diameter of zone of inhibition was recorded and the data was interpreted using the recommendation of committee on standardization of susceptibility testing in veterinary medicine.^{10,11}

Antioxidant activity

Reducing power. The Fe³⁺ reducing power of essential oil was determined by the method of Yen and Duh¹² with some modifications. Essential oil was mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide. The mixture was incubated for 20 min at 50 °C. After incubation, 2.5 ml of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. The upper layer (1 ml) was mixed with 1 ml of distilled water and 0.5 ml of ferric chloride (0.1%). The absorbance of the obtained solution was measured at 700 nm. A higher absorbance indicates a higher reducing power. All

tests were carried out in triplicate. Quercetin and ascorbic acid were used as positive controls.

DPPH radical-scavenging assay. The capacity to scavenge the “stable” free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was assessed according to the method described previously.¹³ Two ml of various concentrations of essential oil of *M. spicata* was added to 0.4 ml solution of DPPH radical in ethanol (final concentration of DPPH was 0.5 mM). The mixture was shaken and kept in the dark for 30 min and the absorbance of the resulting solution was measured at 517 nm. Inhibition of free radical DPPH in percent (DPPH I%) was calculated as follows:

$$\text{DPPH I\%} = 100 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$$

where A_{blank} represents the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the tested compound), and A_{sample} represents the absorbance of the tested compound. Gallic acid, quercetin and ascorbic acid were used as positive controls.

Statistical analysis. The assays were performed in triplicate and the results were expressed as the mean values with standard deviations (SD). The significant differences were obtained by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s honestly significant difference (HSD) post hoc test ($p < 0.05$). These statistical analyses were calculated using R software (version 3.3.0/ 2016-05-03).

RESULTS AND DISCUSSION

The yield of the oil obtained from *M. spicata* was $1.97 \pm 0.09\%$. Our results are in agreement with those of Soković *et al.*^{14,15} They found that the yield of essential oil was 1.5 %. The yield of essential oils from *M. spicata* leaves harvested in three other regions of Algeria (Bejaia Saida and Setif) was 1.1%, 1.3% and 0.89%, respectively.^{7,16,17}

However, the extraction yield of Tunisian spearmint was 1.1%,⁵ Pakistan spearmint 1.2%,¹⁸ Indian spearmint ranged from 0.4 - 0.8%,¹⁹ and Bangladeshi spearmint was 0.33%.²⁰ On the other hand, Roldán *et al.*²¹ and Martins *et al.*²² have shown very lower rate with 0.08 and 0.1%, respectively.

However, *M. spicata* is known to have a minimum of 10 ml/kg of essential oil.²³

The difference in yield can be attributed to the harvest season of the plant when a high essential oil yield was seen in summer (when the plants were in full bloom) than in winter (when the plants reached the end of their growing cycle).^{7,24,25}

The composition of essential oils of *M. spicata* is presented in table 1. One hundred and sixteen compounds were identified accounting for 99.92% of the total amount. The main constituents were carvone (63.59%), followed by limonene (5.85%), dihydrocarvyl acetate (4.17%), 1,8-cineole + β -phellandrene (3.75%), trans-thujanol (2.74%), cis-dihydrocarvone (1.68%), β -caryophyllene (1.37%), terpinen-4-ol (1.23%), borneol (1.11%) and cis-carvyl acetate (1.07%).

There is large variation in the chemical composition of *M. spicata* between the wild as well as cultivated samples around the world. Indeed, a series of chemotypes have been described in previous studies. Recently, Brahmi *et al.*⁷ studied the chemical composition of *M. spicata* essential oil originating from Bejaia locality (Algeria) and reported that carvone (48.5%), limonene (20.8%), 1,8-cineole (5.4%), β -caryophyllene (3.4%), germacrene D (3.4%) and β -pinene (1.1%) as the major components. Likewise, Allali *et al.*¹⁶ reported carvone (48.42%), eucalyptol (17.6%) and neoisodehydrocarveol acetate (11.7%) as the main components of the essential oil collected from Saida (west northern region of Algeria). *M. spicata* collected from Amoucha, Setif locality (north east Algeria) showed carvone (59.40%) followed by limonene (6.12%), 1,8-cineole, germacrene-D (04.66%), β -caryophyllene (2.969 %), β -bourbonene (2.796 %), α -terpineol (1.986 %) and terpinen-4-ol (1.120 %) in its oils.¹⁷ *M. spicata* growing in other countries also contains carvone as one of the major components of its essential oil, e.g., Portugal (41.1%)²², Morocco (29.0%)²⁶, Bangladesh (73.29%)²⁰ and Serbia (49.52%).¹⁵

Nevertheless, Dhifi *et al.*²⁷ demonstrated an entirely different oil composition of *M. spicata*

harvested in Tunisia, where menthone (32.7%) and pulegone (26.6%) was found as the major constituents. Even, Telic *et al.*²⁸ in Turkey, reported linalool (82.8%) chemotype of *M. spicata*. The variations in chemical composition of the essential oils with respect to season might have been due to the influence of phenological status, and environmental conditions can influence the regulation of the biosynthesis of essential oil. Previous investigations have demonstrated that harvesting season can alter the chemical composition of the essential oils of *M. spicata*.²⁴ Other explanation for the differences in oil content and composition may be attributed to factors related to ecotype, phenophases, temperature, relative humidity, photoperiod, irradiance, genotype, and agronomic conditions (harvesting time, plant age, crop density).⁵ In addition, the duration of sunshine, the movement of air and precipitation can play roles in the difference in composition of essential oils.¹⁷

Two antioxidant assays have been used to evaluate the possible antioxidant properties of the spearmint oil, including ferric reducing power and DPPH radical scavenging activity. The results obtained (Table 2) confirm the previous reports about the importance of essential oils as natural antioxidants. Reducing power measures the ability of an antioxidant to donate an electron.²⁹ These antioxidants trap the free radicals, act on certain peroxide precursors, and prevent the peroxidation chain reaction.³⁰ The assayed sample was able to reduce the ferric ions (Fe^{3+}) to corresponding ferrous ions (Fe^{2+}). The EC_{50} value for spearmint essential oil was 2.28 ± 0.68 $\mu\text{g/ml}$ in comparison to 21.22 ± 1.66 $\mu\text{g/ml}$ and 13.98 ± 1.99 $\mu\text{g/ml}$ for the standard compound quercetin and ascorbic acid, respectively. Brahmi *et al.*⁷ and Snouci *et al.*⁵ reported that the EC_{50} value of the *M. spicata* essential oil harvested from north Algeria and northeast of Tunisia were about 452.3 ± 0.4 $\mu\text{g/ml}$ and 2.49 ± 0.07 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Table 1. Chemical composition of essential oil.

Pick	RT (min)	Components	%
1	7.2	Ethanol	0.1
2	10.5	α -Pinene	0.48
3	10.6	α -Thujene	0.08
4	11.4	Trans-2,5-diethyltetrahydrofuran	0.01
5	11.7	Ethyl 2-methylbutyrate	0.01
6	12.6	Camphene	0.2
7	14.7	β -Pinene	0.74
8	15.4	Sabinene	0.56
9	17.6	β -Myrcene	0.61
10	18.0	α -Phellandrene	0.01
11	18.2	ψ -Limonene	0.02
12	18.9	α -Terpinene	0.17
13	20.1	Limonene	5.85
14	20.9	1,8-cinaeole + β -phellandrene	3.75
15	21.2	1,3,8-p-menthatriene	0.03
16	21.4	2-hexenal	0.02
17	22.1	Cis- β -ocimene	0.18
18	23.1	γ -terpinene	0.34
19	23.3	Trans- β -ocimene	0.05
20	24.8	<i>p</i> -cymene	0.23
21	25.1	2-Methyl butyl 2- methyl butyrate	0.01
22	25.3	3-Heptanol	0.02
23	25.6	Terpinolene	0.1
24	28.9	1-Ethylhexyle acetate	0.12
25	30.5	Aliphatic ester	0.01
26	32.6	3-Octanol	0.4
27	33.3	Nonanal	0.03
28	35.9	Aliphatic ester	0.02
29	36.2	α , <i>p</i> -Dimethylstyrene	0.02
30	36.4	1-Octen-3-ol	0.06
31	37	Cis-1,2-limonene epoxide	0.01
32	37.8	Trans-thujanol	2.74
33	38	Trans-limonene 1,2- epoxide	0.06
34	38.4	Cis-2- hexenyl methyl butyrate	0.01
35	38.5	Menthone	0.01
36	39.3	3-Nonanol	0.01
37	39.4	Cis-3-hexenyl methyl butyrate	0.08
38	40.2	α -Copaene	0.02
39	40.3	Isomenthone	0.02
40	41.6	α -Bourbonene	0.03
41	42	β -Bourbonen	0.41
42	42.2	Dihydroedulan isomer	0.03
43	42.9	Linalool	0.03

44	43.1	Aliphatic alcohol	0.03
45	43.4	Cis-thujanol	0.21
46	43.6	1-Octanol	0.02
47	44.1	Isomeric limonene epoxide	0.01
48	44.4	Trans-p-menth-2-en-1-ol	0.1
49	45.7	ϵ -Cadinene	0.08
50	45.9	Bornyl acetate	0.09
51	46.5	β -Elemene	0.09
52	46.9	β -Cubebene	0.06
53	47.1	Terpinen-4-ol	1.23
54	47.3	β -Caryophyllene	1.31
55	48	Cis-dihydrocarvone	1.68
56	48.5	Cis-p-2,8-menthadien-1-ol	0.06
57	49.1	Trans-dihydrocarvone	0.15
58	49.8	Cadina-3,5-	0.1
59	50	Isomeric cadinadiene	0.05
60	50.2	Allo-aromadendrene	0.03
61	50.4	Trans-pinocarveol	0.02
62	50.9	E- β -Farnesene	0.04
63	51.2	Trans-p-2,8-menthadien-1-ol	0.05
64	51.3	δ -Terpineol	0.23
65	51.5	Dihydrocarvyl acetate	4.17
66	51.9	α -Humulene	0.14
67	52	Cis-4,5-Muuroadiene	0.47
68	52.3	Sesquiterpene	0.06
69	52.9	α -Terpineol	0.32
70	53.2	Borneol	1.11
71	54.4	Germacrene D	0.96
72	54.7	Dihydrocarveol isomer	0.16
73	55.4	Trans-carvyl acetate	0.03
74	56.1	Carvone	63.59
75	56.3	Bicyclogermacrene	0.4
76	56.9	δ -Cadinene	0.04
77	57.2	γ -Cadinene	0.07
78	57.5	Cis-carvyl acetate	1.07
79	58.1	Methyl salicylate	0.03
80	58.8	Nerol	0.02
81	58.9	Perillaldehyde	0.03
82	59.2	α -amorphene	0.09
83	59.3	Terpenic alcohol	0.04
84	59.9	Terpenic ester	0.02
85	60.9	Trans-carveol	0.21
86	61.5	Calamenene	0.35
87	61.6	p-cymen-8-ol	0.04
88	62	Carvone oxide	0.03
89	62.3	E-geranyl acetone	0.03
90	62.7	Cis-carveol	0.58

91	66.8	Piperitenone	0.2
92	67.7	Trans-jasmone	0.66
93	68.5	Piperitenone oxide	0.03
94	69	2-phenylethyle 2-methylbutyrate	0.02
95	69.9	Aliphatic ester + aromatic compound	0.05
96	70.4	Caryophyllen oxide	0.16
97	71.1	Sesquiterpenol	0.02
98	72.2	Sesquiterpenol	0.01
99	72.3	Sesquiterpenol	0.02
100	73.3	Germacra-1,5-dien-4-ol	0.05
101	73.9	Epi-cubenol	0.37
102	75.2	Methyl p-anisate	0.03
103	77.1	Spathulenol	0.17
104	78.8	Eugenol	0.08
105	79.4	T-Cadinol	0.07
106	80.2	α -Muurolol	0.03
107	80.7	Carvacol	0.03
108	81.5	α -Bisabolol	0.03
109	82.1	Isospathulenol isomer	0.03
110	82.4	α -Cadinol	0.27
111	84.7	Sesquiterpenol	0.07
112	85	Aromatic compound	0.02
113	85.6	Caryophylla-3,7-dien-6-ol	0.02
114	86.3	Aromatic compound	0.04
115	88.4	Sesquiterpenic epoxide	0.02
116	88.7	Sesquiterpenic epoxide	0.03
Total			99.92

DPPH assay has been widely used for the evaluation of free radical scavenging activity of plant extracts, food material or single compounds.³¹ It has been established that the bleaching of the DPPH solution increased regularly with increasing amount of polyphenols.²⁹ Table 2 summarizes the results of the antiradical activity expressed as percentage inhibition of DPPH. The IC₅₀ value for *M. spicata* essential oil was $21.19 \pm 7.17 \mu\text{g/mL}$ in comparison to the standard compound.

The IC₅₀ obtained in our study is superior to those cited by Snoussi *et al.*⁵ with a value of $3.08 \pm 0.07 \mu\text{g} / \text{ml}$, Hussain *et al.*¹⁸ showed the IC₅₀ value of $13.3 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$, and Dhifi *et al.*²⁷ ($10 \pm 0.24 \mu\text{g} / \text{ml}$) but much lower than those registered by Brahmi *et al.*⁷, Moldovan *et al.*³², Allali *et al.*¹⁶, Soni and Sosa³³, Ebrahimzadeh *et al.*³⁴ and Nickavar *et al.*³⁵ with $9544.6 \pm 0.196 \mu\text{g/ml}$, $151.05 \pm 1.95 \mu\text{g/ml}$,

$10620 \mu\text{g/ml}$, $170 \mu\text{g/ml}$, $105.8 \pm 3.98 \mu\text{g/ml}$ and $87.89 \mu\text{g/ml}$, respectively. Snoussi *et al.*⁵ and Soni and Sosa³³ showed that the essential oil IC₅₀ was lower than standards used, which is in agreement with our study. This interesting biological activity can be explained by the presence of the monoterpenes limonene, terpinolene, γ -terpinene, 1,8-cineole and carvone.⁵

Regarding the antibiotic susceptibility, all tested strains were resistant to ampicillin, amoxicillin + clavulanic acid, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole and ofloxacin (table 3). The antimicrobial activity of essential oil of *M. spicata* against Gram-negative bacteria associated with neonatal calves diarrhoea is shown in table 4.

In our study, the essential oil of *M. spicata* showed moderate activity against bacterial strains

selected. Results obtained from minimum inhibitory concentration method, indicated that *E. coli* F5, *E. coli* CS31A, *Salmonella* spp., *Kluyvera* spp. and *Klebsiella* spp. were the most sensitive bacteria among microorganisms tested, with lowest MIC values (2.37 mg/ml). The lowest activity was

observed for *E. coli* F17 with highest MIC value (>9.5 mg/mL). The value of MBC 9.5 mg / ml were sufficient to kill *E. coli* CS31A and *Klebsiella* spp., whereas higher values of MBC (> 9.5 mg/ml) are needed to kill others bacteria tested in this study.

Table 2. Antioxidant activity of essential oil of *M. spicata* in reducing power and DPPH assays.

	Reducing power (EC ₅₀) µg/ml	DPPH (IC ₅₀) µg/ml
Quercetin	21.22 ± 1.66 ^c	12.02 ± 1.3 ^{a,b}
Gallic acid	-	5.39 ± 0.41 ^b
Ascorbic acid	13.98 ± 1.99 ^b	6.19 ± 0.97 ^b
Essential oil of <i>M. spicata</i>	2.28 ± 0.68 ^a	21.19 ± 7.17 ^a

Each value in the table is represented as mean ± SD (n = 3). Means not sharing the same letter are significantly different (LSD) at P < 0.05 probability level in each column

Table 3. Antimicrobial susceptibility of selected microbial strains.

Antibiotic	A	B	C	D	E	F	G
Ampicillin (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R
Amoxicillin+ clavulanicacid (20/10 µg)	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicin (10 µg)	R	R	R	R	S	I	S
Tetracycline (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R
Colistin (10 µg),	S	R	R	S	S	S	R
Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg)	R	R	R	R	R	R	R
Ofloxacin (5 µg)	R	R	R	R	R	R	R
Cifotaxime (30 µg)	S	S	R	S	S	I	R

A: *E. coli* F5, B: *E. coli* F17, C: *E. coli* CS31A, D: *Klebsiella* spp., E: *Kluyvera* spp., F: *Salmonella* spp., G: *Serratia* spp.

Table 4. Antimicrobial activity of essential oils of *M. spicata*.

Bacteria	Essential oil of <i>M. spicata</i> (mg/ml)	
	MIC	MBC
<i>Serratia</i> spp.	4.75	> 9.5
<i>Salmonella</i> spp.	2.37	> 9.5
<i>Kluyvera</i> spp.	2.37	> 9.5
<i>Klebsiella</i> spp.	2.37	9.5
<i>E. coli</i> F5	2.37	> 9.5
<i>E. coli</i> F17	> 9.5	> 9.5
<i>E. coli</i> CS31A	2.37	9.5

Many previous studies reported a small MIC ranging from 0.21 ± 0.01mg/ml, 0.345 ± 0.01mg/ml to 0.349 ± 0.008 mg/ml against *E. coli*.^{18,24} Likewise, Martins *et al.*²² showed the MIC values ranging from

250 µg/ml to 500 µg/ml against *E. coli*, *Salmonella enteritidis* and *Klebsiella pneumoniae*. The lowest value of MIC < 3.5µg/ml was reported by Sarer *et al.*³⁶

M. spicata essential oil was detected as active against only *Klebsiella* spp. and *E. coli* CS31A with MBC of 9.5 mg/ml. Similar results were reported by Roldan *et al.*²¹ against *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* ATCC13076 and *Salmonella typhimurium* ATCC14028. However, Sokovic *et al.*¹⁴ signalled lowest result of MBC (3 µg/ml). The antibacterial activity of *M. spicata* essential oil could be attributed to the presence of carvone and limonene. It has been reported that carvone is one of the most efficient antimicrobial agents of various plants. The mechanism of antibacterial activity of carvone is not completely understood in great detail. It has been demonstrated that the mechanism of action of carvone on the growth of microorganisms includes the destabilization of the phospholipid bilayer structure, interaction with membrane enzymes and proteins,⁶ it act as a proton exchanger reducing the pH gradient across the membrane^{6,37} and probably it could act by disrupting the metabolic energy state of the cells. In contrast, another study found that carvone was ineffective against the outer membrane of *E. coli* and *S. typhimurium* and did not affect their intracellular ATP pool.³⁷

The present study revealed that the main component of the essential oil of *M. spicata* cultivated in the Tiaret region was the carvone, which is well corroborated with the results obtained in other Algerian regions. The essential oil of *M. spicata* showed a strong antioxidant activity and a weak to moderate antibacterial activity. These bioactivities are mainly due to the high content of carvone, in this species.

Authors contributions

Selles SMA supervised, controlled the laboratory work and wrote the first draft. Ait Amrane Ammar and Kouidri M designed the manuscript. Belhamiti TB and Benia AR helped to analyse experimental results. Bellik Y helped in data interpretation and discussion. Hammoudi SM and Boukraa I revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Roopnarine, R., Ammons, D. and Adesiyun, A.A. 2009. Frequency of antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from dairy farms in Trinidad by source and presence of virulence markers. *Vet. Archiv.* **79**, 229-243.
2. Ashraf, M.A., Younis, E.E.A., Osman, S.A., Ishida, Y., El-khodery, S.A. and Shimamoto T. 2009. Genetic analysis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. *Vet. Microbiol.* **136**, 397-402.
3. Padmini, E., Valarmathi, A. and Rani, M.U. 2010. Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha spicata* and *Camellia sinensis* E. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* **1**, 772- 781.
4. Tsai, M.L., Wu, C.T., Lin, T.F., Wei-Chao Lin, W.C., Huang, Y.C. and Chao-Hsun Yang, C.H. 2013. Chemical composition and biological properties of essential oils of two mint species. *Trop. J. Pharm. Res.* **12**, 577 -582.
5. Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A. and De Feo, V. 2015. *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. strains. *Molecules* **20**, 14402-14424.
6. Shahbazi, Y. 2015. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. *J. Pathog.* **2015**, 916305. doi: 10.1155/2015/916305
7. Brahmi, F., Adjaoud, A., Marongiu, B., Falconieri, D., Yalaoui-Guellal D., Madani, K. and Chibane, M. 2016. Chemical and biological profiles of essential oils from *Mentha spicata* L. leaf from Bejaia in Algeria. *J. Essent. Oil. Res.* **28**, 211-220.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Test, 9th International Supplement*. M100-S9, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Radulovic, N., Dekic, M., Radic, Z. S. and Palic, R. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turk. J. Chem.* **35**, 499-512.
10. MoARD. 2008. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), p. 83.
11. MoARD. 2011. *Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations*. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), pp. 181-182.
12. Yen, G. C. and Duh, P. D. 1993. Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **70**, 383-386.

13. Tien, Y.Y., Ng, C.C., Chang, C.C., Tseng, W.S., Kotwal, S. and Shyu, Y.T. 2005. Studies on the lactic-fermentation of sugar apple (*Annona squamosa* L.) puree. *J. Food. Drug. Anal.* **13**, 377-381.
14. Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D. and Van Griensven, L. J. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules* **15**, 7532-7546.
15. Soković, M., Marin, P.D., Brkić, D. and Van Griensven, L.J. 2008. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food* **1**, 220-226.
16. Allali, H., Chikhi, I., Dib, M. E., Muselli, A., Fekih, N., N.Meliani, M. Kamal, A., Tabti B. and Costa, J. 2013. Antioxidant activity and chemical analysis of *Mentha spicata* cultivated from west northern region of Algeria by headspace solid phase micro-extraction and hydro-distillation. *Nat. Prod. I. J.* **9**, 258-263.
17. Boukhebt, H., Chaker, A. N., Belhadji, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer H. and Harzallah, D. 2011. Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Pharm. Lett.* **3**, 267-275.
18. Hussain, A. I., Anwar, F. and Shahid, M. 2010. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. *J. Essent. Oil. Res.* **22**, 78-84.
19. Padalia, R. C., Verma, R. S., Chauhan, A., Sundaresan, V. and Chanotiya, C. S. 2013. Essential oil composition of sixteen elite cultivars of *Mentha* from western Himalayan region, India. Maejo. *Int. J. Sci. Technol.* **7**, 83-93.
20. Chowdhury, J. U., Nandi, N. C., Uddin, M. and Rahman, M. 2007. Chemical constituents of essential oils from two types of spearmint (*Mentha spicata* L. and *M. cardiaca* L.) introduced in Bangladesh. *Bangl. J. Sci. Ind. Res.* **42**, 79-82.
21. Roldán, L. P., Gonzalo, J., Díaz, G. J. and Durringer, J. M. 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils obtained from plants of the *Lamiaceae* family against pathogenic and beneficial bacteria. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* **23**, 451-461.
22. Martins, M.R., Tinoco, M.T., Almeida, A.S. and Cruz-Morais, J. 2012. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of three essential oils from Portuguese flora. *J. Pharmacogn.* **3**, 39-44.
23. Bruneton, J. 2009. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier, Paris, p. 637.
24. Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M. and Gilani, A. H. 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci. Food. Agric.* **90**, 1827-1836.
25. Kofidis, G., Bosabalidis, A. and Kokkini, S. 2004. Seasonal variation of essential oils in a linalool-rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *J. Essent. Oil. Res.* **16**, 469-472.
26. Znini, M., Bouklah, M., Majidi, L., Kharchouf, S., Aouniti, A., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Costa, J. and Al-Dyab, S. S. 2011. Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. *Int. J. Electrochem. Sci.* **6**, 691-704.
27. Dhifi, W., Jelali, N., Mnif, W., Litaïem, M. and Hamdi, N. 2013. Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata* from Tunisia and its biological activities. *J. Food. Biochem.* **37**, 362-368.
28. Telci, I., Sahbaz, N., Yilmaz, G. and Tugay, M. E. 2004. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. *Econ. Bot.* **58**, 721-728.
29. Lim, T. T. and Tee, J. J. 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. *Food. Chem.* **103**, 1003-1008.
30. Bellik, Y. and Selles, S.M. A. 2017. In vitro synergistic antioxidant activity of honey-*Mentha spicata* combination. *J. Food. Meas. Charact.* **11**, 111-118.
31. Lo Scalzo, R. 2008. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food. Chem.* **107**, 40-43.
32. Moldovan, R. I., Oprean, R., Benedec, D., Hanganu, D., Duma, M., Oniga, I. and Vlase, L. 2014. LC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities for five species of *Mentha* cultivated in Romania. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* **9**, 559-566.
33. Soni, A. and Sosa, S. 2013. Phytochemical analysis and free radical scavenging potential of herbal and medicinal plant extracts. *J. Pharmacog. Phytochem.* **2**, 22-29.
34. Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M. and Nabavi, S. F. 2010. Biological activities of *Mentha spicata* L. *Pharmacology Online* **1**, 841-848.
35. Nickavar, B., Alinaghi, A. and Kamalinejad, M. 2008. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iran. J. Pharm. Res.* **7**, 203-209.
36. Sarer, E., Yağmur-Toprak, S., Otlu, B. and Durmaz, R. 2011. Composition and Antimicrobial activity of the essential oil from *Mentha spicata* L. subsp. *spicata*. *J. Essent. Oil. Res.* **23**, 105-108.
37. Nazzaro, F., Fratianni, F., de Martino, L., Coppola, R. and de Feo, V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* **6**, 1451-1474.

UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN

Polish
Journal
of
Natural
Sciences

(2/2018) **33**



PUBLISHER UWM
OLSZTYN 2018

**PHYSICOCHEMICAL AND ANTIOXIDANT
PROPERTIES OF ALGERIAN HONEYS AND THEIR
ANTIBACTERIAL POTENCY AGAINST THREE
STRAINS OF *E. COLI****

***Sidi Mohammed Ammar Selles*^{1,2,3}, *Yuva Bellik*⁴,
*Mokhtaria Kouidri*², *Belkacem Tahar Belhamiti*^{1,2},
Amar Ait Amrane^{1,2}, *Si Mohamed Hammoudi*¹,
Laid Boukrâa^{1,2}**

¹ Laboratory of Research on Local Animal Products

² Institute of Veterinary Science

Ibn-Khaldoun University of Tiaret in Tiaret, Algeria

³ Faculty of Life and Nature Sciences

Mascara University in Mascara, Algeria

⁴ Faculty of Life and Nature Sciences

Mohamed El Bachir El Ibrahimy University in Bordj Bou Arreridj, Algeria

Key words: Algerian honey, physicochemical, antioxidant, antibacterial properties, enteropathogenic, bacteria.

Abstract

The aim of the present study was to investigate the physicochemical, the antioxidant and the antibacterial properties of three Algerian honeys (*Eucalyptus*, Wild carrot and Multifloral). Several physicochemical parameters including moisture content, pH, electrical conductivity (EC), Hydroxymethylfurfural (HMF), invertase number and diastase number were measured. Total phenolic contents, reducing power and ABTS scavenging activity were determined. The agar incorporation method was used to determine the antibacterial activity of honeys against three strains of *E. coli* isolated from diarrhea in young calves. The results showed that moisture contents vary from 15.4% to 18.0%, pH values ranged between 4.19 and 4.34, HMF contents ranged between 11.2 and > 100 mg kg⁻¹, invertase number showed values of 3.2 and 20.7, electrical conductivity ranged between 0.38 and 1.1 mS cm⁻¹ and diastase number was detected only in Wild carrot honey (11.3). This honey showed the highest level of polyphenols (850.48 ± 167.29 mg gallic acid/kg) and the highest reducing power (0.771 ± 0.141), while *Eucalyptus* honey showed the best ABTS scavenging activity (1.7637 ± 0.8596 mmol Eq Trolox/L⁻¹). A strong

Address: Selles Sidi Mohammed Ammar, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria, phone: +213 554 200 199, e-mail: nuider10@yahoo.fr

* None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organization that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

correlation was found between total phenolic content and reducing power (r value was 0.875 and $P < 0.001$). All honeys were effective against all the tested strains with Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of 7% and 8%. *Eucalyptus* honey was bactericide against all the tested strains. This study demonstrated remarkable variation in antioxidant properties of honey depending on its botanic or geographic origin. It also revealed that Algerian honeys exhibit a strong antibacterial activity.

FIZYKOCHEMICZNE I ANTYOKSYDACYJNE WŁAŚCIWOŚCI ALGIERSKICH MIODÓW ORAZ ICH POTENCJAŁ ANTYBAKTERYJNY WOBEC TRZECH SZCZEPÓW *E. COLI*

Sidi Mohammed Ammar Selles^{1,2,3}, *Yuva Bellik*⁴, *Mokhtaria Kouidri*²,
Belkacem Tahar Belhamiti^{1,2}, *Amar Ait Amrane*^{1,2}, *Si Mohamed Hammoudi*¹,
Laid Boukrâa^{1,2}

¹ Laboratorium Badań nad Lokalnymi Produktami Zwierzęcymi

² Instytut Weterynarii

Uniwersytet Ibn-Khaldouna, Tijarat, Algeria

³ Wydział Nauk Przyrodniczych

Uniwersytet Mustafy Stambouliego z Mu'askaru, Mu'askar, Algeria

⁴ Wydział Nauk Przyrodniczych

Uniwersytet Mohameda El Bachir El Ibrahimy, Bordj Bou Arreridj, Algeria

Słowa kluczowe: miód algierski, właściwości fizykochemiczne, antyoksydacyjne, antybakteryjne, enteropatogenne szczepy bakterii.

Abstract

Celem badań było określenie fizykochemicznych, antyoksydacyjnych oraz antybakteryjnych właściwości trzech gatunków algierskich miodów (eukaliptusowego, z dzikiej marchwi oraz wielokwiatowego). W miodach oznaczono: zawartość wody, pH, przewodność elektryczną, zawartość hydroksymetylofurfuralu (HMF), aktywność inwertazy, liczbę diastazową, całkowitą zawartość związków polifenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą. Określono również właściwości antybakteryjne analizowanych miodów wobec trzech szczepów *E. coli*. Stwierdzono, że zawartość wody w badanych miodach wynosiła od 15.4% do 18.0%, a wartości pH – od 4.19 do 4.34, natomiast zawartość HMF – od 11.2 do > 100 mg kg⁻¹. Liczba inwertazowa wynosiła od 3.2 do 20.7, a przewodność elektryczna od 0.38 do 1.1 mS cm⁻¹, natomiast liczbę diastazową określono jedynie dla miodu z dzikiej marchwi (11.3). Ten gatunek miodu charakteryzował się najwyższą zawartością polifenoli ogółem (średnio 850.48 mg kg⁻¹ w przeliczeniu na kwas galusowy) oraz najwyższą siłą redukującą (średnio 0.771). Z kolei miód eukaliptusowy wykazał najwyższą aktywność przeciwrodnikową w układzie ABTS (średnio 1.7637 mmol Eq Trolox L⁻¹). Silne związki korelacyjne stwierdzono między całkowitą zawartością związków fenolowych i siłą redukującą ($r = 0.875$; $P < 0.001$). Wszystkie badane miody wykazywały aktywność antybakteryjną wobec testowanych szczepów bakterii (MIC 7% i 8%), przy czym miód eukaliptusowy charakteryzował się aktywnością antybakteryjną wobec wszystkich trzech szczepów *E. coli*. Wykazano zróżnicowanie właściwości przeciwutleniające badanych miodów zależne od ich pochodzenia botanicznego i geograficznego. Stwierdzono również, że algierskie miody wykazują silne właściwości antybakteryjne.

Introduction

Antibiotic-resistant bacteria pose a very serious threat to public health. Nowadays, the most critical problem facing modern medicine is the rapid emergence of many strains of antibiotic-resistant bacteria (WANG et al. 2012). In addition, the problem of drug resistance is not restricted to pathogenic bacteria but it also involves the commensal bacterial flora that may become a major reservoir of resistant strains (ERB et al. 2007). A number of epidemiological studies demonstrated that resistance does not only concern hospitals but resistant bacteria continue to occur among various groups in the community including pig-breeding, chicken, and cattle, ... etc.

Diarrhea of neonatal calves is a major problem in breeding farms because they often recorded heavy losses and higher rate of morbidity and mortality during calving period (AKAM et al. 2011). The most commonly pathogens incriminated in neonatal calf scours include viral (*rotavirus* and *coronavirus*), protozoal (*Cryptosporidium parvum*) and bacterial pathogens (enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 and *Salmonella* spp.) (IZZO et al. 2011). Among bacteria, enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) can cause severe diarrhea in newborn calves via the production of a heat-stable enterotoxin (STa). The most common observed fimbriae on EPEC in calves with diarrhea are K99 (F5) and F41, although, strains with F17 fimbriae have been also isolated (NGUYEN et al. 2011).

The use of honey as a traditional remedy for microbial infections dates back to ancient times (BOUKRÁA and BELLIK 2011). The Holy Hadith records the Muslim prophet Mohammed instructing a man afflicted with diarrhea to take honey. The Roman physician Celsus, (c. 25 AD) used honey as a cure for diarrhea (MOLAN 1999). The healing property of honey is due to its chemical composition (ARVANITOYANNIS et al. 2005). Honey contains abundant amounts of polyphenols and flavonoids which confer it good antimicrobial properties. The antimicrobial action is due to its high osmolarity, low pH, hydrogen peroxide content, and some minor uncharacterized compounds (ALZHRANI et al. 2012a, BERETTA et al. 2005).

The antibacterial nature of honey is dependent on various factors working either singularly or synergistically, the most salient of which are: hydrogen peroxide (produced by the glucose oxidase added to honey by bees), phenolics and aliphatic hydroxy acids of royal jelly and unsaturated dicarboxylic acids, acidity of honey, and the osmotic pressure exerted by honey (ISODOROV et al. 2015). KWAKMAN et al. (2010) reported that the bactericidal activity of honey is due to its high sugar concentration, H_2O_2 , the 1,2-dicarbonyl compound methylglyoxal (MGO), the cationic antimicrobial peptide bee defensin-1 and the low pH.

The objective of the present study is to investigate the physicochemical, the antioxidant properties and the antibacterial activity of three varieties of Algerian honeys from different botanical and geographical origin.

Material and Methods

Honey samples

Three local Algerian honey samples (AH1, AH2 and AH3) were purchased from beekeepers in three different geographic area of Algeria (Tlemcen district, Mostaganem district and Chelef district, respectively), and classified according to their botanical origin using acetolysis according to the Erdtman acetolysis method (ERDTMAN 1969). The studied honeys were *Eucalyptus* honey (AH1), Multifloral honey (AH2) and *Daucus carota* or Wild carrot honey (AH3). The three honey samples used in this study were stored at room temperature (22–24°C) in airtight plastic containers until analysis.

Physicochemical analysis

Physicochemical analysis was realized in CARI ASBL (Beekeeping Center for Research and Information, Louvain-la-Neuve, Belgium). Briefly, moisture in honeys was determined using a refractometer at 20°C. The pH value was measured by a pH meter. Hydroxymethylfurfural (HMF) content was measured according to the method of Winkler and the results were expressed in milligrams per kilogram [mg kg^{-1}]. Invertase number was determined by a spectrophotometer at 400 nm. Diastase number was measured according to the method of Phadebas and electrical conductivity was determined with a conductivity meter, the result was expressed in mS cm^{-1} .

Bacterial analysis

Bacterial strains and inoculum standardization

The antibacterial properties of the honeys samples were tested against *Escherichia coli* F5, *Escherichia coli* F17 and *Escherichia coli* CS31A isolated from neonatal calves with diarrhea. Prior to the experiment the strains were inoculated onto the surface of Mac Conkey agar media; the inoculum suspensions were obtained by taking five colonies from 24 h cul-

tures. The colonies were suspended in 5 mL of sterile saline (0.85% NaCl) and shaken for 15 seconds. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard (equivalent to $1-5 \cdot 10^8$ cfu mL⁻¹).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) measurement

By using the incorporation method, concentrations of honey between 5% and 10% (v/v) were added into Mueller Hinton agar media to test their efficiency against bacteria. The final volume of honey and media in each plate (60 mm) was 5 ml. The plates were inoculated and incubated at 37°C for 24 h. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by recording the plates with the lowest concentration of honey on which the strain would not grow. Tests were achieved in triplicate. All MIC values are expressed in percentage (v/v).

Antibiotic susceptibility test

Susceptibility to a panel of antimicrobial agents was determined by the standardized disc diffusion assay on Mueller-Hinton agar using commercial antimicrobial susceptibility discs according to the recommendations of the Standardization of Antimicrobial Susceptibility Testing in the Veterinary Medicine at the national level, according to WHO recommendations (MOARD 2008 and 2011). The plates were inoculated and the antibiotic discs were placed on their surface. The tested antibiotics and their corresponding disc concentrations were as follows: Amoxicillin+ acid clavulanic (20/10 µg), Ampicillin (10 µg), Gentamicin (10 µg), Tetracycline (10 µg), Colistin (10 µg), Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), Ofloxacin (5 µg) and Cefotaxime (30 µg). The plates were then incubated at 37°C for 24h to 48h. The zone of inhibition was recorded and the data was interpreted using the Standardization of Antimicrobial Susceptibility Testing in the Veterinary Medicine at the national level, according to WHO recommendations (MOARD 2008 and 2011).

To establish whether the antibacterial activity of the tested honey samples was bacteriostatic or bactericidal, the plates where bacterial growth, with the corresponding concentration of honey, was inhibited were scraped by sterile swabs and plated on to nutrient agar. Plates with visible colony growth were considered to correspond to bacteriostatic honey activity while those with no growth were recorded as representing bactericidal honey activity.

Antioxidant activity

Total Phenol Content (TPC)

Total phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu method as described by BERETTA et al. (2005). One g of honey was treated with distilled water (10 mL), mixed and filtered using a qualitative filter (filter paper Whatman No. 40, Cambridge, England). An aliquot of this solution (200 μ L) was mixed with Folin-Ciocalteu reagent (500 μ L, 10%) for 5 min, and then a solution of Na_2CO_3 (1500 μ L, 7.5%) was added. All samples were incubated at room temperature in the dark conditions for 30 min, and the absorbance of blue mixtures was recorded at 765 nm using a double beam UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu UV-Vis 1202, Japan). Total phenolic content was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/kg of honey from a calibration curve using the equation: $y = 0.0094x + 0.029$ ($R^2 = 0.998$) where y is absorbance and x the concentration.

Reducing power

Ferric reducing power of honey varieties was determined by the method of YEN and DUH (1993). Each sample of honey was mixed with 2.5 ml of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 ml of 1% potassium ferricyanide. The mixture was incubated for 20 min at 50 °C. After incubation, 2.5 ml of trichloroacetic acid (10%) was added to the mixture followed by a centrifugation at 3000 rpm for 10 min. The upper layer (1 ml) was mixed with 1 ml of distilled water and 0.5 ml of ferric chloride (0.1%). The absorbance of the obtained solution was measured by spectrophotometer (Shimadzu UV-Vis 1202, Japan) at 700 nm. A higher absorbance indicates a higher reducing power.

Total antioxidant status (ABTS scavenging activity)

Total antioxidant status was measured by using radical cation decolorization assay (RE al. 1999). This assay based on the inhibition by antioxidants of the absorbance of the free radical cation from ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) diammonium salt. ABTS was incubated with potassium persulfate in order to produce the free radical cation ($\text{ABTS}^{\circ+}$). In brief, ABTS was dissolved in deionized water to make a 7 mmol L^{-1} concentration solution. $\text{ABTS}^{\circ+}$ was produced by mixing ABTS stock solution with 2.45 mmol L^{-1} potassium persulfate (final concentration) and the mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 12–16 h before use. In our study, the $\text{ABTS}^{\circ+}$ solution was

diluted with PBS (Phosphate buffer solution), pH 7.4, to an absorbance of 0.70 (± 0.02) at 734 nm. After addition of 2 mL of diluted ABTS^{•+} to 20 μ L of honey sample in PBS, the absorbance reading was taken exactly 6 min after initial mixing. PBS blank were run in each assay. Trolox was used as standard. Radical scavenging activity was expressed as mmol Eq Trolox L⁻¹.

Statistical analysis

All experiments were carried out in triplicate and the results were expressed as the mean values with standard deviations (SD). The significant differences were obtained by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) post hoc test ($P < 0.05$). Correlations were established using Pearson's correlation coefficient (r) in bivariate linear correlations ($P < 0.01$). These correlations were calculated using Systat 12 (version 12.00.08).

Results

The results of the pollen analysis obtained by acetolysis according to the Erdtman acetolysis method (ERDTMAN 1969) for three honey samples are shown in Table 1. The frequency classes of pollen grains are given as predominant pollen (> 45%), secondary pollen (16–45%) and minor pollen (< 15%). The botanical families Myrtaceae, Apiaceae, Cistaceae and Asteraceae were the most frequent in the honey samples.

Table 1

Pollen types present in the honey samples [%]

Samples	Samples predominant pollen > 45%	Secondary pollen 10–45%	Minor pollen < 10%
AH1 : Tlemcen district	Eucalyptus (75%)	–	Acacia, Brassicaceae, Ericaceae, Cistaceae, Lamiaceae, Asteraceae Type Dandelion, Rosaceae, Apiaceae, Asteraceae
AH2 : Mostaganem district	–	Apiaceae (42%), Asteraceae (22%) and Cistaceae (16%)	Chenopodiaceae, Plantaginaceae, Poaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Rosaceae, Brassicaceae
AH3 : Chelef district	Wild carrot (74%)	Myrthacées (12%)	Acacia, Chenopodiaceae, Cistaceae, Plantain, Poaceae, Renunculaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Rosaceae, Apiaceae

Table 2 summarizes the physicochemical values of the studied honey varieties. AH1 (*Eucalyptus* honey) presented the lowest moisture and HMF contents and the highest values of pH and electrical conductivity. On the contrary, AH2 (Multifloral honey) showed the lowest pH and the highest value of moisture content, HMF and invertase number. While AH3 (Wild carrot honey) presented the lowest invertase number and moisture content and the highest amount of HMF and diastase number.

Table 2

Physicochemical properties of the studied honey

Honey Variety	pH		Moisture content [%]		HMF mg kg ⁻¹	
	Value	Difference	Value	Difference	Value	Difference
AH1	4.34	AH1-AH2	15.4	AH1-AH2	11.2	AH1-AH2***
AH2	4.19	AH1-AH3	18.0	AH1-AH3***	18.2	AH1-AH3***
AH3	4.31	AH3-AH2	15.4	AH3-AH2	> 100	AH3-AH2***
Honey variety	Invertase number		Diastase number		Electrical conductivity mS cm ⁻¹	
	Value	Difference	Value	Difference	Value	Difference
AH1	16.7	AH1-AH2	ND	AH1-AH2	1.1	AH1-AH2***
AH2	20.7	AH1-AH3	ND	AH1-AH3	0.81	AH1-AH3***
AH3	3.2	AH3-AH2***	11.3	AH3-AH2	0.38	AH3-AH2***

ND – no determined

In each column, difference with “***” indicate significant differences at $P < 0.001$.

Table 3 summarizes the results concerning total phenolic contents, reducing power and total antioxidant status of the tested honeys. AH3 presented the highest phenolic content and ferric reducing capacity, but the lowest scavenging activity against ABTS^{o+} free radical. We noticed that AH1 showed the best scavenging activity against ABTS^{o+} free radical even its total phenolic content and reducing power were the lowest when compared to the other honey samples (AH2 and AH3)

Table 3

Total phenolic contents (TPC), reducing power (PR) and total antioxidant status (TAS) of the tested honeys

Honey Variety	TPC [mg gallic acid kg ⁻¹]		Reducing power (PR) [ABS _{700 nm}]		TAS [mmol Eq Trolox L ⁻¹]	
	Mean ± SD	Difference	Mean ± SD	Difference	Mean ± SD	Difference
AH1	679.49 ± 90.17	AH1-AH2	0.6819 ± 0.052	AH1-AH2	1.7637 ± 0.8596	AH1-AH2
AH2	736.95 ± 115.09	AH1-AH3*	0.7372 ± 0.081	AH1-AH3	1.3678 ± 0.3369	AH1-AH3*
AH3	850.48 ± 167.29	AH3-AH2	0.771 ± 0.141	AH3-AH2	0.9623 ± 0.2691	AH3-AH2

SD – standard deviation

In each column, difference with “*” indicate significant differences at $P < 0.05$.

A positive and statistically significant correlation ($P < 0.001$) was observed between total phenolic content and reducing power (Table 4).

Table 4
Correlation matrix showing the interrelation between total phenolic content, reducing power and total antioxidant status

Specification	TPC	PR	TAS
TPC	1.000	–	–
PR	0.875***	1.000	–
TAS	-0.112	-0.239	1.000

*** Correlation is significant at the $P < 0.001$.

In terms of the antibiotic susceptibility, all tested strains were susceptible to Cifotaxime but they exhibited resistance to the majority of the tested antibiotics (Table 5).

Table 5
Antibiotic susceptibility of the tested strains

Antibiotic	<i>E. coli</i> F5	<i>E. coli</i> F17	<i>E. coli</i> CS31A
Ampicillin (10 µg)	R	R	R
Amoxicillin + acid clavulanic (20/10 µg)	R	R	R
Gentamicin (10 µg)	R	R	S
Tetracycline (10 µg)	R	R	R
Colistin (10 µg)	R	R	R
Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg)	R	R	R
Ofloxacin (5 µg)	R	R	R
Cifotaxime (30 µg)	S	S	S

Table 6 summarizes the MIC [%] of the studied honey varieties against three strains of *E. coli* responsible of diarrhea in young calves. The MIC of all honey varieties against the tested strains was 7%, except that AH2 on *E. coli* CS31A which was 8%. The bactericidal or the bacteriostatic effect of honeys varied considerably according to the variety of honey (Table 7). AH1 showed a bactericidal effect against the three strains of bacteria. Whereas AH2 exhibited a bactericidal effect against *E. coli* F5 and *E. coli* F17 and a bacteriostatic effect against *E. coli* CS31A. AH3 exerted a bactericidal effect only on *E. coli* F17 and a bacteriostatic effect against *E. coli* F5 and *E. coli* CS31A.

Table 6

The antibacterial potency of honeys against the tested strains

Honey variety	MIC% of the three varieties against the tested microbes		
	<i>E. coli</i> F5	<i>E. coli</i> F17	<i>E. coli</i> CS31A
AH1	7	7	7
AH2	7	7	8
AH3	7	7	7

Table 7

Bacteriostatic/bactericidal activity of honeys against the tested strains

Honey variety	Bacteriostatic/bactericidal activity of honeys against the tested microbes		
	<i>E. coli</i> F5	<i>E. coli</i> F17	<i>E. coli</i> CS31A
AH1	bactericidal	bactericidal	bactericidal
AH2	bactericidal	bactericidal	bacteriostatic
AH3	bacteriostatic	bactericidal	bacteriostatic

Discussion

Honey is rich in properties that result from its chemical composition. The variation of the physicochemical properties of honey depends on the nectar and pollen of the plant source, color, moisture, and protein and minerals contents (WHITE 1978). The pH value has great importance during honey extraction and storage, due to influence on texture, stability and endurance (TERRAB et al. 2002). In our study, all of the investigated honey samples were acid (pH 4.19–4.34). Among all the honey types, Multifloral honey was the most acidic (pH 4.19). Our results are similar to those reported by other researches for Algerian (OUCHEMOUK et al. 2007), Moroccan (NAMAN et al. 2005), Slovak (KASPEROVÁ et al. 2012), Indian (SAXENA et al. 2010), and Portuguese (GOMES et al. 2010) honeys with values ranging between 3.49–4.43, 3.8–4.5, 3.83–4.72, 3.7–4.4 and 3.7–4.3, respectively. The obtained results were slightly higher to those reported by MONIRUZZAMAN et al. (2013a) and MONIRUZZAMAN et al. (2013b) with values ranging between 3.53–4.03 and 3.83–4.10 and KHALIL et al. (2012) who obtained pH values of 3.7–4.0.

Moisture is a parameter related to the maturity degree of honey and temperature. In the present study, moisture values ranged between 15.4% and 18%. All tested honeys showed moisture contents below 20%, which is the maximum prescribed limit ($\leq 20\%$) by European Community regulations (The Council of the European Union 2002). The moisture contents

of the analyzed honey samples were consistent with those previously reported for Algerian honeys with values ranging between 14.64 to 19.04% (OUCHEMOUK et al. 2007) and 11.59 to 14.13% (KHALIL et al. 2012), Malaysian honey (14.16 to 17.53%) (MONIRUZZAMAN et al. 2013b), Portuguese honey (15.9–17.2%) (GOMES et al. 2010), Moroccan honey (14.3 to 20.2%) (CHAKIR et al. 2016), and Indian honey (17.2–21.6%) (SAXENA et al. 2010). It is worth noting that the moisture content of honey can be affected by climate, season and moisture content of plant source (OUCHEMOUK et al. 2007).

Hydroxymethylfurfural (HMF) content is widely recognized as a parameter of honey samples freshness because it is absent in fresh honeys and tends to increase during processing and/or aging of the product. Several factors influence the levels of HMF such as temperature and time of heating, storage conditions, pH and floral source; therefore HMF provides an indication of overheating and storage in poor conditions (GOMES et al. 2010, MONIRUZZAMAN et al. 2013a). AH3 contained a high level of HMF ($>100 \text{ mg kg}^{-1}$), which exceeded the limit established by Codex Alimentarius (ALINORM 01/25 2000); this honey was probably stored for more than one year. The concentrations of HMF for AH1 and AH2 were 11.2 mg kg^{-1} and 18.2 mg kg^{-1} , respectively; these concentrations were within the recommended range set by the Codex Alimentarius at 80 mg kg^{-1} . Others studied Algerian honeys and reported higher concentrations of HMF ($15.23\text{--}24.21 \text{ mg kg}^{-1}$) (KHALIL et al. 2012). Likewise, MAKHLOUFI et al. (2010) recorded a higher concentration of HMF for *Eucalyptus* honey (25.63 mg kg^{-1}) and a low concentration of HMF for Multifloral honey (17.18 mg kg^{-1}).

In the present study, diastase number (DN) was not detected in *Eucalyptus* (AH1) and Multifloral (AH2) honeys but in Wild carrot honey (AH3) it was 11.3. Similar result regarding diastase number of Wild carrot honey (8.3) was reported by ALZAHIRANI et al. (2012a). However, MAKHLOUFI et al. (2010) obtained higher levels of DN (18.0 and 15.9 for Multifloral and *Eucalyptus* honeys, respectively). Besides, the results showed an invertase number of 16.7, 20.7 and 3.2 for *Eucalyptus*, Multifloral and Wild carrot honeys, respectively. These results were higher to those obtained by MAKHLOUFI et al. (2010) for *Eucalyptus* honey (9.64) and Multifloral honey (7.9). The possible explanation for variation in the diastase and invertase number could be attributed to variations in geographical origin of honey as well as the time of harvest.

Electrical conductivity (EC) is a key physicochemical parameter for the authentication of unifloral honeys. The EC value depends on the ash and acid content in honey. According to the EU directive (EUROPEAN COM-

MISSION 2002) nectar honey should have a conductivity of no more than 0.8 mS cm⁻¹. Higher values are considered as belonging to honeydew honey or mixtures of honeydew and nectar honey. There are however some exceptions to this limit, *Eucalyptus* honey being one of them.

EC values of all honey samples were 0.38–1.1 mS cm⁻¹ (Table 2). Two of honey samples (AH1 and AH2) were upper to the allowed parameters set by Codex Alimentarius. The EC values of some Algerian honeys were reported to be 0.21–1.61 mS cm⁻¹ (OUCHEMOUK et al. 2007). Our results were higher to the findings reported by KHALIL et al. (2012) and SAXENA et al. (2010).

Polyphenols are an important group of compounds that were reported to influence not only the appearance but also the functional properties of honey (MONIRUZZAMAN et al. 2013b, CIMPOIU et al. 2013). The concentration of phenolic compounds in honey is highly dependent on its plant source (KHALIL et al. 2012). The total phenolic contents in the studied honeys varied greatly according to the type of honey. Wild carrot honey contained the highest level of polyphenols (850.48 ± 167.92 mg gallic acid/kg) (Table 3). This concentration is higher than that reported by ALZAH-RANI et al. (2012a) for the same type of honey (503.09 ± 8.29 mg gallic acid/kg). In general, the levels of total phenolic content of all tested honeys were higher than that reported by KHALIL et al. (2012) for some Algerian honeys with values ranging between 411.10 ± 1.55 to 498.16 ± 1.32 mg gallic acid/kg, but lower than that reported by OUCHEMOUK et al. (2007) with values ranging between 64 mg gallic acid/100 g to 1304 mg gallic acid/100g. Many researchers found that a honey with high level of total phenol content indicates their high antioxidant proprieties.

Reducing power is a widely used method for antioxidant determination of plants and natural products and has been successfully applied for the assessment of the antioxidant capacity of honey. The reducing power gives a direct estimation of the antioxidants or reductants present in a sample based on its ability to reduce the Fe³⁺/Fe²⁺ couple (ISLAM et al. 2012). A relatively higher absorbance value corresponds to a more reduction of ferric ions to ferrous ions. The reducing power of honey samples varied from 0.6819 ± 0.052 to 0.771 ± 0.141. The obtained results were greatly higher than those reported by SAXENA et al. (2010) and ALZAH-RANI et al. (2012a).

ABTS is a measure of antioxidant activity in contrast to antioxidant concentration, which might include a proportion of biologically inactive antioxidants. ABTS permits the measurement of antioxidant activity of mixtures of substances, hence helping to distinguish between additive and synergistic effects (MONIRUZZAMAN et al. 2012). Despite the fact that hon-

eys showed important phenolic contents, which involves the presence of many hydroxyl groups capable of chelating free radicals, the studied honeys showed low scavenging activity against ABTS free radical. Our results disagree those reported by ALZHRANI et al. (2012b) and other previous studies dealt on TAS of honey.

Statistical tool is a useful complimentary approach to investigate the relationship between the antioxidant activities of honey and its biochemical composition. From the Table 3, it can be seen that total phenol content was strongly correlated with reducing power ($r = 0.885$), indicating that polyphenol compounds also contribute to the antioxidant capacity of honey. This statistically significant correlation was in agreement with the previous findings (MONIRUZZAMAN et al. 2013a, ALZHRANI et al. 2012a, ISLAM et al. 2012).

The important finding from this study is that all tested bacterial strains were inhibited by the three honey samples. While most of the used strains were resistant to the tested antibiotics (Table 3). It could be pointed out that, except for Cifotaxime (30 μg), which was active on the majority of strains, all the other antibiotic did not show an inhibition activity on the most of the isolates. The antibacterial activities of different brands of honeys were proved to be efficient against all strains of *E. coli*. The average MIC value was 7% (v/v). This antibacterial effect is greatly higher than those reported in the literature for *E. coli* strains (JIMENEZ et al. 2016, SHERLOCK et al. 2010, TAN et al. 2009). Regarding the bactericidal and bacteriostatic effect of the different varieties of honey, it was found that *Eucalyptus* honey exhibited bactericidal effect against all the tested strains of *E. coli*. Multifloral honey was bactericide on *E. coli* F5 and *E. coli* F17, while Wild carrot honey was bactericide only on *E. coli* F5.

Conclusions

In conclusion, this study showed that Algerian honeys contained a significant amount of polyphenols that can produce the high antioxidant activity. In addition, these honeys (*Eucalyptus*, Multifloral and Wild carrot) exhibited a potent antibacterial activity against pathogenic *E. coli* causing diarrhea in young calves. These findings may afford useful basis for the alleged therapeutic effects of honey and support its application as an alternative treatment, however, further *in vivo* studies are needed to confirm the findings of the present study.

Acknowledgments

The authors would like to express their special thanks to the staff members Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khal-doun University of Tiaret, Algeria. The authors are also grateful to assistant professor Dr Aissat Saad and veterinary doctors Drideche Moulay Mokhtar Hamri and Rezki Hamza for their cooperation during this study. My thanks also go to Mr Benaichata Lazrag for the statistical analyses.

Accepted for print 23.05.2018

References

- AKAM A., KHELEF D., KAIDI R., RAHAL KH., TALI-MAAMAR H., YABRIR B., LAOUN A., MOSTFAOUI A., BOUTAIBA S., COZMA V. 2011. *The frequency of the shedding of Cryptosporidium parvum, F5 Escherichia coli, Rotavirus, Coronavirus and Salmonella spp. in Young Dairy Calves in Mitidja Area (Algeria)*. Bulletin UASVM, Veterinary. Medicine, 68(2): 16–25.
- ALVARES-SUAREZ J.M., TULIPANI S., DÍAZ D., ESTEVEZ Y., ROMANDINI S., GIAMPIERI F., DAMIANI E., ASTOLFI P., BOMPADRE S., BATTINO M. 2010. *Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds*. Food. Chem. Toxicol., 48: 2490–2499.
- ALZAHIRANI H. A., ALSABEHI R., BOUKRÁA L., ABDELLAH F., BELLIK Y., BAKHOTMAH B.A. 2012a. *Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins*. Molecules., 17: 10540–10549.
- ALZAHIRANI H. A., BOUKRÁA L., BELLIK Y., ABDELLAH F., BAKHOTMAH B.A., KOLAYLI S., SAHIN H. 2012b. *Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of honey from different botanical and geographical origins*. Glob. J. Health Sci., 4 (6): 191–196.
- ARVANITTOYANNIS I.S., CHALHOUB C., GOTSIOU P., KEFALAS P.L.S. 2005. *Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (Multivariate analysis) for detecting honey authenticity*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 45: 193–203.
- BERETTA G., GRANATA P., FERRERO M., ORIOLI M., MAFFEI F.R. 2005. *Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics*. Anal. Chim. Acta., 533: 185–191.
- BOUKRÁA L., BELLIK Y. 2011. *Honey and microbes*. In: *Honey current. Research and clinical applications*. Ed. J. Majtan. Nova Science Publishers, USA, pp. 61–82.
- CHAKIR A., ROMANE A., MARCAZZAN G.L., FERRAZZI P. 2016. *Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco*. Arab. J. Chem., 9 (2): S946–S954.
- CIMPOIU C., HOSO A., MICLAUS V., PUSCAS A. 2013. *Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties*. Spectrochimica. Acta. Part A., 100: 149–154.
- Codex Alimentarius, Alinorm 01/25. 2000. Draft Revised Standard for Honey at Step 8 of the Codex Procedure; EU Directive /1/110/2001 of 02/12/2001 (L 10/47).
- DE VERDIER K., NYMAN A., GREKO C., BENGTSSON B. 2012. *Antimicrobial resistance and virulence factors in Escherichia coliform Swedish dairy calves*. Acta. Vet. Scand., 54: 2.
- ERDTMAN G. 1969. *Handbook of palynology*. Ed. Munksgaard, Copenhagen, pp. 486.
- ERB A., STÜRMER T., MARRE R., BRENNER H. 2007. *Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli: overview of geographical, temporal, and methodological variations*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 26: 83–90.

- European Commission. 2002. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey, Off. J. Eur. Communities L10, 47–52.
- GOMES S., DIAS L.G., MOREIRA L.L., RODRIGUES P., ESTEVINHO L. 2010. *Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal*. Food. Chem. Toxicol., 48: 544–548.
- JIMENEZ M., BERISTAIN C.I., AZUARA E., MENDOZA M.R., PASCUAL L.A. 2016. *Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee*. J. Apic. Res., 55(2) : 151–160.
- ISLAM A., KHALIL I., ISLAM N., MONIRUZZAMAN M., MOTTALIB A., SULAIMAN S.A., GAN S.H. 2011. *Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year*. BMC Complement. Altern. Med., 12: 177.
- ISIDOROV V.A., BAGAN R., BAKIER S., SWIECICKA I. 2015. *Chemical composition and antimicrobial activity of Polish herbhoneys*. Food. Chem., 171: 84–88.
- IZZO M.M., KIRKLAND P.D., MOHLER V.L., PERKINS N.R., GUNN A.A., HOUSE J.K. 2011. *Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea*. Aust. Vet. J., 89: 167–173.
- KASPEROVÁ J., NAGY J., POPELKA P., DIČÁKOVÁ Z., NAGYOVÁ A., MALA P. 2012. *Physico-chemical indicators and identification of selected Slovak honeys based on colour measurement*. Acta. Vet. Brno., 81: 057–061.
- KHALIL M. I., MONIRUZZAMAN M., BOUKRÁA L., BENHANIFIA M., ISLAM M.A., ISLAM M.N., SULAIMAN S.A., GAN S.H. 2012. *Physicochemical and antioxidant properties of Algerian honey*. Molecules, 17(9): 11199–11215.
- KWAKMAN P.H.S., TE VELDE A.A., DE BOER L., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M.J.E., ZAAT S.A.J. 2011. *Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity*. PLoS ONE., 6(3): e1770.
- KWAKMAN P.H.S., TE VELDE A.A., DE BOER L., SPEEIJER D., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M., ZAAT S.A. 2010. *How honey kills bacteria*. FASEB. J., 24: 2576–2582.
- MAKHLOUFI C., KERKVLIEET J.D., D'ALBORE G.R., CHOUKRI A., SAMAR R. 2010. *Characterization of Algerian honeys by palynological and physico-chemical methods*. Apidologie., 41: 509–521.
- MOLAN P. 1999. *Why honey is effective as a medicine*. 1. *Its use in modern medicine*. Bee. World., 80(2): 79–92.
- MONIRUZZAMAN M., KHALIL M.I., SULAIMAN S.A., GAN S.H. 2012. *Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: A review*. Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med., 9(1): 36–42.
- MONIRUZZAMAN M., KHALIL M.I., SULAIMAN S.A., GAN S.H. 2013a. *Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera**. BMC Complement. Altern. Med., 13: 43.
- MONIRUZZAMAN M., KHALIL M.I., SULAIMAN S.A., GAN S.H. 2013b. *Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of sourwood and other Malaysian honeys: a comparison with manuka honey*. Chem. Cent. J., 7: 138.
- MOARD. 2008. *Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations*. Ed. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), 4th Ed, Algeria, 19 and 82.
- MOARD. 2011. *Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations*. Ed. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), 6th Ed, Algeria, pp. 181–182, <http://www.sante.dz/aarn>, access: 17.02.2018.
- MAMAN M., FAID M., EL ADLOUNI C. 2005. *Microbiological and physico-chemical properties of Moroccan Honey*. Int. J. Agri. Biol., 7(5): 773–776.
- NGUYEN T.D., VO T.T., VU-KHAC H. 2011. *Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam*. J. Vet. Sci., 12(2): 159–164.

- OUCHEMOUKH S., LOUAILECHE H., SCHWEIZER P. 2007. *Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honey*. Food Control., 18: 52–58.
- RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M., RICE-EVANS C. 1999. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free. Radic Biol. Med., 26: 1231–1237.
- SAXENA S., GAUTAM S., SHARMA A. 2010. *Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys*. Food. Chem., 118: 391–397.
- SHERLOCK O., DOLAN A., ATHMAN R., POWER A., GETHIN G., COWMAN S., HUMPHREYS H. 2010. *Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*. BMC Complement. Altern. Med., 10: 47.
- TAN H.T., ABDUK RAHMAN R., GAN S.H., HALIM A.S., HASSAN S.A., SULAIMAN S.A., GAN KIRNPAL-KAUR B. 2009. *The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey*. BMC Complement. Altern. Med., 9(34): 1–8.
- TERRAB A., DÍEZ M.J., HEREDIA F. J. 2002. *Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics*. Food Chem., 79: 373–379.
- WANG R., STARKEY M., HAZAN R., RAHME L.G. 2012. *Honey's ability to counter bacterial infections arises from both bactericidal compounds and QS inhibition*. Fmich., 3: 00144.
- WHITE J.W. 1978. *Honey*. Advances in Food Research., 24: 278–374.
- YE G.C., DUH P.D. 1993. *Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls*. J. Am. Oil. Chem. Soc., 70(4): 383–386.

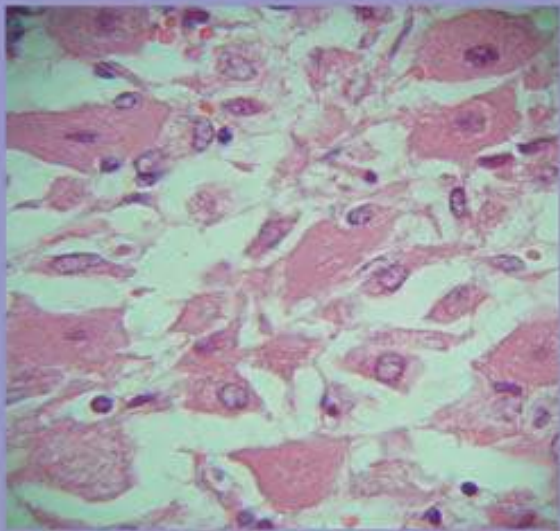
VETERINARIA



ISSN Print: 0372-6827

ISSN Online: 2233-1360

Volumen 67, Issue 2, 2018.



CHARACTERIZATION OF OVARIAN FOLLICULAR AND CYSTIC FLUIDS IN COWS

Mimoune Nora, Kaidi Rachid, Guedioura Abdelmoumène, Benaissa Mohamed Hocine, Azzouz Mohamed Yassine

THE EFFECT OF EXOGENOUS MELATONIN ON THE HISTOLOGICAL CHANGES OF THE OVARY INDUCED BY ZEARALENONE

Maida Sahinovic, Selma Alicelebic, Zakira Mornjakovic, Esad Cosovic, Dina Kapic, Eldan Kapur, Sejad Mackic, Visnja Muzika, Samra Custovic

PREVALENCE AND ASSOCIATED RISK FACTORS OF CRYPTOSPORIDIOSIS AMONG CATTLE IN THE REGION OF EASTERN ALGERIA

Abderrazek Hocine, Riad Bouzid, Hebib Aggad, Djamel Khelef, Hamida Talhi

ENTEROPATHOGENS ASSOCIATED WITH NEONATAL CALVES DIARRHEA IN TIARET AREA (WESTERN ALGERIA)

Sidi Mohammed Ammar Selles, Mokhtaria Kouidri, Belkacem Tahar Belhamiti, Amar Ait Amrane, Ahmed Redha Benia, Si Mohamed Hammoudi, Rachid Kaidi, Laid Boukra



Enteropathogens associated with neonatal calves diarrhea in Tiaret area (Western Algeria)

Sidi Mohammed Ammar Selles^{1,2,3*}, Mokhtaria Kouidri², Belkacem Tahar Belhamiti^{1,2}, Amar Ait Amrane^{1,2}, Ahmed Redha Benia^{1,2}, Si Mohamed Hammoudi¹, Rachid Kaidi⁴, Laid Boukraa^{1,2}

Abstract

The aims of this study were to assess the prevalence of rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium* spp. and *E. coli* strains associated with neonatal diarrhea in one-month-old calves. Fifty fecal samples collected from diarrheic calves were examined bacteriologically for *E. coli*, and by Sandwich ELISA screening for rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium* spp. and *E. coli* F5 strain. *Cryptosporidium* spp. was the dominant enteropathogen followed by *E. coli* F5. The *E. coli* fimbrial adhesin (F5, F17, F41) and the afimbrial adhesin CS31A were determined by slide agglutination using specific antiserum, and the standardized disc diffusion assay was used to estimate the antimicrobial sensitivity. Bacterial culture identified *E. coli* in 62% of the samples. The fimbriae F17 were detected in 29% followed by fimbriae F5 (26%), and afimbrial adhesin CS31A (9.68%) in *E. coli* isolates. 68.75% of *E. coli* was shown to be multidrug resistant. The present study demonstrates a high multidrug-resistant strains of *E. coli* isolated from the neonatal calves' diarrhea, and the clearly higher frequency of *Cryptosporidium* spp. in comparison with the other enteropathogens.

Keywords: Neonatal calves diarrhea, *E. coli*, fimbriae, afimbrial adhesion, *Cryptosporidium* spp.

¹Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria

²Institute of veterinary science, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria

³Faculty of Life and Nature Sciences, Mascara University, Algeria

⁴Laboratory of Biotechnology of Animal Reproduction, Saad Dahlab University of Blida, Blida 9000, Algeria

*Corresponding Author: nuider10@yahoo.fr

Introduction

Neonatal calf diarrhea (NCD) is an important disease of young calves and has a complex etiopathogenesis (Coura et al., 2015). Calves are at greatest risk of developing diarrhea within the first month of life, and the incidence of diarrhea decreases with age (Gebregiorgis and Tessema, 2016). In the dairy industry, approximately 50 % of deaths in one-month-old calves have been attributed to diarrhea (Mohamed et al., 2017).

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), rotavirus, coronavirus and *Cryptosporidium* are the four major pathogens associated with NCD (Shams et al., 2010). Among *E. coli* associated with NCD, the major virulence factor is the F5 (de Verdier et al., 2012). Strain with this fimbrial adhesin is usually isolated from calf with diarrhea between one and five days of age (Umpiérrez et al., 2016). Nevertheless, strains with F17, F41 fimbrial adhesin and afimbrial adhesin CS31A of *E. coli* have also been isolated (Umpiérrez et al., 2016 and Nguyen et al., 2011).

The complex etiology, the absence of pathognomonic signs and lesions, the presence of asymptomatic infections, the

interaction between intrinsic and extrinsic factors that predispose the host to infection by neonatal diarrhea lead to difficulty in clinical diagnosis of this syndrome (Athanasios et al., 1994). For this reason, laboratory diagnosis is necessary. Many diagnostic techniques that may be used to detect the enteropathogens in fecal samples include isolation and direct electron microscopy, immuno-electron microscopy, as well as assays to detect antigens (latex agglutination and ELISA, polyacrylamide gel electrophoresis), and nucleic acid (reverse transcription polymerase chain reaction) (Mayameei et al., 2010). Commercial Ag-ELISA kits for detecting bovine rotavirus type A, bovine coronavirus, *E. coli* K99, and/or *Cryptosporidium parvum* in faecal samples are available. Ag-ELISAs are well known for rapid turnaround, high-throughput testing, plug-in-and-play capability, and portability (Cho et al., 2014).

Diarrhea is one of the most important causes of morbidity and mortality, leading to economic losses due to the cost of treatment, prophylaxis, increased susceptibility to other infections, reduced growth rates, and death of calves (Rocha et al., 2017). However, antimicrobial therapy is the primary control approach for decreasing morbidity

and mortality in animals infected with diarrhoeagenic bacteria (Pourtaghi et al., 2016). In addition, antimicrobial agents are used in chemoprophylaxis, chemotherapy and as growth promoters in the livestock industry (Roopnarine et al., 2009). However, the broad use of antimicrobials in animal production may lead to the emergence and dissemination of antimicrobial-resistant bacterial pathogens, which without doubt pose a potential threat to human public health (Du et al., 2005). The problem of drug resistance is not restricted to pathogenic bacteria; it also involves the commensal bacterial flora, which may become a major reservoir of resistant strains (Erb et al., 2007). Thus, the purpose of this study conducted in Western Algeria (Tiaret) was the estimation of the prevalence of rotavirus group A, bovine coronavirus, *Cryptosporidium* spp., and *E. coli* associated with NCD.

Material and Methods

Fecal samples

Fifty fecal samples were obtained from both sexes of calves with diarrhea, aged less than 30 days, who had not received prior treatment with antibiotics during calving period. The collected samples were sent out to the laboratory in ice-cooled containers and stored at 4 °C until bacteriological examination and at -20 °C until analyzing by ELISA test.

Bacteriological examination

Immediately after receipt at the microbiology laboratory, the samples were inoculated with a swab on MacConkey agar (Biochem, Quebec) and incubated for 18-24 hours at 37 °C. A lactose-positive colony from the fecal culture from each calf was selected and confirmed biochemically by API 20E (BioMérieux, French).

All *E. coli* strains previously identified by API 20E were inoculated onto the surface of Minca IsoVital media (BioVac laboratory, French), and then slide agglutination was used with the specific antisera (BioVac laboratory, French) to detect *E. coli* fimbrial adhesion F5, F17, F41 and afimbrial adhesin CS31A.

ELISA test

Fecal samples (n=50) were tested for the presence of rotavirus, coronavirus, *Cryptosporidium* spp, and *E. coli* F5 by an antigen ELISA (BIO K 348 - Multiscreen AgELISA Calf digestive / sandwich, Bio-X Diagnostics Sprl, Belgium) according to the manufacturer's instructions.

These samples are stratified into four age-groups. Briefly, 10 of the calves included in this study were 1-7 d old, and 15, 18 and 7 calves were 8-14, 15- 21 and 22-30 d old, respectively.

Antibiotic susceptibility test

Susceptibility of *E. coli* isolates to a panel of antimicrobial agents was determined by the standardized disc diffusion assay on Mueller-Hinton agar (BioMérieux, French) using commercial antimicrobial susceptibility discs according to the recommendations of the Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine (MoARD, 2008 and 2011). The tested antibiotics and their corresponding disc concentrations were as follows: amoxicillin+ acid clavulanic (AMC: 20/10 µg), ampicillin (AM:10 µg), gentamicin (GN:10 µg), tetracycline (TE: 10 µg), colistin (CT: 10 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (STX: 1.25/23.75 µg), ofloxacin (OFX: 5 µg) and cefotaxime (CTX: 30 µg).

Statistical Analysis

The chi-square test was used at 95 % significance to estimate the differences among the proportion of fecal samples that tested positive or negative for the enteropathogens studied and the age group of animals with diarrhea.

Results

Typing of isolated *E. coli*

In this study, *E. coli* was the most isolated bacterium (62%). Among these isolates, 64.52% belonged to strains possessing fimbriae F5, F17 and afimbrial adhesin CS31A (Figure 1).

Elisa test

The most frequently detected enteropathogens were *Cryptosporidium* spp. (40%) followed by *E. coli* F5 (16%), coronavirus (10%) and rotavirus (8%) (Table 1).

The proportions of positive samples for the four enteropathogens during the four weeks of the first month of their lives were summarized in Table 1. All the four investigated age groups were positive to the enteropathogens. Nevertheless, the 8-14 d old calves showed higher frequency (80%) to enteropathogen infection compared to the other three age groups, but no significant difference was found by statistical analysis.

Antimicrobial resistance

High antimicrobial resistance was observed from tested isolates and *E. coli* against amoxicillin + clavulanic acid, ampicillin, tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole. On the other hand, there was a high sensitivity of these strains to cefotaxime, colistin, gentamicin and ofloxacin (Fig. 2). Twenty-two isolates (68.75%) of *E. coli* were resistant to three or more class of antimicrobials.

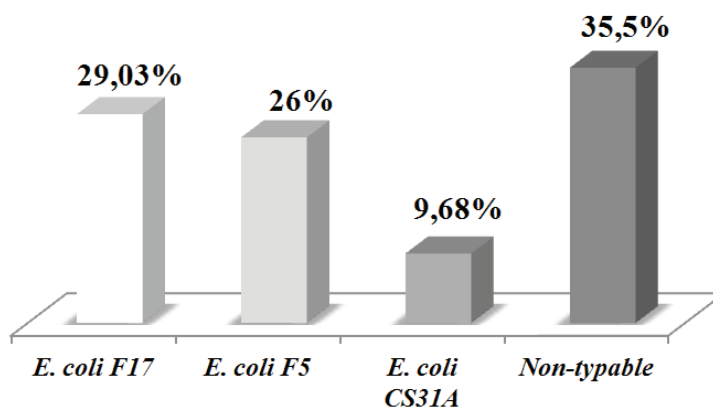


Figure 1: Typing of isolated *E. coli*

Table 1. Detection of four tested enteropathogens in the different age groups of diarrheic calves

Enteropathogen (s) detected	Age of diarrheic calves (days)								TOTAL	
	1-7d (n= 10)		8-14d (n=15)		15-21d (n=18)		22-30d (n= 7)		n	%
	No	%	No	%	No	%	No	%	50	100
None	3	30	3	20	7	38.88	4	57.14	17	34
<i>Cryptosporidium</i> only	3	30	7	46.66	6	33.33	1	14.29	17	34
<i>E. coli</i> F5 only	1	10	1	6.67	3	16.67	1	14.29	6	12
<i>Coronavirus</i> only	2	20	1	6.67	1	5.56	1	14.29	5	10
<i>Rotavirus</i> only	-	-	1	6.67	-	-	-	-	1	2
<i>Cryptosporidium</i> + <i>E. coli</i> F5	-	-	1	6.67	-	-	-	-	1	2
<i>Cryptosporidium</i> + <i>Coronavirus</i>	-	-	-	-	1	5.56	-	-	1	2
<i>Cryptosporidium</i> + <i>Rotavirus</i>	-	-	1	6.67	-	-	-	-	1	2
<i>E. coli</i> F5 + <i>Rotavirus</i>	1	10	-	-	-	-	-	-	1	2

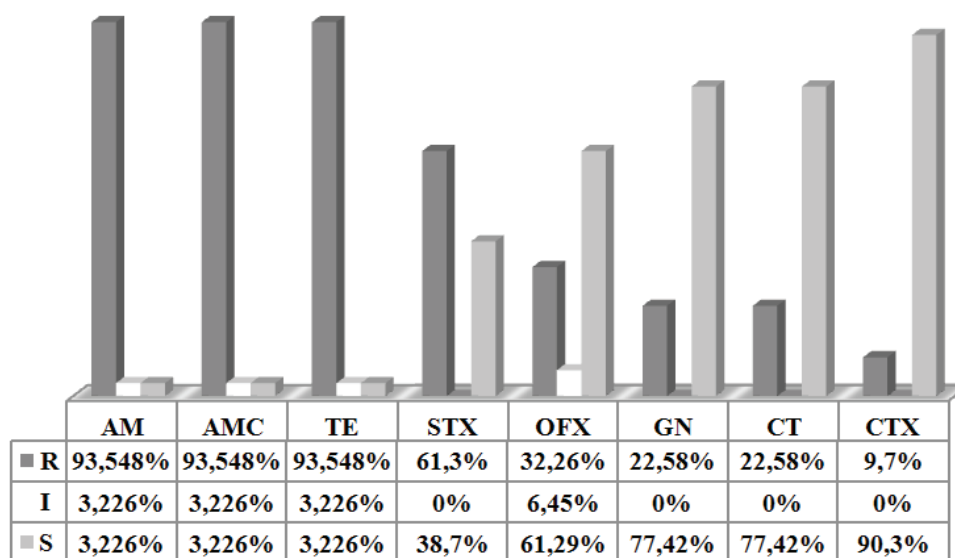


Figure 2: Antimicrobial resistance of strains of *E. coli*

R : Resistant, I : Intermediate, S : Sensitive

AM: ampicillin, AMC: amoxicillin+ acid clavulanic, TE: tetracycline, STX: trimethoprim/sulfamethoxazole, OFX: ofloxacin, GE: gentamicin, CT: colistin, CTX: cefotaxime.

Discussion and conclusions

Diarrhea is a complex syndrome, resulting from the interaction of several infectious agents (alone or in combination), host factors and non-infectious factors (environment, management practices and nutrition). Several infectious agents are implicated in its etiology. However, *Salmonella* spp., pathogenic *Escherichia coli*, coronavirus and rotavirus are the most frequent pathogens associated with neonatal calves diarrhea (Coura et al., 2015).

Out of 50 fecal samples collected from diarrheic calves, 31 (62%) samples were found positive for *E. coli* after biochemical characterization. Compared with present study, higher frequency in *E. coli* was observed by Shahrani et al. (2014) in Iran 76.45% and Younis et al. (2009) (87.72%) in Egypt. However Picco et al. (2015) and Herrera-Luna et al. (2009) mentioned lower rates with respective frequency of 30.1% and 18.9%.

ETEC infection is the most common type of colibacillosis in young animals such as calves (Shams et al., 2012). This result is in agreement with our study (64.52%) and it was higher than those cited by Pourtaghi et al. (2016), Shahrani et al. (2014) and Younis et al. (2009) (11.3%, 28.4%, 10.36%, respectively).

F17 fimbriae, known as FY or Att25, are prevalent in isolated *E. coli* strains in calves with diarrhea or septicemia (Nguyen et al., 2011). In this study, 29% of isolated *E. coli* strains carried F17 fimbriae. Similar result (28.7%) was reported by Umpiérrez et al. (2016).

The prevalence of K99 fimbriae (F5) was 26%. This result is similar to that reported by Içen et al. (2013). However, many previous studies mentioned a lower prevalence ranging from 5.3% to 17.4% (Lacroute et al., 2016; Shems et al., 2012; Akam et al., 2011 and Izzo et al., 2011).

CS31A is defined as an afimbrial adhesin of *E. coli*, immunologically related to the F4 fimbria (formerly K88), and also plasmid encoded. The CS31A antigen was first recognized as a capsule-like surface protein around the bacteria, and it has been extensively studied in septicemia and enterotoxigenic *E. coli* strains. CS31A is usually expressed with other fimbria antigens. Particularly, it has been reported that F17 fimbria and CS31A are highly associated (Umpiérrez et al., 2016). In our study, the strains carrying this antigen were detected with a prevalence of 9.68%. These prevalence rates were lower than those cited by Umpiérrez et al. (2016) and Lacroute et al. (2016) (17.3% and 77.3%, respectively).

In the present study, no detection of fimbriae F41 was observed. A similar finding was reported by Lacroute et al. (2016). Whereas Nguyen et al. (2011) and Ok et al. (2009) showed the prevalence rates of *E. coli* F41 from 4.93% and 18.9% respectively.

The differences in prevalence and frequency rates among the studies may be attributed to regional variations, management and hygienic conditions, the age of the animals, vaccination of dam, colostrum intake, or to the fact that

the analysis of fimbriae in the previous reports was determined by different diagnostic methods (Picco et al., 2015 and Içen et al., 2013).

Cryptosporidium spp. is one of the most important causative agents of acute diarrhea, especially in young calves (Gillhuber et al., 2014). In our study, *Cryptosporidium* spp. was the predominant enteropathogen associated with calves' diarrhea. The incidence of this agent is 40% either alone or in combination with other causative agent. Our result is in agreement with the results reported by Içen et al. (2013) (47.8%) and Langoni et al. (2004) (38.9%), but lower to those cited by Izzo et al. (2011) (58.5%).

In our study, *E. coli* F5 was the second predominant enteropathogen associated with calves' diarrhea with the prevalence rate of 16% (detected by ELISA). Similarly, Akam et al. (2011) and Izzo et al. (2011) have cited the prevalence rates of 15.12% and 17.4%, respectively. Picco et al. (2015) in Argentina and Younis et al. (2009) in Egypt observed the prevalence of 12.9% and 10.36%, respectively.

Rotavirus and coronavirus are the most common viral causes of NCD (Mayameei et al., 2010). In this study, coronavirus was detected in 10% of NCD. This result is similar to that reported by Perez et al. (1998) in Costa Rica (9%), but lower than those recorded by Selles et al. (2014) in Algeria (20.73%) and Izzo et al. (2011) in Australia (21.6%).

The rotavirus infections were detected at less prevalence rates (8%). This finding corroborates with the result noticed by Perez et al. (1998) in Costa Rica (7%). Nonetheless, higher prevalence have been reported in Egypt by Mohamed et al. (2017) (46%), Selles et al. (2014) in Algeria (14.63%), Izzo et al. (2011) in Australia (79.9%) and Ok et al. (2009) in Turkey (18.2%).

The differences in detection of enteropathogens may be attributed to the different diagnostic methods used (Ok et al., 2009), farm management practices, hygienic status (Mayameei et al., 2010; Ok et al., 2009), environmental condition, and geographical locations (climate condition) (Selles et al., 2014). Moreover, the increasingly frequent use of vaccines against rotavirus, coronavirus and *E. coli* F5 can explain the reduced rates of virus prevalence compared to the previous study conducted in the same area.

No enteropathogens were detected in 17 calves (34%). This rate was higher than that observed by Ok et al. (2009), Izzo et al. (2011) and Içen et al. (2013). Probable explanations for this lack of detection may be related to the non-infectious origin of diarrhea (nutritional diarrhea) or infectious diarrhea whose etiological agents were not targeted by this study.

This study shows that the frequency of infection is higher in age group 8-14 d old (80%). This age bracket is considered as the most susceptible to infection by *Cryptosporidium* ssp. (60%). Similar results were archived by Gillhuber et al. (2014). The probable explanation for this finding may be related to either a poor and / or no absorption of colostrum and weakening of passive immunity. While the first three age groups were characterized by the highest fre-

quency of diarrhea, later on, the cases of diarrhea progressively decreased. The same findings have been reported in previous studies (Coura et al., 2015; Gebregiorgis and Tessema, 2016; Mayameei et al., 2010). This can be explained by increase in natural resistance against infection.

Several previous studies have reported the antimicrobial resistance of *E. coli* strains isolated from NCD. Higher antimicrobial resistance towards the several antibiotics were archived by Lacroute et al. (2016) and Shahrani et al. (2014). However, Rigobelo et al. (2006) cited low antimicrobial resistance. In Algeria, Akam et al. (2007) reported antimicrobial resistance of *E. coli* F5 strains to ampicillin, tetracycline and chloramphenicol.

According to literal terms, multidrug-resistant (MDR) means “resistant to more than one antimicrobial agent”, but the medical community has agreed upon no standardized definitions for MDR yet. Many definitions are being used in order to characterize patterns of MDR in Gram-positive and Gram-negative organisms. One of the methods used by various authors and authorities to characterize organisms as MDR is based on in vitro antimicrobial susceptibility test results, when they test “resistance to multiple antimicrobial agents, classes or subclasses of antimicrobial agents”. The definition most frequently used for Gram-positive and Gram-negative bacteria is “resistant to three or more antimicrobial classes” (Magiorakos et al., 2012).

Based on this definition, the MDR of *E. coli* strains studied was 68.75%. This finding corroborates with the result noticed by Souto et al. (2016) (78.68%). Additionally, these results are in agreement with those observed by Rigobelo et al. (2006) in Brazil who reported 80% multi-resistance for *E. coli* isolates.

This higher rate of antimicrobially resistant strains isolated from NCD could be explained by increase in drug usage (Roopnarine et al., 2009). De Verdier et al. (2012) incriminated the calf feed of milk or colostrum from cows treated with antibiotics as a possible source of antibiotic resistance.

The results of this survey highlight a number of important facts in regard to enteropathogens associated with NCD. They provide valuable insight into the pathogens associated with outbreaks of diarrhea in dairy calves across Tiaret area. *Cryptosporidium* spp. was the most prevalent enteropathogen identified in calves aged less than 30 days. This is the first report on the presence of fimbrial adhesin F5, F17 and afimbrial adhesin CS31A in *E. coli* strains isolated from NCD cases in Tiaret area (Algeria). This study indicates a high frequency of antimicrobial resistance among *E. coli* strains isolated from NCD against antibiotics frequently used in Algerian veterinary medicine.

Acknowledgements

The authors would like to express their special thanks to the staff members Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret and Laboratory of Biotechnology of Animal Reproduction, Saad Dahlab University of Blida (Algeria). The authors are also

grateful to Dr Drideche Moulay, Dr. Hamri Mokhtar and Dr. Rezki Hamza for their collaboration during this study. My thanks also go to Mr Benaichata Lazreg for the statistical analyses.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

References

1. Akam, A., Bouyoucef, A., Rahal, Kh., Lafri, M., Kaidi, R., Khelef, D., Chirila, F., 2007. Fréquences d'isolement et antibiorésistances des souches d'*Escherichia coli* F5+ isolées chez les veaux de la Mitidja (Algérie). Bulletin. USAMV-CN. 64(1-2), 20-25.
2. Akam, A., Khelef, D., Kaidi, R., Rahal, K.H., Tali-Maamar, H., Yabrir, B., Laoun, A., Mostfaoui, A., Boutaiba, S., Cozma, V., 2011. The Frequency of the Shedding of *Cryptosporidium parvum*, F5 *Escherichia coli*, Rotavirus, Coronavirus and *Salmonella* spp. in Young Dairy Calves in Mitidja Area (Algeria). Bulletin. UASVM. Veterinary. Medicine, 68(2), 16-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.15835/buasvm-cn-vm:2:68:6852>
3. Athanassious, R., Marsolais, G., Assaf, R., Dea, S., Descoteaux, J. P., Dulude, S., Montpetit, C., 1994. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. Can. Vet. J. 35,163-169.
4. Cho, Y. L., Yoon, K. J., 2014. An overview of calf diarrhea infectious etiology, diagnosis, and intervention. J. Vet. Sci.15(1), 1-17. Doi: 10.4142/jvs.2014.15.1.1
5. Coura, F. M., Freitas, M. D., Ribeiro, J., de Leme, R. A., de Souza, C., Alfieri, A. A., Facyry Filho, E. J., de Carvalho, A. Ú., Silva, M. X., Lage, A. P., Heinemann, M. B., 2015. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. Trop. Anim. Health. Prod. 47, 3-11. DOI:10.1007/s11250-014-0675-5
6. De Verdier, K., Nyman, A., Greko, C., Bengtsson, B., 2012. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. Acta. Vet. Scand. 54, 2. Doi: 10.1186/1751-0147-54-2.
7. Du, X., Shen, Z., Wu, B., Xia, S., Shen, J., 2005. Characterization of class 1 integrons-mediated antibiotic resistance among calf pathogenic *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett. 245, 295–298. DOI:10.1016/j.femsle.2005.03.021
8. Erb, A., Stürmer, T., Marre, R., Brenner, H., 2007. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26, 83–90. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0248-2>
9. Gebregiorgis, A., Tessema, T. S., 2016. Characterization of *Escherichia coli* isolated from calf diarrhea in and around Kombolcha, South Wollo, Amhara Region, Ethiopia. Trop. Anim. Health. Prod. 2, 273-81. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0946-9>
10. Gillhuber, J., Rügamer, D., Pfister, K., Scheuerle, M. C., 2014. Giardiasis and other enteropathogenic infections: a study on diarrhoeic calves in Southern Germany. BMC. Res. Notes. 7, 112. Doi: 10.1186/1756-0500-7-112.

11. Herrera-Luna, C., Klein, D., Lapan, G., Revilla-Fernandez, S., Haschek, B., Sommerfeld-Stur, I., Moestl, K., Baumgartner, W., 2009. Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Vet. Med.* 54 (1), 1-11.
12. Içen, H., Arserim, N. B., Işık, N., Özkan, C., Kaya, A., 2013. Prevalence of Four Enteropathogens with Immunochromatographic Rapid Test in the Feces of Diarrheic Calves in East and Southeast of Turkey. *Pak. Vet. J.* 33(4), 496-499.
13. Izzo, M. M., Kirkland, P. D., Mohler, V. L., Perkins, N. R., Gunn, A. A., House, J. K., 2011. Prevalence of major enteric pathogens in Australia dairy calves with diarrhea. *Aust. Vet. J.* 89(5), 167-173. Doi: 10.1111/j.1751-0813.2011.00692.x
14. Lacroute, H., 2016. Place de la colibacillose chez le jeune veau et antibiorésistance dans l'Allier (2011-2013). *Bull. Acad. Vét. France.* 169 (2), 100-109. DOI : 10.4267/2042/60850
15. Langoni, H., Linhares, A. C., Avila, F. A., Da Silva, A. V., Elias, A. O., 2004. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in Sao Paulo state, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.* 41(5), 313-319. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962004000500004>
16. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
17. Mayameei, A., Mohammadi, G., Yavari, S., Afshari, E., Omidi, A., 2010. Evaluation of relationship between Rotavirus and Coronavirus infections with calf diarrhea by capture ELISA. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 553-557. <https://doi.org/10.1007/s00580-009-0920-x>
18. MoARD., 2008. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), pp. 83.
19. MoARD., 2011. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), pp. 181-182.
20. Mohamed, F. F., Mansour, S. M. G., El-Araby, I. E., Mor, S. K., Goyal, S. M., 2017. Molecular detection of enteric viruses from diarrheic calves in Egypt. *Arch. Virol.* 162(1), 129-137. Doi: 10.1007/s00705-016-3088-0.
21. Nguyen, T. D., Vo, T. T., Vu-Khac, H., 2011. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J. Vet. Sci.* 12(2), 159-164. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.2.159>
22. Ok, M., Gu, L., Turgut, K., Ok, U., Sen, I., Gündüz, I. K., Birdane, M. F., Güzelbektes, H., 2009. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses. Public. Health.* 56, 94- 101. Doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01156.x
23. Perez, E., Kummeling, A., Janssen, M. M. H., Jimenez, C., Alvarado, R., Caballero, M., Donado, P., Dwinger, R. H., 1998. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilaran. Costa Rica. *Prev. Vet. Med.* 33, 195-205. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(97\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00038-X)
24. Picco, N. Y., Alustiza, F. E., Bellingeri, R. V., Grosso, M. C., Motta, C. E., Larriestra, A. J., Vissio, C., Tiranti, K. I., Terzolo, H. R., Moreira, A. R., Vivas, A. B., 2015. Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 47(2), 95-102. Doi: 10.1016/j.ram.2015.01.006.
25. Pourtaghi, H., Sodagari, H. R., 2016. Antimicrobial Resistance of Enterotoxigenic and Non-Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated From Diarrheic Calves in Iran. *Int. J. Enteric. Pathog.* 4(2), e34557. Doi: 10.17795/ijep34557
26. Rigobelo, E. C., Gamez, H. J., Marin, J. M., Maced, O. C., Ambrosin, J. A., Ávila, F. A., 2006. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from diarrheic calves. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58 (3), 305-310. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000300003>
27. Rocha, T. G., Silva, F. D. F., Gregori, F., Alfieri, A. A., Buzinaro, M. d-G., Fagliari, J. J., 2017. Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. *Trop. Anim. Health. Prod.* 49(4), 783-790. Doi: 10.1007/s11250-017-1263-2.
28. Roopnarine, R., Ammons, D., Adesiyun, A. A., 2009. Frequency of antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from dairy farms in Trinidad by source and presence of virulence markers. *Veterinarski. Arhiv.* 79 (3), 229-243.
29. Selles, S. M. A., Kouidri, M., Belhamiti, B. T., Ait-Amrane, A., Benia, A. R., Bellik, Y., Hammoudi, S. M., Niar, A., Boukrâa, L., 2014. Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 4 (1), S318-S322. Doi: 10.12980/APJTB.4.2014C778
30. Shahrani, M., Dehkordi, F. S., Momtaz, H., 2014. Characterization of *Escherichia coli* virulence genes, pathotypes and antibiotic resistance properties in diarrheic calves in Iran. *Biol. Res.* 47, 28. Doi: 10.1186/0717-6287-47-28
31. Shams, Z., Tahamtan, Y., Pourbakhsh, A., Hosseiny, M. H., Kargar, M., Hayati, M., 2012. Detection of enterotoxigenic K99 (F5) and F41 from fecal sample of calves by molecular and serological methods. *Comp. Clin. Pathol.* 21, 475. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1122-2>
32. Souto, M. S. M., Coura, F. M., Dorneles, E. M. S., Stynen, A. P. R., Alves, T. M., Santana, J. A., Pauletti, R. B., Guedes, R. M. C., Viott, A. M., Heinemann, M. B., Lage, A. P., 2017. Antimicrobial susceptibility and phylotyping profile of pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolates from calves and pigs in Minas Gerais, Brazil. *Trop. Anim. Health. Prod.* 49(1), 13-23. Doi: 10.1007/s11250-016-1152-0.
33. Umpiérrez, A., Acquistapace, S., Fernández, S., Oliver, M., Acuña, P., Reolón, E., Zunino, P., 2016. Prevalence of *Escherichia coli* adhesion-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. *J. Infect. Dev. Ctries.* 10(5), 472-477. Doi: 10.3855/jidc.7102.
34. Younis, E. E., Ahmed, A. M., El-Khodery, S. A., Osman, S. A., El-Naker, Y. F. I., 2009. Molecular screening and risk factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in diarrheic neonatal calves in Egypt. *Res. Vet. Sci.* 87, 373–379. Doi: 10.1016/j.rvsc.2009.04.006.

Enteropatogeni uzročnici dijareje kod neonatalne teladi u području Tiareta (zapadni Alžir)

Apstrakt

Cilj istraživanja jeste određivanje prevalencije rotavirusa, koronavirusa, *Cryptosporidium* spp. i sojeva *E. coli* povezanih sa neonatalnom dijarejom kod jednomjesečne teladi. Pedeset uzoraka fecesa prikupljenih od teladi sa dijarejom je bakteriološki ispitano na *E. coli*, i obavljen je skrining Sandwich ELISA metodom na rotavirus, koronavirus, *Cryptosporidium* spp. i *E. coli*, soj F5. Dominantan enteropatogen je *Cryptosporidium* spp., slijedi *E. coli* F5. Korištenjem specifičnog antiseruma metodom aglutinacije su određeni fimbrijalni adhezini *E. coli* (F5, F17, F41) i afimbrijalni adhezini CS31A. Da bi se procijenila antimikrobna senzitivnost, urađena je i standardna disk-difuziona metoda antibiograma. Bakterijske kulture su u 62% uzoraka dokazale prisustvo *E. coli*. U izolatima *E. coli* su naviše dokazani sojevi F17 u 29% slučajeva, zatim F5 (26%) i CS31A (9.68%). Ukupno 68.75% izolata *E. coli* se pokazalo multirezistentnim na testirane antibiotike. Naše istraživanje pokazuje da su iz fecesa neonatalne teladi sa dijarejom izolirani izrazito rezistentni sojevi *E. coli*, i da je učestalost *Cryptosporidium* spp. u odnosu na druge enteropatogene znatno veća.

Ključne riječi: dijareja neonatalne teladi, *E. coli*, fimbrije, afimbrijalna adhezija, *Cryptosporidium* spp.

ajava

Asian Journal of Animal and Veterinary Advances



Academic
Journals Inc.

www.academicjournals.com



Research Article

Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Cinnamomum aromaticum* Essential Oil Against Four Enteropathogenic Bacteria Associated with Neonatal Calve's Diarrhea

^{1,2,3}Selles Sidi Mohammed Ammar, ²Kouidri Mokhtaria, ^{1,2}Ait Amrane Amar, ^{1,2}Belhamiti Belkacem Tahar, ¹Drideche Moulay, ¹Hammoudi Si Mohamed and ^{1,2}Boukrâa Laid

¹Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, 14000 Tiaret, Algeria

²Institute of Veterinary Science, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, 14000 Tiaret, Algeria

³Faculty of Life and Nature Sciences, Mascara University, Algeria

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the chemical composition and the *in vitro* antibacterial activity of *Cinnamomum aromaticum* essential oil against four strains of enteropathogenic bacteria isolated from neonatal calve's diarrhea namely *Escherichia coli* F5, *Escherichia coli* F17, *Kluyvera* spp. and *Klebsiella* spp. **Methodology:** The essential oil was extracted by hydrodistillation process. The composition was determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID). The agar incorporation method was used to determine the antimicrobial activity of *Cinnamomum aromaticum* essential oil against four strains of enteropathogenic bacteria isolated from neonatal calve's diarrhea including *Escherichia coli* F5, *Escherichia coli* F17, *Kluyvera* spp. and *Klebsiella* spp. **Results:** The results of the study revealed an average yield of the essential oil of $1.46 \pm 0.05\%$ (w/w). About 89 components were identified and quantified. E-cinnamaldehyde was the major compound of the studied essential oil (94.67%). The results showed that the tested essential oil exhibited an antibacterial activity against all tested bacteria at a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of $0.625 \mu\text{L mL}^{-1}$. **Conclusion:** The present investigation revealed that *C. aromaticum* essential oil is potentially good source of antibacterial agents and could be used as against the tested strains causing diarrhea in calves.

Key words: *Cinnamon aromaticum*, essential oil, chemical composition, antibacterial activity, minimal inhibitor concentration

Received: August 30, 2016

Accepted: October 28, 2016

Published: December 15, 2016

Citation: Selles Sidi Mohammed Ammar, Kouidri Mokhtaria, Ait Amrane Amar, Belhamiti Belkacem Tahar, Drideche Moulay, Hammoudi Si Mohamed and Boukrâa Laid, 2017. Chemical composition and antibacterial activity of *Cinnamomum aromaticum* essential oil against four enteropathogenic bacteria associated with neonatal calve's diarrhea. Asian J. Anim. Vet. Adv., 12: 24-30.

Corresponding Author: Selles Sidi Mohammed Ammar, Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, 14000 Tiaret, Algeria Tel: +213-554-200-199 Fax: +213 46 42 71 61

Copyright: © 2017 Selles Sidi Mohammed Ammar *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing Interest: The authors have declared that no competing interest exists.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

INTRODUCTION

Calf diarrhea is a major cause of economic loss with high morbidity and mortality in the cattle industry worldwide¹. The incidence of diarrhea in calves less than 1 month ranges between 15-20% and the greatest risk occurs especially during the first 2 weeks of life². Several enteropathogens were recovered from neonatal calf with diarrhea, their relative prevalence varies geographically³, but the most pathogens commonly incriminated in neonatal calf scours include viral (*Rotavirus* and *Coronavirus*), protozoal (*Cryptosporidium parvum*) and bacterial pathogens (enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 and *Salmonella* spp.)⁴. To compensate this significant economic loss, various and large amounts of antimicrobial drugs are used in calves feed as a preventive and curative purposes⁵. Unfortunately, the randomly used treatment without selecting appropriate antimicrobial compound resulted in the emergence of resistant calf pathogens and commensals, which becomes a serious public health problem throughout the world⁶. Akam *et al.*⁷ reported the resistance of *E. coli* F5+ to tetracycline, ticarcilline, ampicilline in Algerian cattle. Furthermore, De Verdier *et al.*⁸ in Swedish showed that 61% of *E. coli* tested for antimicrobial susceptibility were resistant to one or more substances and 28% were multi-resistant.

Gram-negative bacteria often gain their resistance through the acquisition of a resistance gene from a shared gene pool with the aid of plasmids⁹, resulting in the targeting of the dissemination of plasmids. This is one of the most used strategies by bacteria to circumvent antibiotic resistance at the molecular level¹⁰. Therefore, therapeutic control of multidrug resistant bacteria has a major concern in the area of global public health.

Essential oils, particularly, those from cinnamon, peppermint, tea tree, lavender and marjoram have been well investigated for their general antimicrobial properties against several pathogenic microorganisms¹⁰.

The genus *Cinnamomum* (family: Lauraceae) contains more than 300 evergreen aromatic trees and shrubs. Four species have great economic importance for their multiple culinary uses as common spices including *Cinnamomum zeylanicum* Blume (a synonym of *Cinnamomum verum* J. Presl, known as Sri Lanka cinnamon), *Cinnamomum loureiroi* Nees (known as Vietnamese cinnamon), *Cinnamomum burmanni* (Nees and T. Nees) Blume (known as Indonesian cinnamon) and *Cinnamomum aromaticum* Nees (a synonym of *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl, known as Chinese cinnamon)¹¹.

Cinnamon has a long history of use as preservative and medicinal use in the East¹². It has a reputation as an

effective cure for colds¹³. In ayurvedic medicine it has been used as antiemetic, anti-diarrheal, anti-flatulent and stimulant agent¹¹.

The aim of the present study was to investigate the chemical composition of the essential oil of *Cinnamomum aromaticum* and its antibacterial activity against four strains of bacteria isolated from neonatal calve's diarrhea.

MATERIALS AND METHODS

Extraction of essential oil: The bark of *Cinnamomum aromaticum* was purchased from a specialized store in Tlemcen (Algeria). The essential oil was extracted by hydrodistillation process by mixing 50 g of crushed *Cinnamomum aromaticum* in 500 mL of distilled water for 2 h and 30 min. The extracted essential oil was dried by anhydrous sodium sulphate and stored in sealed vials at 4°C before antibacterial activity testing, Gas Chromatography-Mass Spectrometric (GC-MS) and Gas Chromatography/Flame Ionization Detector (GC/FID) analysis. The average yield of the extracted essential oil was 1.46±0.05% (w/w). The percentage yield of cinnamon essential oil was calculated using the following formula:

$$\text{Yield of essential oil} = \frac{\text{Essential oils weight (g)}}{\text{Sample weight (g)}} \times 100$$

CG/SM and GC/FID analysis: The GC/MS and GC/FID analysis was performed by Sarl Pyrenessences Analysis (Belcaire, France). Briefly, the cinnamon oil was analyzed using a Hewlett Packard 5973, with HP INNOWAX polar column (60 m×0.25 mm×0.25 µm). One microliter essential oil solution diluted in ethanol 10% was injected and analyzed. Helium was the carrier gas with a flow rate of 30 psi/FID; 23 psi/MS. The temperature was programmed at 60°C for 6 min and then increased by 2°C min⁻¹ up to 250°C for 10 min. The compounds were identified by a combined search of retention time and mass spectra (NKS library, 75,000 spectra). The percentages were calculated from the peak areas given by the GC/ FID, without the use of correction factor.

Antimicrobial study

Microorganisms: The antimicrobial activity of the essential oil of *Cinnamomum aromaticum* was evaluated against four strains of Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* F5, *Escherichia coli* F17, *Kluyvera* spp. and *Klebsiella* spp.). The microbial strains used in this study were isolated from neonatal calve's diarrhea.

Preparation of inoculum: Prior to the experiment, bacterial strains were inoculated onto the surface of MacConkey agar media. The inoculum suspensions were obtained by taking five colonies from 24 h cultures. The colonies were suspended in 5 mL of sterile saline (0.85% NaCl) and shaken for 15 sec. The density was adjusted to the turbidity of a 0.5 McFarland Standard (equivalent to $1-5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹).

Antibiotic susceptibility test: Susceptibility to a panel of antimicrobial agents was determined by the standardized disc diffusion assay on Mueller-Hinton agar with commercial antimicrobial susceptibility discs according to the standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level according to WHO recommendations^{14,15}. The tested antibiotics and their corresponding disc concentrations were as follows: Amoxicillin+acid clavulanic (20/10 µg), ampicillin (10 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (10 µg), colistin (10 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), ofloxacin (5 µg) and ciprofloxacin (30 µg). The prepared plates were incubated at 37°C for 24-48 h. The zone of inhibition was recorded and data were interpreted using the standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level according to WHO recommendations^{14,15}.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) measurement:

Screening of essential oil for antibacterial activity was achieved by the incorporation method as described by Amarti *et al.*¹⁶, with slight modifications. The essential oil was dissolved in tween 20, which is prepared in sterile distilled water (1/9 v/v). A serial dilution of cinnamon essential oil was prepared with tween 20 (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 and 1/320). Each test tube contained 4.5 mL of Mueller Hinton agar medium to which were added aseptically 0.5 mL of the prepared dilutions to obtain a final concentrations of 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 v/v. The tubes were thoroughly agitated to disperse the essential oil in the culture medium before pouring in to petri plates. The control contained only the culture medium and the tween 20. The plates were inoculated and incubated at 37°C for 24 h. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by identifying the plates with the lowest concentration of essential oil on which the strain did not grow. Tests were repeated in triplicate. All MIC values are expressed in v/v.

RESULTS

Chemical composition of essential oil: The results concerning the chemical analysis of the essential oil identified by GC-FID

were given in Table 1. In general, the composition was relatively homogeneous. Eighty nine compounds were identified, representing 99.99% of total components. E-cinnamaldehyde (94.67%) was the major component followed by coumarin (0.88%) and cinnamyl acetate (0.74%) (Table 1).

Table 1: Composition of the essential oil of cinnamon

Peak	RT (min)	Components	%
1	5.3	Acetone	0.01
2	6.3	Acetate d'ethyle	0.01
3	7.2	Ethanol	0.25
4	10.6	α-pinene	0.03
5	12.7	Camphene	0.03
6	13.3	Hexanal	0.01
7	15.7	O-xylene	0.01
8	20.1	Limonene	0.03
9	20.8	1,8-cineole	0.10
10	23.1	γ-terpinene	0.01
11	23.9	Styrene	0.01
12	24.8	P-cymene	0.01
13	25.6	Terpinolene	0.01
14	35.7	Ethyl hexanol	0.01
15	36.6	Acide acetique	0.02
16	40.0	α-campholene aldehyde	0.01
17	40.1	α-copaene	0.03
18	42.0	Benzaldehyde	0.29
19	42.9	Linalol	0.03
20	44.9	α, cis-bergamotene	0.01
21	45.3	Pinocarvone	0.01
22	45.6	Fenchol	0.02
23	45.9	Acetate de bornyle	0.14
24	46.4	β-elemene	0.01
25	46.7	Hydrate de camphene	0.01
26	47.0	Terpinene-4-ol	0.10
27	47.2	β-caryophyllene	0.01
28	49.2	Methylene propenyl benzene (MW = 130)	0.01
29	49.8	Benzeneacetaldehyde	0.22
30	49.3	P-methoxy styrene	0.04
31	50.3	Acetophenone	0.02
32	50.8	2-methyl benzofurane	0.01
33	51.1	Isoborneol	0.01
34	51.2	δ-terpineol	0.01
35	51.3	Estragole	0.01
36	51.8	α-humulene	0.01
37	52.0	Aldehyde salicylique	0.02
38	52.7	γ-muurolene	0.01
39	52.8	α-terpineol	0.03
40	53.2	Borneol	0.14
41	54.3	Composé aromatique (MW = 138)	0.01
42	54.9	α-muurolene	0.01
43	55.2	α-selinene	0.01
44	55.7	Carvone	0.02
45	56.6	Dimethyl oxo bicyclohexane (MW = 112)	0.01
46	56.8	δ-cadinene	0.01
47	57.0	Composé (MW = 132)	0.02
48	57.2	γ-cadinene	0.01
49	58.2	Benzene propanal	0.70
50	59.6	Hydroxy phenyl ethanone	0.01
51	60.0	2,4-decadienal	0.03

Table 1: Continue

Peak	RT (min)	Components	%
52	60.9	Trans-carveol	0.01
53	61.3	Geraniol	0.01
54	61.4	Calamenene	0.01
55	61.6	P-cymene-8-ol	0.01
56	62.3	2-hydroxycineole	0.01
57	62.7	4-phenyl-2-butanone	0.01
58	63.3	Alcool benzylique	0.01
59	64.9	Propionate d'ethylphenyle	0.09
60	65.0	Z-cinnamaldehyde	0.01
61	65.2	Alcool phenylethylque	0.01
62	74.1	E-cinnamaldehyde	94.67
63	74.2	Epi-cubenol	0.01
64	74.5	Cubenol	0.03
65	75.7	Sesquiterpenol	0.01
66	77.4	Cinnamate d'ethyle	0.04
67	78.3	Acetate de cinnamyle	0.74
68	78.9	Eugenol	0.01
69	79.3	T-cadinol	0.01
70	80.1	α-muurool	0.04
71	80.6	Cadinol Isomere	0.03
72	80.7	Carvacrol	0.01
73	82.0	Sesquiterpenol	0.01
74	82.3	α-cadinol	0.02
75	83.5	Sesquiterpenol	0.02
76	84.4	Alcool cinnamique	0.36
77	85.0	Epoxyde Sesquiterpenique	0.01
78	86.5	Sesquiterpenol	0.02
79	86.7	Chavicol	0.01
80	87.3	Epoxyde sesquiterpenique	0.04
81	89.1	Epoxyde sesquiterpenique	0.03
82	92.2	Trans-o-methoxy-cinnamaldehyde	0.05
83	93.4	Coumarine	0.88
84	96.4	3-methoxycinnamaldehyde	0.01
85	99.6	Compose aromatique	0.05
86	100.8	Benzoate de benzyle	0.01
87	106.1	α-phellandrene dimere (MW = 268)	0.03
88	107.3	Compose aromatique	0.03
89	108.9	α-phellandrene dimere (MW = 268)	0.03
		Total	99.99

Table 2: Antibiotic susceptibility of tested strains

Antibiotic	A	B	C	D
Ampicillin (10 µg)	R	R	R	R
Amoxicillin+acid clavulanic (20/10 µg)	R	R	R	R
Gentamicin (10 µg)	S	S	S	S
Tetracycline (10 µg)	R	I	R	R
Colistin (10 µg)	S	S	S	S
Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg)	R	S	R	R
Ofloxacin (5 µg)	S	S	R	R
Cifotaxime (30 µg)	S	S	S	S

R: Resistant, S: Sensitive, I: Intermediate, A: *Escherichia coli* F17, B: *E. coli* F5, C: *Kluyvera* spp., D: *Klebsiella* spp.

Antibacterial activity

Antibiotic susceptibility: Regarding the antibiotic susceptibility, all tested strains were susceptible to cefotaxime, colistin and gentamicin. However, three strains were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and two strains were resistant to ofloxacin (Table 2).

Table 3: Antibacterial activity of essential oil of cinnamon

Bacteria	Dilution (v/v)						Control
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	
<i>E. coli</i> F17	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> F5	-	-	-	-	-	+	+
<i>Kluyvera</i> spp.	-	-	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	-	-	-	+	+

-: Inhibition, +: Development

Antimicrobial activity of essential oil (determination of MIC): Table 3 showed the results of the antibacterial activity of the essential oil of *C. aromaticum*. This essential oil exerted strong antibacterial activity. Concentration of 1/1600 v/v was sufficient to inhibit the growth of *Escherichia coli* F17, *Escherichia coli* F5, *Kluyvera* spp. and *Klebsiella* spp.

DISCUSSION

In the present study, the average yield of cinnamon essential oil was $1.46 \pm 0.05\%$ (w/w). A similar result was obtained by Kasim *et al.*¹⁷ with an average yield of 1.82%. Whereas the levels of the essential oil of *Cinnamomum cassia* Bark, from Guangxi and Guangdong Provinces (South China), ranged between 1.69 ± 0.67 to $3.21 \pm 0.12\%$ (w/w)¹⁸. Similarly, higher yields were recovered by Geng *et al.*¹⁹ (2.7-3.3% (w/w)), Li *et al.*²⁰ (2.38%) and Huang *et al.*²¹ (2.76% (v/v)). Likewise, Jeyaratnam *et al.*²² obtained also a high yield (2.55% (w/w)) of essential oil from *C. cassia* by using microwave-assisted hydrodistillation.

Previous studies have shown that the branch bark fraction tended to yield more essential oil compared to the entire branch indicating that selecting the bark based on the tree growth stages as well as separating the stem bark into top, center and lower sections within a tree can significantly improve the extraction efficiency of essential oils²³.

The results of GC/FID were given in Table 1. It can be seen that trans-cinnamaldehyde was the major constituent of cinnamon bark essential oil (94.67%) followed by coumarin (0.88%) and cinnamyl acetate (0.74%). Several studies have mentioned that trans-cinnamaldehyde was the most abundant component in the essential oil *C. aromaticum*^{18,21,24-27}, however, the authors recorded different concentrations. For example, the rates of trans-cinnamaldehyde in the essential oil of *C. aromaticum* analyzed by CG/MS were 97.7, 92.2, 76.9, 72.23, 68.52 and 49.33% as reported by Singh *et al.*²⁴, Giordani *et al.*²⁵, Liu *et al.*²⁶, Poaty *et al.*²⁷, Deng *et al.*¹⁸ and Huang *et al.*²¹, respectively. While Chang *et al.*²⁸ reported that cis-2-methoxycinnamic acid and cinnamaldehyde were the major compounds of the essential oil of *C. aromaticum*

analyzed by GC/MS (43.06 and 42.37%, respectively). Adinew²⁹ mentioned that 2-propanol, 3-phenyl was the major constituent of cinnamon bark essential oil (analyzed by GC-MS and FT-IR) growing in South West of Ethiopia.

The chemical components of cinnamon oil have been extensively studied in the literature. Bruneton³⁰ found that the main component of the cinnamon (*Cinnamomum aromaticum*) bark oil was E-cinnamaldehyde and the content was 90%. It is reported that this essential oil contained little eugenol. Similar results were found in this study (94.67% of E-cinnamaldehyde and 0.01% of eugenol).

Different extraction processes and assay methods could have contributed to differences in cinnamaldehyde levels of cinnamon essential oils³¹. Moreover, the geographical position, cultivation, variety of cinnamon, harvesting time and extraction method affect the effective yield and composition of the essential oil^{29,32}. Medicinal plants have long been, over the years, played a key role in the human health and contributed to the development of modern therapeutic drugs^{33,34}. In addition, plant essential oils and extracts have been used for many thousands of years in food preservation, pharmaceuticals, alternative medicine and natural therapies. Therefore, it is necessary to investigate scientifically these plants used in traditional medicine.

Essential oils are potential sources of novel antimicrobial compounds especially against bacterial pathogens²⁵. In this study, the essential oil of cinnamon showed a strong activity against selected bacterial strains. This study showed a MIC at 0.625 $\mu\text{L mL}^{-1}$ against 4 strains causing neonatal diarrhea in young calves. Lu *et al.*³⁵ reported similar results, with a MIC ranging between 0.1-0.4 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Several studies showed that the essential oil of cinnamon exhibited strong and consistent inhibitory effects against various pathogens by Matan *et al.*³⁶ and Prabuseenivasan *et al.*³⁷.

Huang *et al.*²¹ reported higher values of MIC of essential oils of *C. cassia* against two Gram-negative bacteria, namely *S. typhimurium* and *E. coli*, with concentration of 10 mg mL^{-1} .

Moreover, Mith *et al.*³⁸ showed a MIC of essential oils of *C. cassia* with 0.5/1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ and 0.25/0.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ against *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 and *E. coli* O157:H7 S0575, respectively.

Chao *et al.*³⁹ tested the antimicrobial activity of 45 essential oils on bacteria, fungi and yeast and found that cinnamon bark oil exhibited a high and broad-spectrum antimicrobial property. This strong antibacterial property of the essential oil of cinnamon is mainly due to its constituents, including cinnamaldehyde, which particularly displayed strong antibacterial activity compared to the other

components^{24,40}. In addition, Unlu *et al.*⁴¹ reported that cinnamaldehyde is a main component of the essential oils of cinnamon, this component was effective against some Gram positive and Gram-negative bacteria. Furthermore, Nazzaro *et al.*⁴² reported that cinnamaldehyde has at least three mechanisms of action against bacteria. At low concentrations, it inhibits enzymes involved in cytokine interactions or other less important cell functions and at higher concentrations, it acts as an ATPase inhibitor. At a lethal concentration, cinnamaldehyde perturbs the membrane. Some studies have reported conflicting information's on the membrane-perturbing activity of cinnamaldehyde. For example, a sub-lethal concentration of the molecule does not affect the integrity of the membrane in *E. coli* but can inhibit the growth and bioluminescence of the microorganism *Photobacterium leiognathi*; this suggests that cinnamaldehyde gains access to the periplasm and perhaps also to the cytoplasm. Cinnamaldehyde is indeed capable of altering the lipid profile of the microbial cell membrane.

CONCLUSION

The present study revealed that *Cinnamomum aromaticum* essential oil is potentially good source of antibacterial agents and could be an alternative for the treatment of diarrhea in calves caused by the tested strains. Further *in vivo* investigations and clinical trials are needed to justify the potential use of this oil as an antibacterial agent against bacteria causing neonatal calves' diarrhea.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their special thanks to the staff members Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret (Algeria). The authors are also grateful to Dr. Hamri Mokhtar and Dr. Rezki Hamza for their collaboration during this study.

REFERENCES

1. Cho, Y.I., J.I. Han, C. Wang, V. Cooper, K. Schwartz, T. Engelken and K.J. Yoon, 2013. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. *Vet. Microbiol.*, 166: 375-385.
2. Vandeputte, S., J. Dettleux, S. Carel, B. Bradfer, H. Guyot and F. Rollin, 2010. Evaluation of a bovine concentrated lactoserum for preventing neonatal diarrhoea in Belgian blue calves. *Open Vet. Sci. J.*, 4: 36-40.

3. Garcia, A., J.A. Ruiz-Santa-Quiteria, J.A. Orden, D. Cid, R. Sanz, M. Gomez-Bautista and F.R. De La Fuente, 2000. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 175-183.
4. Izzo, M.M., P.D. Kirkland, V.L. Mohler, N.R. Perkins, A.A. Gunn and J.K. House, 2011. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust. Vet. J.*, 89: 167-173.
5. Dheilly, A., A. Bouyoucef, L. Le Devendec, G. Hellard and I. Kempf, 2011. Clinical and microbial efficacy of antimicrobial treatments of experimental avian colibacillosis. *Vet. Microbiol.*, 149: 422-429.
6. Abu Raihan, M., I.H. Ansari, M.M. Rahman, M.Z. Islam and B.C. Das *et al.*, 2014. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from diarrheic calves. *J. Anim. Health Prod.*, 2: 12-15.
7. Akam, A., A. Bouyoucef, K. Rahal, M. Lafri and R. Kaidi *et al.*, 2008. Frequence d'isolement et antibioresistance des souches d'*Escherichia coli* F5+ isolees chez les veaux de la mitidja (Algerie). *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca. Vet. Med.*, 64: 20-25.
8. De Verdier, K., A. Nyman, C. Greko and B. Bengtsson, 2012. Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Vet. Scand.*, Vol. 54. 10.1186/1751-0147-54-2.
9. Garcillan-Barcia, M.P., A. Alvarado and F. de la Cruz, 2011. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35: 936-956.
10. Yap, P.S.X., S.H.E. Lim, C.P. Huc and B.C. Yiap, 2013. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*, 20: 710-713.
11. Nabavi, S.F., A. Di Lorenzo, M. Izadi, E. Sobarzo-Sanchez, M. Daglia and S.M. Nabavi, 2015. Antibacterial effects of cinnamon: From farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. *Nutrients*, 7: 7729-7748.
12. Yang, C.H., R.X. Li and L.Y. Chuang, 2012. Antioxidant activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. *Molecules*, 17: 7294-7304.
13. Sharaf, A., M.S. Mishra and K. Sharma, 2011. Antibacterial activity of commercial and wild *Cinnamon* species. *J. Phytol.*, 3: 102-106.
14. MoARD., 2008. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria, 4th Edn.
15. MoARD., 2011. Standardization of antimicrobial susceptibility testing in the veterinary medicine at the national level, according to WHO recommendations. Ministry of Agriculture and Rural Development, Ministry of Health, Population and Hospital Reform (Democratic and Popular Republic of Algeria), 6th Edn.
16. Amarti, F., B. Satrani, M. Ghanmi, A. Farah and A. Aafi *et al.*, 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut. and *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. essential oils of Morocco. *Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement*, 14: 141-148.
17. Kasim, N.N., S.N.A.S. Ismail, N.D. Masdar, F. Ab Hamid and W.I. Nawawi, 2014. Extraction and potential of cinnamon essential oil towards repellency and insecticidal activity. *Int. J. Scient. Res. Publ.*, 4: 1-6.
18. Deng, X., Q. Liao, X. Xu, M. Yao and Y. Zhou *et al.*, 2014. Analysis of essential oils from cassia bark and cassia twig samples by GC-MS combined with multivariate data analysis. *Food Anal. Methods*, 7: 1840-1847.
19. Geng, S., Z. Cui, X. Huang, Y. Chen, D. Xu and P. Xiong, 2011. Variations in essential oil yield and composition during *Cinnamomum cassia* bark growth. *Ind. Crops Prod.*, 33: 248-252.
20. Li, Y.Q., D.X. Kong and H. Wu, 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. *Ind. Crops Prod.*, 41: 269-278.
21. Huang, D.F., J.G. Xu, J.X. Liu, H. Zhang and Q.P. Hu, 2014. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. *Microbiology*, 83: 357-365.
22. Jeyaratnam, N., A.H. Nour, R. Kanthasamy, A.H. Nour, A.R. Yuvaraj and J.O. Akindoyo, 2016. Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation. *Ind. Crops Prod.*, 92: 57-66.
23. Rao, P.V. and S.H. Gan, 2014. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, Vol. 4. 10.1155/2014/642942.
24. Singh, G., S. Maurya, M.P. de Lampasona and C.A.N. Catalan, 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem. Toxicol.*, 45: 1650-1661.
25. Giordani, R., P. Regli, J. Kaloustian and H. Portugal, 2006. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytother. Res.*, 20: 58-61.
26. Liu, X.C., J. Cheng, N.N. Zhao and Z.L. Liu, 2014. Insecticidal activity of essential oil of *Cinnamomum cassia* and its main constituent, trans-Cinnamaldehyde, against the booklice, *Liposcelis bostrychophila*. *Trop. J. Pharmaceut. Res.*, 13: 1697-1702.

27. Poaty, B., J. Lahlah, F. Porqueres and H. Bouafif, 2015. Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven essential oils from the North American boreal forest. World J. Microbiol. Biotechnol., 31: 907-919.
28. Chang, C.T., W.L. Chang, J.C. Hsu, Y. Shih and S.T. Chou, 2013. Chemical composition and tyrosinase inhibitory activity of *Cinnamomum cassia* essential oil. Bot. Stud., Vol. 54. 10.1186/1999-3110-54-10.
29. Adinew, B., 2014. GC-MS and FT-IR analysis of constituents of essential oil from Cinnamon bark growing in South-west of Ethiopia. Int. J. Herbal Med., 1: 22-31.
30. Bruneton, J., 2009. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 4th Edn., Lavoisier, Paris.
31. Dugoua, J.J., D. Seely, D. Perri, K. Cooley, T. Forelli, E. Mills and G. Koren, 2007. From type 2 diabetes to antioxidant activity: A systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark. Can. J. Physiol. Pharmacol., 85: 837-847.
32. Bernard, T., F. Perineau, M. Delmas and A. Gaset, 1989. Extraction of essential oils by refining of plant materials. II. Processing of products in the dry state: *Illicium verum Hooker* (fruit) and *Cinnamomum zeylanicum* Nees (bark). Flavour Fragrance J., 4: 85-90.
33. Cragg, G.M., D.J. Newman and K.M. Snader, 1997. Natural products in drug discovery and development. J. Nat. Prod., 60: 52-60.
34. Shu, Y.Z., 1998. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. J. Nat. Prod., 61: 1053-1071.
35. Lu, F., Y.C. Ding, X.Q. Ye and Y.T. Ding, 2011. Antibacterial effect of cinnamon oil combined with thyme or clove oil. Agric. Sci. China, 10: 1482-1487.
36. Matan, N., H. Rimkeeree, A.J. Mawson, P. Chompreeda, V. Haruthaithanasan and M. Parker, 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. Int. J. Food Microbiol., 107: 180-185.
37. Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar and S. Ignacimuthu, 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oil. BMC Complement. Altern. Med., Vol. 6. 10.1186/1472-6882-6-39.
38. Mith, H., R. Dure, V. Delcenserie, A. Zhiri, G. Daube and A. Clinquart, 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. Food Sci. Nutr., 2: 403-416.
39. Chao, S.C., D.G. Young and C.J. Oberg, 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J. Essent. Oil Res., 12: 639-649.
40. Chang, S.T., P.F. Chen and S.C. Chang, 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. J. Ethnopharmacol., 77: 123-127.
41. Unlu, M., E. Ergene, G.V. Unlu, H.S. Zeytinoglu and N. Vural, 2010. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). Food Chem. Toxicol., 48: 3274-3280.
42. Nazzaro, F., F. Fratianni, L. de Martino, R. Coppola and V. de Feo, 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals, 6: 1451-1474.

In vitro synergistic antioxidant activity of honey-Mentha spicata combination

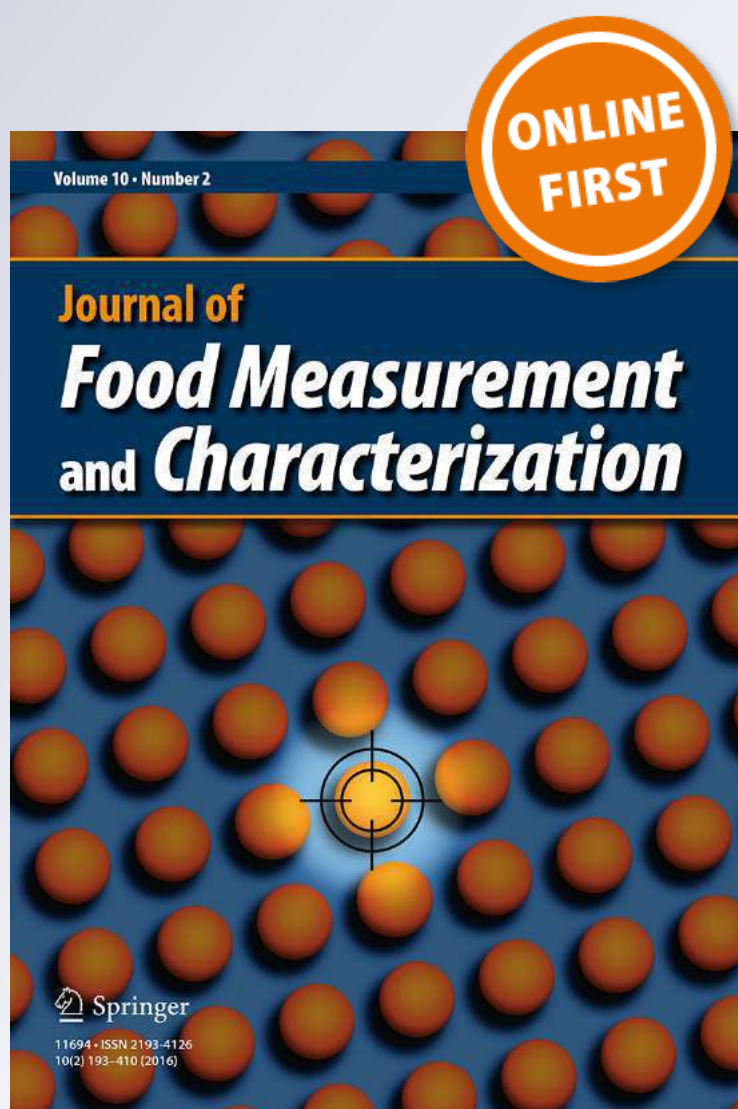
Yuva Bellik & Sidi Mohamed Amar Selles

Journal of Food Measurement and Characterization

ISSN 2193-4126

Food Measure

DOI 10.1007/s11694-016-9377-1



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media New York. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

In vitro synergistic antioxidant activity of honey-*Mentha spicata* combination

Yuva Bellik¹ · Sidi Mohamed Amar Selles²Received: 26 March 2016 / Accepted: 11 July 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The beneficial health effects including antioxidant properties of mint (*Mentha spicata*) and honey have been extensively studied. However, there is no data about the effect of their associated use. In this study the total phenolic and flavonoid contents of individual extracts of mint and honey and their combination were determined. The antioxidant activity was investigated by using reducing power, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt (ABTS), and chelating power methods. The results showed that individual extracts contained important quantity of phenolics and flavonoids and their combination was found to produce best antioxidant activity. A positive correlation between the phenolic/flavonoid contents and antioxidant activity, especially with free radical scavenging ability and chelating power, was observed. These findings suggest that combined mixture of honey and mint could be used as promising additive foods.

Keywords Honey · Mint · Phenolics · Flavonoids · Combination · Antioxidant properties

Introduction

Medicinal plants have long been, over the years, played a key role in the human health and contributed to the development of modern therapeutic drugs [1, 2]. In recent decades, much interests have been generated by scientists and epidemiologists for wide ranges of phytochemicals with reports demonstrating their protective effects against a growing list of diseases [3, 4].

The genus *Mentha* has been used as functional foods and as a source of physiologically beneficial medicines, while being devoid of undesirable side-effects. The *Mentha* species like *Mentha spicata* was found to be medically active in several therapies, such as anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antispasmodic, carminative, insecticidal, etc., reviewed by Duke et al. [5]. This species is a rich source of polyphenolics and flavonoids which involves the ability to scavenge free radicals through electron transfer with reactive oxygen species (ROS) [6]. In addition, *Mentha spicata* is characterized by its volatile oils that are used as food and flavouring materials [7]. Therefore, it is cultivated as industrial crops in several countries. The development of mint, especially mint oils, became one of the most distinct agricultural industry in USA around 1925 and it became soon world's largest Agrobased enterprise in Japan, China, India, and Brazil [8].

Among the natural products used by humankind, the history of honey is undoubtedly the most adventurous, the most interesting, and the most romantic. The use of honey for the treatment of diseases is associated to folk medicine from different parts of the world [9]. There are several scientific reports indicating a great variety of pharmacological activities of honey, particularly antioxidant, antimicrobial and antiviral activity [6, 10, 11], treatment of wounds [12], burns [13], skin ulcers [14] and inflammations [15]. The healing

✉ Yuva Bellik
y.bellik@univ-bba.dz

¹ Department of Biology, Faculty of Life and Nature Sciences, Mohamed El Bachir El Ibrahimi University, 34000 Bordj Bou Arreridj, Algeria

² Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, 14000 Tiaret, Algeria

property of honey is due to its chemical composition [16, 17]. Honey contains abundant amounts of polyphenols and flavonoids which confer it good antioxidant properties [18, 19]. The antimicrobial action is due to its acidity, hydrogen peroxide content, osmotic effects, nutritional and antioxidant content [20]. The anti-inflammatory effect of honey is most likely mediated through its ability to inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), TNF- α , and IL-6 [21].

Many traditionally used plants and bee products exhibit greatly improved pharmacological outcomes when used in combination than when used individually [22–24]. In fact, synergistic interactions between the constituents of natural products considerably contribute to the enhancement of their therapeutic efficacy. Yoïrish [25] have mentioned that honey can be used in combination with a large number of medicinal plants. For example, the mixture of honey with mint is recommended in cases of abdominal pains [25]. However, there is a scarcity of experimental work designed on honey–*Mentha spicata* combination and there is a real need for a better definition of the therapeutic properties of their associated use. Therefore, this study aimed to investigate the synergistic antioxidant activity of individual honey and mint extracts and their combination by various in vitro antioxidant tests.

Materials and methods

Chemicals

The following reagents: Folin-Ciocalteu (FC) reagent, anhydrous sodium carbonate, aluminum chloride, gallic acid, quercetin, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, potassium dihydrogen phosphate, dipotassium hydrogen phosphate, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt), potassium persulfate, ferrous sulfate, ferrozine, were obtained from commercial suppliers and used without further purification.

Honey samples

Two Multi-flora honey samples were used in this study. Honey samples were collected from beekeepers in the region of Bejaïa located in Northeastern Algeria. Honey samples were given numbers prior experiment and were stored in a refrigerator in airtight plastic containers until analysis.

Plant materials

The green mint (*Mentha spicata*) was harvested in remote areas in the suburbs of the city of Tiaret located in

Southwestern Algeria during the month of June 2014 and dried at 37 °C in oven before extraction. The dried plant material was ground into a fine powder (1 mm particles) using an electric mill (Ika Labortechnik, Staufen, Germany).

Preparation of extracts

Preparation of mint extracts was carried out with different methods (agitation and maceration). First, five grams of the dried plant material was extracted using distilled water (100 ml), with continuous swirling for 3 h at room temperature using an orbital shaker. After extraction the extract was filtered using a strainer to remove rough particles and then centrifuged to obtain a clear supernatant liquid at a final concentration of 50 mg/ml, designated as Mint 1. Secondly, dried plant material (1 g) was macerated with 100 ml distilled water for 24 h. Filtration and collection of the extract was completed using Whatman N° 4 paper. The obtained filtrate (final concentration 10 mg/ml) was designated as Mint 2. The crude extracts were stored at 0–4 °C before analysis.

Preparation of honey-mint combination

In the present work, extracts were studied separately or in combination in a specific ratio in distilled water. Honey samples were studied at concentration of 100 mg/ml: one g of each sample of honey was treated with 10 ml of distilled water.

For honey-mint combination, one g of each honey sample was treated with 10 ml of each diluted mint extract (1 ml of mint crude extract in 9 ml of distilled water).

Total phenolic content

Total phenolic contents were estimated using Folin–Ciocalteu method [26]. Briefly, aliquots (200 μ L) of all individual and combined extracts or standard solution of gallic acid (0.02, 0.04, 0.06, 0.08 and 0.1 mg/mL), used to establish the calibration curve, were added to 500 μ L of Folin–Ciocalteu reagent (10 %). The reagents were thoroughly mixed by shaking. The mixture was incubated at room temperature for 5 min, before 1500 μ L of Na₂CO₃ (7.5 %) were added. All the reaction mixtures were then shaken and incubated for 30 min. The absorbance of blue mixtures was recorded at 765 nm using a double beam UV–Visible spectrophotometer (Shimadzu UV-1601, Japan). Total phenolic contents were expressed as milligram of gallic acid equivalent (GAE)/g of honey or mint by using an equation obtained from the standard curve of gallic acid: $y = 9.04x + 0.029$ ($R^2 = 0.998$).

Total flavonoid assay

The total flavonoid contents were measured by colorimetric assay [27], using quercetin for preparing the calibration curve. One mL of all individual and combined extracts or standard solution of quercetin (0.005, 0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 mg/mL) was reacted with 1 mL of aluminum chloride (2 %). After incubation at room temperature for 1 h, the absorbance of the reaction mixture was measured at 420 nm. Total flavonoid contents were calculated as milligram of quercetin equivalent (QE)/g from the calibration curve: $y = 6.406x + 0.012$ ($R^2 = 0.993$).

Antioxidant activity

Ferric reducing power

The Fe^{3+} reducing power of honey and mint was determined by the method of Oyaizu [28]. A volume of 2.5 mL of each extract and combination was mixed with 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 mL of potassium ferricyanide (1 %). The mixtures were incubated for 20 min at 50 °C. After incubation, 2.5 mL of trichloroacetic acid (10 %) were added to the mixtures, followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. The upper layer (1 mL) was mixed with 1 mL of distilled water and 0.5 mL of ferric chloride (0.1 %). The absorbance of the obtained solution was measured at 700 nm.

DPPH free radical scavenging activity

The capacity to scavenge the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was assessed according to the method described previously [29]. Two mL of each extract and combination were added to 0.2 mL solution of DPPH radical in ethanol (final concentration of DPPH was 0.5 mM). The mixture was shaken and kept in the dark for 30 min, the absorbance of the resulting solution was measured at 517 nm. Inhibition of free radical DPPH in percent (DPPH I%) was calculated as follows:

$$\text{DPPH I\%} = 100 \times (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}$$

where A_{blank} represents the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the tested compound), and A_{sample} represents the absorbance of the tested compound.

ABTS^{o+} free radical scavenging activity

Antioxidant activity was measured by using radical cation decolorization assay [30]. This assay is based on the inhibition of the absorbance of the free radical cation from ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic

acid diammonium salt) by antioxidants. ABTS was incubated with potassium persulfate in order to produce the free radical cation (ABTS^{o+}). In brief, ABTS was dissolved in deionized water to make a 7 mM concentration solution. ABTS^{o+} was produced by mixing ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate and the mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 12–16 h before use. For our study, the ABTS^{o+} solution was diluted to an absorbance of 0.7 (± 0.02) at 734 nm. After addition of 2 mL of diluted ABTS^{o+} to 20 μ L of each extract and combination. The absorbance reading was taken exactly 6 min after initial mixing. Radical scavenging activity was expressed as the percentage of inhibition.

Ferrous ion chelating activity

The ferrous ion chelating (FIC) activity was measured by the method of Dinis et al. [31]. One milliliter of 0.125 mM $FeSO_4$, and 1 mL of 0.3125 mM ferrozine were mixed with 1 mL of each sample. The mixture was allowed to equilibrate for 10 min before measuring the absorbance at 562 nm. The ability of the sample to chelate ferrous ion was calculated relative to the control (consisting of iron and ferrozine only) using the following formula

$$\text{Chelating effect \%} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

Statistical analysis

All assays were carried out in triplicates and results are expressed as mean \pm SD. Statistical comparisons were done with Student *t* test or ANOVA test. Differences were considered to be significant at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

Results and discussion

Determination of total phenolic and flavonoid contents

The contents of total phenolic and flavonoid have been proved to be positively correlated with antioxidant activity [32]. Therefore, the variation in the contents of phenolic and flavonoid compounds in individual and combined extracts was investigated. It was found that the phenolic and flavonoid contents of *Mentha spicata* were significantly higher than that of honey. The total polyphenol contents of mint extracts showed the highest total polyphenols (35.47 ± 0.08 and 15.5 ± 0.06 mg GAE/g) when compared to honey samples (0.35 ± 0.01 and 0.32 ± 0.01 mg GAE/g) (Table 1). As well, the total flavonoid contents were significantly much higher for mint

extracts (32.03 ± 0.47 and 27.49 ± 0.32 mg QE/g) than honey samples (0.23 ± 0.00 and 0.12 ± 0.01 QE/g) (Table 1).

The average content of total polyphenols and flavonoids was in agreement with that reported in literature for Multiflora and Acacia honey [18, 33, 34]. The total polyphenol and flavonoid contents of mint extracts were slightly higher than those reported by Kanatt et al. [6] who obtained a total phenolic and flavonoid content of 25.62 ± 3.14 mg catechin equivalent/g and 13.5 ± 1.38 mg catechin equivalents/g, respectively, while very lower to those reported by Doman et al. [35] who obtained a total phenolic content in the range of 128–230 mg gallic acid equivalents/g.

Table 1 revealed that the total phenolic and flavonoid contents in all combined extracts exhibited various increases. The total polyphenol and flavonoid contents of combined extracts ranged from 0.62 ± 0.01 to 0.72 ± 0.02 mg GAE/g and from 0.55 ± 0.01 to 0.95 ± 0.00 mg QE/g, respectively.

Ferric reducing power

Reducing power measures the ability of an antioxidant to donate an electron [29]. These antioxidants trap the free radicals, act on certain peroxide precursors, and prevent the peroxidation chain reaction. Figure 1 shows a significant ($p < 0.05$) reducing power of combined and individual extracts. The reducing power ranged from 0.27 ± 0.04 to 0.78 ± 0.02 for individual extracts and evolved from 0.70 ± 0.04 to 0.95 ± 0.01 for combined extracts. The reducing power of the combined extracts is clearly higher than that of the individual extracts. The ferric reducing power of the studied honeys was similar to that obtained in our previous study on Lavender honey [19]. Regarding mint extracts, our results were practically in agreement with other previous report [6].

The antioxidant activity of many compounds of botanical origin is function of their phenolic and flavonoid compounds including quercetin, catechin, epicatechin,

rutin, myricetin, luteolin, apigenin and naringenin. This potentiating antioxidant effect is probably due to the high reducing potential of polyphenols present in the combined extracts. In addition, the metal-chelating ability of phenolics could also be related to the high nucleophilic character of the aromatic rings rather than to specific chelating groups within the molecule [36].

DPPH radical-scavenging activity

DPPH assay has been widely used for the evaluation of free radical scavenging activity of plant extracts, food material or single compounds [37]. It has been established that the bleaching of the DPPH solution increased regularly with increasing amount of polyphenols [29]. Figure 2 illustrates the results of the antiradical activity expressed as a percentage inhibition of DPPH. Likewise, in the reducing power test, a significant ($p < 0.05$) scavenging effect of individual and combined extracts was noticed. The scavenging activity varied from 35.28 ± 2.72 to 51.20 ± 1.32 % for individual extracts and ranged from 40.74 ± 1.41 to 49.04 ± 2.09 % for combined extracts. The studied honeys were slightly less active against DPPH free radical when compared to the results recorded by Beretta et al. [18] who studied various honey samples from different floral sources and demonstrated that Multiflora honey was the most active ($IC_{50} = 5.32 \pm 0.03$ mg/mL).

A higher IC_{50} value ($25.8 \mu\text{g/ml}$) has been reported for mint extract [6]. Jain et al. [27] studied in vitro antioxidant activity of individual plant extract and combined formulation of plants *Camellia sinensis*, *Vitis vinifera*, *Phyllanthus emblica* L., *Punica granatum*, *Cinnamomum cassia*, *Ginkgo biloba* L. and concluded that selected combination of extracts produce their effect in synergistic manner with green tea. Furthermore, Palafox-Carlos et al. [38] found a synergistic effect in the majority of the all combinations of phenolics (chlorogenic, gallic acid, protocatechuic and vanillic acid) using the DPPH assay.

Table 1 Total phenolic and flavonoid contents of honey and mint extracts and honey-mint combination

Samples	Phenolic content (mg GAE/g)	Flavonoid content (mg QE/g)
Honey 1	0.35 ± 0.01^f	0.23 ± 0.00^g
Honey 2	0.32 ± 0.01^g	0.12 ± 0.01^h
Mint 1	15.5 ± 0.06^b	27.49 ± 0.32^b
Mint 2	35.47 ± 0.08^a	32.03 ± 0.47^a
Honey 1 + Mint 1	0.071 ± 0.02^c	0.95 ± 0.00^c
Honey 1 + Mint 2	0.072 ± 0.02^c	0.73 ± 0.00^e
Honey 2 + Mint 1	0.65 ± 0.00^d	0.76 ± 0.00^d
Honey 2 + Mint 2	0.62 ± 0.01^e	0.55 ± 0.01^f

Values are mean \pm SD ($n = 3$). For each column, values with different letters (a–h) are statistically different at $p < 0.05$ as measured by factorial variance (ANOVA)

Fig. 1 Reducing power of honey and mint extracts and honey-mint extracts combinations by the spectrophotometer detection of the $\text{Fe}_3^+ \rightarrow \text{Fe}_2^+$ transformations. Values are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). Values with different letters are statistically different at $p < 0.05$

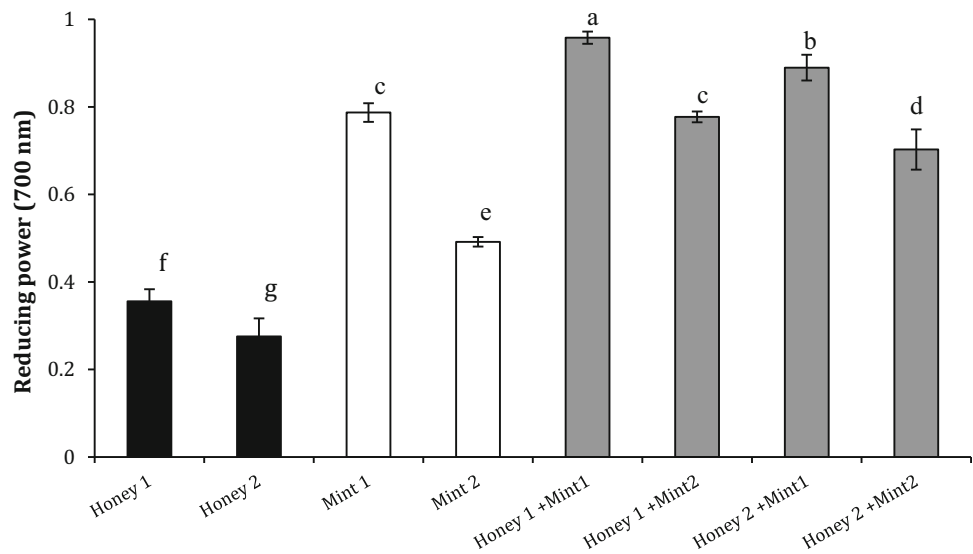
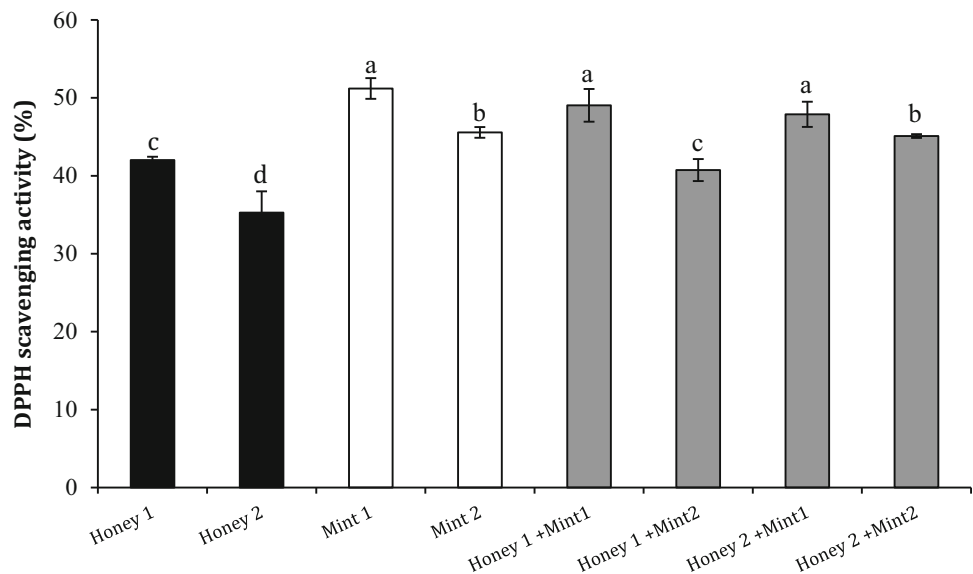


Fig. 2 Free radical scavenging activity of honey and mint extracts and honey-mint extracts combinations by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Values are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). Values with different letters are statistically different at $p < 0.05$



ABTS radical-scavenging activity

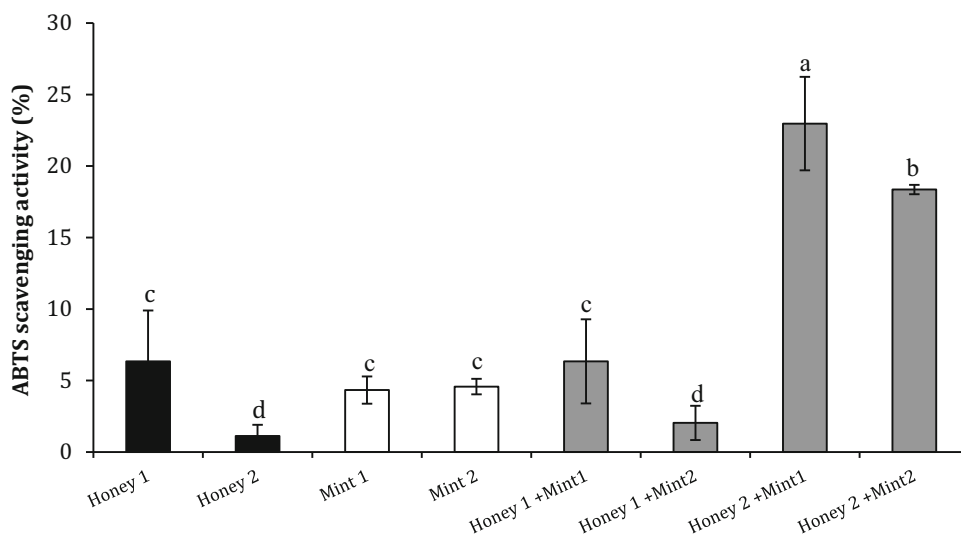
The ABTS assay is one of the most frequently used analytical strategies for evaluating antioxidant activity. The reliable method to determine radical scavenging capacities involves the measurement of the disappearance of free radicals, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) [39]. It also appears that, as for reducing power and DPPH scavenging activity, individual and combined extracts possessed important antioxidant activity (Fig. 3). The scavenging activity ranged from 1.12 ± 0.77 to 6.33 ± 3.55 % for individual extracts and evolved from 2.03 ± 1.19 to 22.96 ± 3.26 % for combined extracts. The reducing power, DPPH, and ABTS

assays showed comparable results for the antioxidant activity. These findings corroborate previous report [40].

Chelating power

During lipid peroxidation, iron generally acts as a potent catalyst and enhances the extent of Fenton reaction which is implicated in many diseases [41]. Thus the ability of honey and mint to bind the metal was tested by evaluating their capacity to compete with ferrozine for ferrous ion and avoiding the formation of the coloured complex with absorbance peak at 562 nm. A large decrease in absorbance indicates a strong chelating power. In the present study honey-mint combination showed low iron-chelating activity (Fig. 4).

Fig. 3 Free radical scavenging activity of honey and mint extracts and honey-mint extracts combinations by 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid radical. Values are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). Values with different letters are statistically different at $p < 0.05$



Despite the fact that honey and, especially, mint showed important phenolic and flavonoid contents, which involves the presence of many hydroxyl groups capable of chelating metal ions, they showed low iron-chelating activity. The same conclusion has been noted previously [6, 35]. The authors suggested that the antioxidant action of mint and honey extracts is probably due to chain termination by radical-scavenging activity rather than iron chelation. In addition, very often, the antioxidant value of a food constituent is not limited to its ability to scavenge free radicals. Nevertheless, it is of high importance to consider the presence of other compounds in the food matrix that may contribute to the inhibitory, additive, or synergistic effect of the compound [42].

In the present study, a positive correlation between the phenolic/flavonoid contents and antioxidant activity, especially, with chelating power and free radical (DPPH)

scavenging abilities was observed (Table 2). The results suggest that both polyphenol and flavonoid compounds contributed significantly to the antioxidant capacities.

Conclusion

The objective of the present work was to study the antioxidant activities of selected individual honey and mint extracts and their combination using different antioxidant tests. The results showed that individual extracts contained important quantity of phenolics and flavonoids and their combination was found to produce best antioxidant activity. These findings may afford useful basis for the alleged synergistic effects of natural food and facilitate their application in combination as functional foods and dietary supplements.

Fig. 4 Iron-chelating activity of honey and mint extracts and honey-mint extracts combinations. Values are expressed as mean \pm standard deviation ($n = 3$). Values with different letters are statistically different at $p < 0.05$

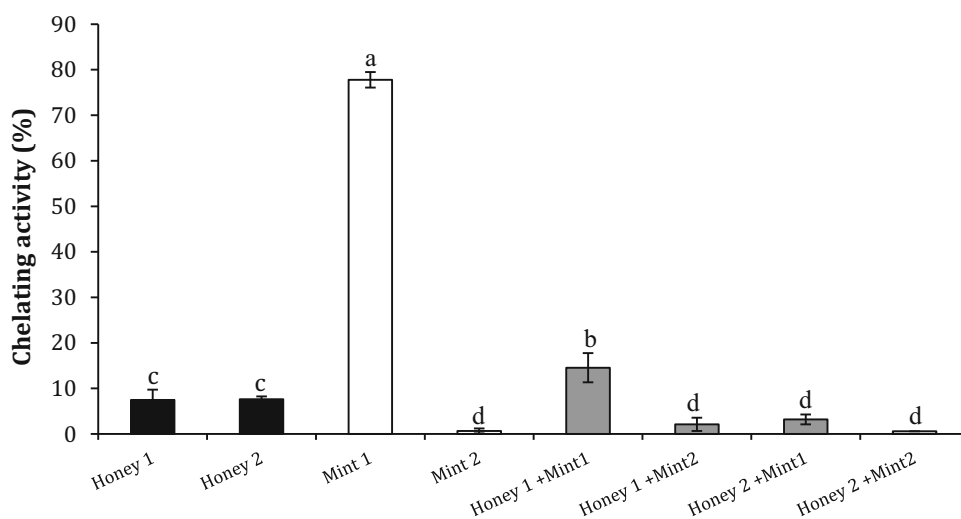


Table 2 Correlation matrix between antioxidant activity and biochemical component

	TPC	FRAP	DPPH	ABTS	FICA
<i>Biochemical component</i>					
TPC	1				
<i>Antioxidant activity</i>					
FRAP	-0.155	1			
DPPH	0.297	0.743	1		
ABTS	-0.260	0.425	0.388	1	
FICA	0.204	0.229	0.524	-0.25	1
<i>Biochemical component</i>					
TFC	1				
<i>Antioxidant activity</i>					
FRAP	-0.047	1			
DPPH	0.441	0.743	1		
ABTS	-0.286	0.425	0.388	1	
FICA	0.518	0.229	0.524	0.25	1

TPC total phenolic content, TFC total flavonoid content, FRAP ferric reducing antioxidant power, DPPH 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging activity, ABTS 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid diammonium salt, FICA ferrous ion chelating activity

References

- G.M. Cragg, D.J. Newman, K.M. Snader, Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**, 52–60 (1997)
- Y.Z. Shu, Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* **61**, 1053–1071 (1998)
- J. Wen, K.R. You, S.Y. Lee, C.H. Song, D.H. Kim, Oxidative stress-mediated apoptosis. The anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J. Biol. Chem.* **277**, 38954–38964 (2002)
- C. Wiart, *Lead compounds from medicinal plants for the treatment of cancer*, 1st edn. (Elsevier, Amsterdam, 2013)
- J.A. Duke, M.J. Bogenschultz-Godwin, J. duCellier, P.A.K. Duke, *Handbook of medicinal herbs*, 2nd edn. (CRC Press, New York, 2002)
- S.R. Kanatt, R. Chander, A. Sharma, Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.* **100**, 451–458 (2007)
- B.M. Lawrence, *Mint: the genus of menthe* (CRC Press, New York, 2007)
- H. Panda, *Cultivation and utilization of aromatic plants* (Asia Pacific Business Press, New Delhi, 2005)
- Y. Bellik, L. Boukraâ, Honey an ethnomedicine, in *Honey in traditional and modern medicine*, ed. by L. Boukraâ (CRC Press, New York, 2013), pp. 1–10
- N.S. Al-Waili, Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. *J. Med. Food* **7**, 210–222 (2004)
- A. Shahzad, R.J. Cohrs, In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): a translational medicine study for potential remedy for shingles. *Transl. Biomed.* **3**, 2 (2012)
- P.C. Molan, The role of honey in the management of wounds. *J. Wound Care* **8**, 415–418 (1999)
- P.C. Molan, Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 9–13 (2001)
- G. Lasey, A. Van Rij, Manuka honey and leg ulcers. *New Zealand Med. J.* **13**, 216 (1997)
- M. Candiracci, E. Piatti, M. Dominguez-Barragán, D. García-Antrás, B. Morgado, D. Ruano, J.F. Gutiérrez, J. Parrado, A. Castaño, Anti-inflammatory activity of a honey flavonoid extract on lipopolysaccharide-activated N13 microglial cells. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 12304–12311 (2012)
- G.A. Nayik, V. Nanda, Physico-chemical, enzymatic, mineral and color characterization of three different varieties of honeys from Kashmir valley of India with a multivariate approach. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **65**, 101–108 (2015)
- I.S. Arvanitoyannis, C. Chalhoub, P. Gotsiou, P. Lydakakis-Simantiris, Kefalas, Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (Multivariate analysis) for detecting honey authenticity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 193–203 (2005)
- G. Beretta, P. Granata, M. Ferrero, M. Orioli, R. Maffei, Facino, Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **533**, 185–191 (2005)
- H.A. Alzahrani, R. Alsabehi, L. Boukraâ, F. Abdellah, Y. Bellik, B.A. Bakhotmah, Antibacterial and antioxidant potency of floral honeys from different botanical and geographical origins. *Molecules* **17**, 10540–10549 (2012)
- R. Yaghoobi, A. Kazerouni, O. Kazerouni, Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: a review. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* **8**, 100–104 (2013)
- S.Z. Hussein, K.M. Yusoff, S. Makpol, Y.A.M. Yusof, Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE(2), TNF-alpha, and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in rats. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **13**, (2012)
- L. Boukraâ, Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa*. *Alt. Med. Rev.* **13**, 330–333 (2008)
- Y. Bellik, L. Boukraâ, H.A. Alzahrani, B.A. Bakhotmah, F. Abdellah, S.M. Hammoudi, M. Iguer-Ouada, Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules* **18**, 322–353 (2012)
- X. Xu, F. Li, X. Zhang, P. Li, X. Zhang, Z. Wu, D. Li, In vitro synergistic antioxidant activity and identification of antioxidant components from *Astragalus membranaceus* and *Paeonia lactiflora*. *PLoS One* **9**, e96780 (2014)
- N. Yoirish, *Curative properties of honey and bee venom* (University Press of the Pacific, Honolulu, 2001)
- V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144–158 (1965)
- D.P. Jain, S.S. Pancholi, R. Rakesh Patel, Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2**, 177–183 (2011)
- M. Oyaizu, Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307–315 (1986)
- T.T. Lim, J.J. Tee, Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. *Food Chem.* **103**, 1003–1008 (2007)
- R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999)
- T.C.P. Dinis, V.M.C. Madeira, M.L.M. Almeida, Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 161–169 (1994)

32. Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* **74**, 2157–2184 (2004)
33. A. Wilczyńska, Phenolic content and antioxidant activity of different types of polish honey—a short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **60**, 309–313 (2010)
34. M. Moniruzzaman, S.A. Sulaiman, S.A. Mohd Azlan, S. Hua Gan, Two-year variations of phenolics, flavonoids and antioxidant contents in Acacia honey. *Molecules* **18**, 14694–14710 (2013)
35. H.J.D. Dorman, M. Kosar, K. Kahlos, Y. Holm, R. Hiltunen, Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4563–4569 (2003)
36. M.-Y. Shon, T.-H. Kim, N.-J. Sung, Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus of Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chem.* **82**, 593–597 (2003)
37. R. LoScalzo, Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chem.* **107**, 40–43 (2008)
38. H. Palafox-Carlos, J. Gil-Chavez, R.R. Sotelo-Mundo, J. Namiesnik, S. Gorinstein, G.A. González-Aguilar, Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'ataulfo' mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules* **17**, 12657–12664 (2012)
39. N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radic. Res.* **26**, 195–199 (1997)
40. K. Thaipong, U. Boonprakob, K. Crosby, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 669–675 (2006)
41. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1–85 (1990)
42. A.R. Collins, Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols^{1–4}. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 261S–267S (2004)



Document heading

doi:10.12980/APJTB.4.2014C778

© 2014 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rights reserved.

Prevalence of rotavirus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria

Selles Sidi Mohammed Ammar^{1*}, Kouidri Mokhtaria², Belhamiti Belkacem Tahar¹, Ait Amrane Amar¹, Benia Ahmed Redha¹, Bellik Yuva¹, Hammoudi Si Mohamed¹, Niar Abdellatif², Boukrâa Laid¹

¹ Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn–Khalidoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria

² Institute of veterinary science, Ibn–Khalidoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Dr. Elisabetta Manuali, Laboratory of Histopathology and Chemical Chemistry, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria–Marche, via G. Salvemini 1, 06126 Perugia, Italy.
Tel: +39 075343227
Fax: +39 075343289
E-mail: e.manuali@izsum.it

Comments

The frequency of rota–coronavirus virus infection is quite variable among different geographical regions, the production type (dairy or beef herds), and the diagnostic techniques used. In this case report, authors make an attempt to deal with the prevalence of GARV and BCoV associated with neonatal diarrhea in calves in Western Algeria.

Details on Page S321

ABSTRACT

Objective: To study the prevalence of bovine group A rotavirus (GARV) and bovine coronavirus (BCoV) in diarrheic feces from calves and the sensitive's parameters such as age group and sex.

Methods: Feces samples from 82 diarrheic dairy calves from farms around Tiaret (Western Algeria) were collected. These samples were tested by ELISA assay.

Results: The results showed that the prevalence of rotavirus and coronavirus infection are 14.63% (12.2% alone and 2.43% associated with bovine coronavirus) and 20.73% (18.3% alone and 2.43% associated with GARV), respectively.

Conclusions: The present study demonstrates that the both BCoV and GARV are involved in the neonatal calves' diarrhea, where the frequency of BCoV is clearly higher than that of GARV.

KEYWORDS

Calves, Diarrhea, Coronavirus, Rotavirus, Prevalence, ELISA

1. Introduction

Neonatal calf diarrhea is one of the most devastating diseases of the dairy industry worldwide[1]. It is defined as pathology having a complex multifactorial etiology, influenced by infectious, nutritional and environmental factors as well as management practices. Its suggested causes include toxins, bacteria, protozoa, viruses and

management/environmental factors such as overfeeding, low temperature, poor hygiene, colostrum deprivation and individual animal susceptibility. Infectious agents, either singly or in combination, may be associated with field outbreaks with considerable economic burden[2].

The incidence risks of diarrhea in calves under 30 d old was reported by several studies and it varies between 15% and 20%[3]. According to the latter, the mortality risk is

*Corresponding author: Selles Sidi Mohammed Ammar, Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn–Khalidoun University of Tiaret, Tiaret 14000, Algeria.

Tel: +213–554–200–199

Fax: + 213 46 42 71 61

E-mail: nuidert@yahoo.fr;

Foundation Project: Supported in part by a grant from CNEPRU (102320100012).

Article history:

Received 13 Jan 2014

Received in revised form 2 Feb, 2nd revised form 12 Feb, 3rd revised form 17 Feb 2014

Accepted 12 Mar 2014

Available online 5 Apr 2014

1.5%–8%. In Algeria, the epidemiological studies conducted to date showed that the syndrome came after each period of calving and it causes major economic loss directly through the morbidity, mortality and therapy and indirectly by poor growth problems after clinical diseases[4].

Rotavirus, bovine coronavirus (BCoV), *Escherichia coli* F5 (*E. coli*), and *Cryptosporidium* species are internationally recognized as the most important enteropathogens in acute diarrhea in young calves[5]. In calves, bovine group A rotavirus (GARV) and BCoV are the most commonly associated viruses with neonatal diarrhea and it is not unusual that both viruses can concomitantly infect calves[6].

Difficulties in the clinical diagnosis of infectious enteritis arise from frequent nonspecific clinical signs and lesions, the presence of asymptomatic infections, the involvement of multiple agents, and the interactions of intrinsic and extrinsic factors that predispose the host to infection[7]. However, many laboratory diagnostic tests based on the different methods such as direct electron microscopic test, ELISA, latex agglutination, polyacrylamide gel electrophoresis, reverse transcription polymerase chain reaction as well as immuno–electron microscopy. Among these methods, ELISA using monoclonal antibody as a sensitive, fast, and inexpensive method is used for the simultaneous detection of BCoV and GARV in the feces of diarrheic calves[8].

The high frequency and persistence of calves' neonatal diarrhea in farming has gained the interest of many researchers. Thus; the purpose of the present study is to report and estimate the prevalence of GARV and BCoV using ELISA assay in diarrheic feces from calves and the sensitive's parameters like age–group and sex in Western Algeria (Tiaret).

2. Material and methods

2.1. Feces samples

Eighty two samples of diarrheic feces were collected from both sexes of Holstein calves, aged less than 30 d old, which had not received prior treatment with antibiotics during calving period. In fact, these calves were issued from cows which were not vaccinated against the causative agent of neonatal diarrhea. They showed an important dehydration and had poor appetite, liveliness and suckling reflex, and characterized by a pasty–watery faeces. The studied calves were grouped in cowsheds with a bad hygiene. The population was stratified into four age–groups: group 1: ≤ 7 d, group 2: ≥ 8 d ≤ 14 d, group 3: ≥ 15 d ≤ 21 d and group 4: ≥ 22 d ≤ 30 d.

Samples were collected in sterile flasks after cleaning of the anal area with a paper towel and beats by rectal stimulation with the index finger protected by disposable sterile plastic gloves. The collected samples were stored at -20 °C until analyzing.

2.2. ELISA test

A commercial indirect antigen–capture ELISA kit (rotavirus and coronavirus, Pourquier Institute, France) employing specific monoclonal antibodies was used to detect VP7 protein of GARV and S protein of BCoV in fecal samples. This assay is realized in the Veterinary Regional Laboratory of Tlemcen (Algeria). The ELISA procedure was performed according to the manufacturer instruction (Kit reference P 00603). After adding stop solution (0.5 mol/L of H_2SO_4), the optical density (OD) of each well was measured at 450 nm. Calculating the net OD of each sample and interpreting the results were performed as described by manufacturer instruction. Briefly, all samples were considered positive if the %E/P is upper or equal to 7%.

$\%E/P = 100 \times (\text{OD of sample to test} - \text{OD of negative control sample}) / (\text{Average OD of positive control sample} - \text{OD of negative control sample})$

The ELISA test is considered valid insofar as:

1. The positive control sample to a minimal average OD 450: 0.5 or OD 450=0.5.
2. OD 450 mean of the positive control sample/OD 450 of negative sample=5.

2.3. Statistical analysis

The contingency table was used at 5% significance to assess the differences among the proportions of fecal samples positive to GARV and BCoV variables such as age group and sex of the animals studied. The statistical analysis system program was used to perform the statistical calculations.

3. Results

3.1. Detection of enteropathogens

During this study, eighty two samples from diarrheic calves were studied. Briefly, 26 of the calves included in this study were 1–7 d old, and 13, 16 and 27 calves were 8–14, 15–21 and 22–30 d old, respectively.

BCoV was the dominant enteropathogen detected being present in 17 of 82 samples (20.73%). As mentioned in the Table 1, among the 17 positive samples, 15 calves (18.3%)

presented BCoV alone and 2 calves (2.43%) were associated with GARV. Likewise, GARV infections were detected in 12 calves (14.63%). GARV was the only agent detected in 10 calves (12.2%), the remainder of GARV (2.43%) infections is combined with BCoV (Table 1).

Table 1

Detection of BCoV and GARV in the studied diarrheic calves

Enteropathogen(s) detected	Calves (n=82)	
	Number	%
None	55	67.07
Coronavirus only	15	18.30
Rotavirus only	10	12.20
Coronavirus+rotavirus	2	2.43

3.2. Age distribution of infections

Table 2 summarizes the proportions of positive samples as for the two enteropathogens during the four weeks of life.

Table 2

Prevalence of BCoV and GARV at different age group.

Age group	Numbers of examined calves	Numbers of positive calves (%)	BCoV (%)	GARV (%)
1–7 d	26	9 (34.62%)	5 (19.23%)	5 (19.23%)
8–14 d	13	5 (38.46%)	2 (15.38%)	4 (30.77%)
15–21 d	16	1 (6.25%)	1 (6.25%)	0 %
22–30 d	27	12 (44.44%)	9 (33.33%)	3 (11.11%)
Total	82	27 (32.92%)	17 (20.73%)	12 (14.63%)

All the four investigated age-groups were positive to the enteropathogens. Nevertheless, the 22–30 d old calves showed higher frequency (44.44%) to enteropathogen infection compared to the other three age-groups. In fact this group is highly sensitive to the coronavirus infection (33.33%) while the fewer occurrences were recorded in the age-group 15–21 d old. In the case of GARV infection, the age-group 8–14 d old presented the highest frequency (30.77%).

3.3. Sex distribution of infections

Among the 82 collected faecal samples, 27 cases were found to have one of both viruses; 16 cases (59.26%) were male and 11 (40.74%) were female. A total of 17 cases were found to have BCoV using ELISA test; 13 were males and 4 females. On the contrary, 7 females and 5 males were affected by GARV.

4. Discussion

Diarrhea in the neonatal calf is a serious welfare problem and a cause of economic loss due to mortality, treatment costs and poor growth. Calf diarrhea is an example of a complex or multifactorial disease, resulting as it does from an interaction between the calf, its environment, nutrition and infectious agents^[9]. Enteric infections may be caused by

protozoa, bacteria and/or virus^[10].

In the present study, BCoV was the predominant enteropathogen associated with calves' diarrhea. The incidence of this agent is 20.73% (17/82) either alone or in combination with GARV. Our result is in agreement with those reported by Brandão *et al.*^[11], Stipp *et al.*^[10] in Brazil, AKam *et al.* in Algeria^[4] and Izzo *et al.*^[12] in Australia, in which the incidence of BCoV are 22.22%, 19%, 18.48% and 21.6% respectively, though much higher to those reported by Reynolds *et al.*^[13] in England (14%), Snodgrass *et al.*^[14] in Scotland (4%), Perez *et al.*^[15] in Costa (9%), De La Fuente *et al.*^[16] in Spain (7.34%), Rai *et al.*^[17] in India (11.76%) and Dash *et al.*^[18] in India (4.76%). However the result reached in our work remains lesser when comparing to that formerly cited by Abraham *et al.*^[19] in Ethiopia (38.9%).

On the other hand, GARV infections were detected at less prevalence rate (14.63%, *i.e.* 12/82). This finding corroborates with the result noticed by Abraham *et al.*^[19] (16.7%), Rai *et al.*^[17] (15.68%), and Al-Robaiee and Al-Farwachi^[20] (15.5%). Alfieri *et al.*^[2] stated that the rate of diarrheic fecal samples infected in beef and dairy calves were 33% and 20.2%, respectively. While Zrelli *et al.*^[21] recorded an average rate of 22.8%, Langoni *et al.*^[22] showed an average rate of 25.1% and AKam *et al.*^[4] cited a percentage of 21.84%. Interestingly, others reported an important rate of GARV infection such as Reynolds *et al.*^[13] (42%), Snodgrass *et al.*^[14] (50%), De La Fuente *et al.*^[16] (42.7%), Izzo *et al.*^[12] (79.9%) and Nourmohammadzadeh *et al.*^[23] (34%). Nevertheless, Perez *et al.*^[15] observed a prevalence of 7%. The differences in detection of enteropathogens may be attributed to the different diagnostic methods used^[24], farm management practices exercised in different regions, hygienic status^[8,24], environmental condition, and geographical locations (climate condition).

No enteropathogens were detected in the 55 (67.07%) sample calves. Negative results may occur because some cases of diarrhea might not be associated with infectious agents, and probably due to nutritional or other management factors, or because other non-investigated pathogens were involved, such as many other enteric bacterial (*E. coli* F5 and other enteropathogenic *E. coli*, and *Campylobacter etc.*), parasite (*Cryptosporidium parvum*) and virus (calicivirus, torovirus *etc.*).

Regarding age-group in this study, the frequency of infection is higher in age-group 22–30 d olds (44.44%). This age bracket is considered as the most susceptible to infection by BCoV (33.33%). While the frequency of infection by rotavirus is higher in age-group 8–14 d olds (30.77%), this age bracket is reported as the most susceptible to infection by rotavirus^[2,25]. The 2- and 4-week-old calves were the most susceptible to GARV and BCoV infections,

which may be due to decreasing of passive immunity and the absence of the natural resistance against infection for both enteropathogens. The presence of BCoV infection in older calves (22–30 d) could be explained by the method of livestock farming of calves (using the grouping of the calves instead of individual stall). The 3-weeks-old calves are characterized by absence of GARV, this may be highlighted by an increased natural resistance against infection for this enteropathogen and small number of sample cooperated with 1 and 4 age-group, in spite of the absence of significant difference among the various age-groups.

The frequency of infection of the male (59.26%) is superior to the female (40.74%) for both enteropathogens. We can assume that the size of the male at birth induces dystocia, and consequently decrease colostrum absorption. The similar result is gathered by Clement *et al*[26], who noticed that the sensibility of males for diarrhea was double compared to females. Whereas, in our study the percentage of the females affected by rotavirus is superior to males. The comparable result is recorded by Hosso and Pandey[27], who revealed that among 23 calves positive for rotavirus, nine were males and 14 females.

The result of this study showed that both BCoV as well as GARV were involved in the neonatal calves diarrhea, though, the frequency of BCoV is higher in comparison with GARV. However, further investigations dealing with fecal samples analysis to identify the presence of other enteropathogens such as *E. coli* and *Cryptosporidium* are needed. Furthermore, the multifactorial etiology (bacterial, viral and protozoa agents) influenced by nutritional and environmental factors, as well as difficulties in the clinical diagnosis of neonatal diarrhea and failure of the treatment in young calves affected by diarrhea require to adopt the prophylactic measures such as hygiene, management and vaccination of dam cows by an immunization through the injection of either modified-live or inactivated vaccines. This will result in enhancement of antibody titres in the colostrum and milk of vaccinated cows for prevention of neonatal diarrhea caused by coronavirus and rotavirus.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Laboratory of Research on Local Animal Products, Ibn-Khaldoun University of Tiaret, Algeria for the financial support.

This work was supported in part by a grant from CNEPRU (I02320100012). The authors are also grateful to Dr Chaaban Sari Nassim and the entire staff of the Veterinary Regional Laboratory of Tlemcen (Algeria) for their collaboration during this study. My thanks also go to Mr Taibi Khaled and for the statistical analyses.

Comments

Background

Diarrhea is one of the main causes of calf mortality, morbidity and economic losses worldwide in the cattle industry and it is a complex multifactorial disease involving animal, environmental, nutritional and infectious agents.

Research frontiers

The object of the work is to evaluate the impact of these viral infectious agents in breeding farms in Western Algeria according to the clinical state and age distribution in younger dairy calves.

Related reports

Several techniques have been developed by detecting the viral particle (cell culture, electron microscopy, immune electron microscopy), viral protein (ELISA, latex agglutination, direct immunofluorescence), and viral genome (SS-PAGE, RT-PCR).

Innovations and breakthroughs

In the scientific literature only few published information on the epidemiology of rota-coronavirus virus infection in neonatal calves in Algeria were available. In this paper the authors conducted a study to throw light on the prevalence of rotavirus and coronavirus associated with neonatal diarrhea in calves in Western Algeria by using an ELISA assay.

Applications

This report could provide useful information for epidemiological study of these viral infections in Western Algeria.

Peer review

The frequency of rota-coronavirus virus infection is quite variable among different geographical regions, the production type (dairy or beef herds), and the diagnostic techniques used. In this case report, authors make an attempt to deal with the prevalence of GARV and BCoV associated with neonatal diarrhea in calves in Western Algeria.

References

- [1] Tajik J, Nazifi S, Naghib SM, Ghasrodasht AR. Comparison of electrocardiographic parameters and serum electrolytes and microelements between single infection of rotavirus and coronavirus and concurrent infection of *Cryptosporidium parvum* with rotavirus and coronavirus in diarrheic dairy calves. *Comp Clin Pathol* 2012; **21**: 241–244.
- [2] Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Medici KC, Alfieri AF. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. *Trop Anim Health Prod* 2006; **38**: 521–526.
- [3] Lorino T, Daudin JJ, Robin S, Sanaa M. Factors associated with time to neonatal diarrhoea in French beef calves. *Prev Vet Med* 2005; **68**: 91–102.
- [4] Akam A, Khelef D, Kaidi R, Rahal KH, Tali–Maamar H, Yabrir B, et al. The frequency of the shedding of *Cryptosporidium parvum*, F5 *Escherichia coli*, rotavirus, coronavirus and *Salmonella* spp. in young dairy calves in Mitidja area (Algeria). *Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj Napoca* 2011; **68**: 16–25.
- [5] Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Hammes IS, Loken T, Akerstedt J, et al. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci* 2009; **92**: 5057–5066.
- [6] Barry AF, Alfieri AF, Stipp DT, Alfieri AA. Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group A bovine rotavirus. *Braz Arch Biol Technol* 2009; **52**: 45–49.
- [7] Athanassios R, Marsolais G, Assaf R, Dea S, Descoteaux JP, Dulude S, et al. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. *Can Vet J* 1994; **35**: 163–169.
- [8] Mayameei A, Mohammadi G, Yavari S, Afshari E, Omid A. Evaluation of relationship between *Rotavirus* and *Coronavirus* infections with calf diarrhea by capture ELISA. *Comp Clin Pathol* 2010; **19**: 553–557.
- [9] Scott PR, Hall GA, Jones PW, Morgan JH. Calf Diarrhoea. In: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RC, editors. *Bovine medicine diseases and husbandry of cattle*. Oxford: Wiley–Blackwell; 2004, p. 185–214.
- [10] Stipp DT, Barry AF, Alfieri AF, Takiuchi E, Amude AM, Alfieri AA. Frequency of BCoV detection by a semi–nested PCR assays in faeces of calves from Brazilian cattle herds. *Trop Anim Health Prod* 2009; **41**: 1563–1567.
- [11] Brandão PE, Villareal LY, De Souza SL, Richtzenhain LJ, Jerez JA. Mixed infections by bovine coronavirus, rotavirus and *Cryptosporidium parvum* in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. *Arq Inst Biol (Sao Paulo)* 2007; **74**: 33–34.
- [12] Izzo MM, Kirkland PD, Mohler VL, Perkins NR, Gunn AA, House JK. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J* 2011; **89**: 167–173.
- [13] Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JC, Debney TG, et al. Microbiology of calf diarrhoea in southern Britain. *Vet Rec* 1986; **119**: 34–39.
- [14] Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Syngae BA. Aetiology of diarrhea in young calves. *Vet Rec* 1986; **119**: 31–34.
- [15] Perez E, Kummeling A, Janssen MM, Jimenez C, Alvarado R, Caballero M, et al. Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilaran, Costa Rica. *Prev Vet Med* 1998; **33**: 195–205.
- [16] De La Fuente R, Garcia A, Ruiz–Santa–Quiteria JA, Luzon M, Cid D, Garcia S, et al. Proportionnal morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. *Prev Vet Med* 1998; **36**: 145–152.
- [17] Rai RB, Hansha A, Rai S, Singh B, Kumar H, Singh AK, et al. Prevalence of rota and coronavirus infections in calves of Barabanki and Raebareli districts of Uttar Pradesh. *Indian J Vet Pathol* 2011; **35**: 73–74.
- [18] Dash SK, Kumar K, Goel A, Bhatia AK. Detection of corona virus antigen by ELISA from diarrhoeic cow calves in Mathura, India. *Vet World* 2012; **5**: 166–168.
- [19] Abraham G, Roeder PL, Zewdu R. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. *Trop Anim Health Prod* 1992; **24**: 74–80.
- [20] Al–Robaiee IA, Al–Farwachi MI. Prevalence of rotaviral infection in diarrheic neonatal calves in Mosul city, Iraq. *Vet World* 2013; **6**: 538–540.
- [21] Zrelli M, Messadi L, Ben Miled L, Jemli MH, Haddad N. Infectious agents associated with neonatal calf diarrhea in Tunisia. *Rev Med Vet* 1990; **141**: 861–872. French.
- [22] Langoni H, Linhares AC, De Avila FA, Da Silva AV, Elias AO. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2004; doi: 10.1590/S1413–95962004000500004.
- [23] Nourmohammadzadeh F, Davoudi Y, Abdollahpour G, Nouri A. The prevalence of rotavirus in neonatal calf diarrhoea, using electron microscopic examination. *Comp Clin Pathol* 2012; **21**: 1231–1234.
- [24] Ok M, Gu L, Turgut K, Ok U, Sen I, Gündüz IK, et al. The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *Zoonoses Public Health* 2009; **56**: 94–101.
- [25] Fassi–Fehri MM, Johnson DW, Taoudi A, Berrada J. [Epidemiology of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* and rotavirus in calves and lamb in Morocco]. *Vet Rech Ann* 1988; **19**: 59–64. French.
- [26] Clement JC, King ME, Salman MD, Wittum TE, Casper HH, Odde KG. Use of epidemiologic principles to identify risk factors associated with the development of diarrhea in calves in five beef herd. *J Am Vet Med Assoc* 1995; **207**: 1334–1338.
- [27] Hasso SA, Pandey R. Possible sex differences in the susceptibility of calves to rotavirus infection. *Can J Vet Res* 1986; **50**: 287–288.

Ministry of Agriculture, Water Resources
and Fishing
Institut des Régions Arides (IRA)
Medenine - Tunisia

**Fifth International Symposium on
Medicinal
and Aromatic Plants**
Zarzis (Tunisia), December 16-18, 2016

**This is to certify that
Sidi Mohammed Ammar SELLES**

Presented a poster entitled :

"Etude de l'activité biologique de l'huile essentielle de *Mentha
spicata* cultivée dans la région de Tiaret (Algérie)"

**At the 5th International Symposium on
Medicinal and Aromatic Plants (SIPAM 2016)
held from 16-18 December, 2016 in Zarzis- Tunisia**

President of the Organizing
Committee

Signé: Mohamed NEFFATI

Director General of IRA

