

RÉSUMÉ

Malgré tous les efforts déployés jusqu'à présent en matière de lutte et de prévention des infections bactériennes au niveau de l'aquaculture particulièrement en salmoniculture, leur impact demeure préoccupant surtout aux premiers stades d'élevage. Ceci semble être intensément en rapport avec la complexité du problème et la richesse et diversité de la flore bactérienne en milieu aquatique.

C'est ainsi que plus d'attention a été donnée aux sources naturelles de molécules actives, et à leur potentiel en comparaison avec la chimiothérapie antimicrobienne conventionnelle.

Dans ce contexte, nous avons évalué le pouvoir antibactérien des composés de différente nature chimique issues des huiles essentielles de certaines plantes endémiques du Maroc, sur des bactéries du genre *Flavobacterium* responsables des infections bactériennes engendrant des dégâts et pertes économiques importantes dans les stations de pisciculture à l'échelle internationale. Le choix a porté sur des espèces de plantes aromatiques et médicinales appartenant aux familles des lamiacées, pinacées, astéracées, myrtacées et géraniacées.

Pour ce faire, nous avons procédé dans un premier lieu à évaluer la contamination des œufs fécondés importés, des alevins de truite, des truitelles ainsi que les biofilms et les eaux des bassins par les bactéries du genre *Flavobacterium* au niveau de la station piscicole Ain Aghbal à Azrou. Nous avons pu isoler des souches bactériennes appartenant à ce genre après identifications macro et microscopique et des caractérisations biochimiques et enzymatiques, en comparaison avec des souches de référence de *Flavobacterium psychrophilum* importées de la France et de la Suisse.

L'étape suivante est de choisir des plantes aromatiques et médicinales Marocaines douées d'un potentiel antibactérien approuvé et d'extraire des huiles essentielles de bonne qualité qui répondent à des critères bien précis en termes de leur composition chimique.

La caractérisation phytochimique des huiles essentielles étudiées a révélé une composition chimique diversifiée caractérisée par l'abondance de molécules à haute valeur ajoutée telles que le thymol, le carvacrol, l'eugénol et le linalol selon les familles. L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré que ces huiles essentielles présentent une activité variant entre modérée et assez forte. Les huiles essentielles des espèces de thym et origan se sont montrées les plus actives, notamment celles de *Thymus maroccanus* et *Origanum compactum*.

Le screening primaire de l'activité antibactérienne des Huiles essentielles vis-à-vis des souches de *Flavobacterium spp.* a été réalisé en utilisant 15 huiles essentielles contre l'ensemble des isolats et les souches de référence. Les résultats des aromagrammes montrent que 7 huiles essentielles sont douées d'une activité anti-flavobactérienne importante.

L'utilisation des techniques de macro et micro-dilution nous a permis de déterminer les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles. Les résultats ont montré que seulement les huiles essentielles de *T. maroccanus* et *O. compactum* ont une activité bactéricide, quant au reste des huiles essentielles leurs pouvoirs sont bactériostatiques.

Les principes actifs (thymol et carvacrol) de ces deux huiles essentielles *in-vivo* ont été utilisés comme traitement curatif et préventif contre les infections hivernales dues au *Flavobacterium spp.* chez les alevins à la station de pisciculture Ain Aghbal. Les résultats indiquent qu'en plus de leurs effets antibactériens, le thymol a un effet positif sur les paramètres zootechniques de l'élevage des truites (croissance et gain de la masse corporelle).



UNIVERSITE SULTAN MOULAY SLIMANE
Faculté des Sciences et Techniques
Béni-Mellal



Centre d'Études Doctorales : Sciences et Techniques

Formation Doctorale : Ressources Naturelles, Environnement ET Santé

THÈSE

Présentée par

KRITIHI ASSIA

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : **Biologie**

Option : **Biochimie, Microbiologie, Environnement et Aquaculture**

**UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES POUR LA LUTTE
CONTRE LES BIO-AGRESSEURS DU GENRE *FLAVOBACTERIUM*
CHEZ LES ALEVINS DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL CIEL
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*) DANS LA STATION DE PISCICULTURE
AIN AGHBAL (AZROU, MAROC)**

Soutenue le Samedi 04/01/2020 à 15h devant la commission d'examen :

Nadia BERDAY	Professeur, IAV Hassan II, Rabat, Maroc	Président
Hicham CHAIR	Professeur, Université Abdel Malek Saadi F.P. Larache, Maroc	Rapporteur
Khalid HABBARI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Rapporteur
Abdel-Ilah FAHDE	Professeur, Université Hassan II, F.S. Ain Chock, Casablanca, Maroc	Rapporteur
Mustapha HASNAOUI	Professeur, Université Sultan Moulay Slimane, F.S.T. Béni-Mellal, Maroc	Encadrant
Abdel-Aziz MAYCHAL	Responsable de la station piscicole Ain Aghbal, Azrou, Maroc	Invité
Ayoub ESSADEK	Responsable du développement de l'aquaculture, les DOMAINES AGRICOLES, Maroc	Invité

N° d'ordre : 249/2019

Utilisation Des Huiles Essentielles Pour La Lutte Contre Les Bio-Agresseurs Du Genre *Flavobacterium* Chez Les Alevins De La Truite Arc-En-Ciel CIEL (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) Dans La Station De Pisciculture Ain Aghbal (Azrou, Maroc)

KRITIHI ASSIA

« Vous ne pouvez pas arrêter les vagues, mais vous pouvez apprendre à surfer. »

Joseph GOLDSTEIN

*A la mémoire de ma grand-mère, Nejma ELHILALI,
J'espère réussir vous rendre fière de ta petite fille.
Qu'ALLAH vous accorde miséricorde
et vous récompense avec le paradis.*

Dédicace

Avant tout, je dédie ce travail à mes parents qui m'ont toujours incité et aidé à faire ce qui me plaisait dans la vie. Vos sacrifices et votre présence à tout moment m'ont permis d'être là où j'en suis. Vous êtes, pour moi, un exemple à beaucoup de points de vue. La pudeur empêche parfois d'exprimer facilement ses sentiments, que cette thèse soit enfin un témoignage de ma gratitude et de mon amour.

A ma mère,

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.

A mon père,

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils. J'espère que cette thèse sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.

*Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous **MES CHERS PARENTS** que je le dois, que Dieu vous garde.*

Je ne peux en finir que par dédier cette thèse de doctorat à ma famille qui ont toujours cru en moi, vous étiez tous les jours présent pour m'encourager, me soutenir et me pousser vers l'avant. Merci pour votre aide. Je vous aime.

AVANT PROPOS

Doctorante : Mlle Assia KRITIHI

- Intitulé du travail :

Utilisation des huiles essentielles pour la lutte contre les bio-agresseurs du genre *Flavobacterium* chez les alevins de la truite arc-en-ciel dans la station de pisciculture Ain Aghbal (Azrou, Maroc).

Directeur de la thèse :

Pr. Mustapha HASNAOUI, Directeur de l'Equipe Génie de l'Environnement, Département de Sciences de la Vie : Faculté des Sciences et Techniques Beni Mellal, Université Sultan Moulay Slimane- Maroc.

- Co-directeurs de thèse :

Mr Aziz MAYCHAL, Chef de la station de pisciculture Ain Aghbal, Azrou, Maroc.
Mr Younes OUMESSOUD, Responsable qualité, domaines agricoles.

- Lieux de réalisation des travaux :

- Laboratoire : Equipe Génie de l'Environnement, Département des Sciences de la Vie, Faculté des Sciences et Techniques, Beni Mellal, Maroc.
- Station de pisciculture Ain Aghbal-Azrou-Maroc.

- Cadres de coopération (ou de soutien) :

Contrat de recherche entre la Faculté des Sciences et Techniques et les «DOMAINES AGRICOLES»

Date de commencement de ce travail : Janvier 2015

 **Publications scientifiques**

1. A. KRITIHI, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. BARAKATE, M. HASNAOUI Characterization of a pathogenic bacteria isolated from rainbow trout fries in a hatchery in Azrou city (morocco): phenotypic and biochemical studies. J. Wat. Env. Sci. Vol. 1. 2017. 140-142.

2. A. KRITIHI, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. BARAKATE, M. HASNAOUI Biochemical and enzymatic characterization of a Gram-negative fish pathogen isolated in Morocco from Rainbow trout. J. Aquac. Res. Development, Vol. 8, Issue 2 (Suppl). 2017. p 66. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.C1.015>

3. A. KRITIHI, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. BARAKATE, M. HASNAOUI Isolation of a Gram Negative Fish Pathogen from Moroccan Rainbow Trout Hatchery in Winter and its Classical Characterization, International Journal of Advanced Engineering, Management and Science (IJAEMS) [Vol-5, Issue-1, Jan-2019] <https://dx.doi.org/10.22161/ijaems.5.1.8> ISSN: 2454-1311

4. A. KRITIHI, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. BARAKATE, M. HASNAOUI Evaluation of *flavobacterium psychrophilum* ability of biofilm formation in

aquaculture -morocco International Symposium for Environmental Science and Engineering Research (ISESER) Konya, Turkey, May 11 -12, 2018 Abstract Book of ISESER 2018

5. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. BARAKATE, M. HASNAOUI Biocontrol against *Flavobacterium psychrophilum* bacteria in salmonid hatcheries (Ain Aghbal farm, Azrou-Morocco). J. Mar. Biol. Oceanogr. 2018, Volume: 7. <https://doi.org/10.4172/2324-8661-C1-011>.

6. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. BARAKATE, M. HASNAOUI Bacterial inspection of flavobacterium genus in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) with skin lesions in Morocco Advanced Intelligent Systems for Sustainable Development, ID 26. Advanced intelligent systems for sustainable development applied to environment, 96. 978-9854 [96]-28-3@2018-Springer

7. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL & M. HASNAOUI 2019. Biochemical and enzymatic characterization of a Gram-negative fish pathogen isolated in Morocco from Rainbow trout. 5th global Summit on Aquaculture and fisheries "Aqua Europe 2017". 30 - 31 Mars 2017, Madrid, Espagne.

8. K.OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI. Comparison of three different biochemical composition foods in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effect in the physical and chemical quality of water of the magnification station. 5th global Summit on Aquaculture and fisheries "Aqua Europe 2017". 30 - 31 Mars 2017, Madrid, Espagne.

9. K. OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2019. Evaluation of the three diets of different biochemical compositions on the zootechnical performances of the rainbow trout (*Onchorynchys Mykiss walbaum*, 1792) and their impact on the water of the Oum Er-Rbia River (Morocco). International Journal of Advanced Engineering, Management and Science (IJAEMS), volume 5. <https://dx.doi.org/10.22161/ijaems.5.4.7>.

10. K. OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2019. Assessment of the effects rejections of feed fish on water resources (Oued oum errbia, Morocco). E3S Web of Conferences, Volume37. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183701003>.

11. K. OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2018. Elaboration of two ecological foods of rainbow trout (*onchorynchys mykiss walbaum*, 1792) by extrusion system. Advanced Intelligent Systems for Sustainable Development, ID 25. Advanced intelligent systems for sustainable development applied to environment, 96. 978-9854 [96]-28-3@2018-Springer.

12. K. OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2018. Extrusion technology of extruded feed of rainbow trout (*Onchorynchys mykiss walbaum*, 1792). International Symposium for Environmental Science and Engineering Research (ISESER). Abstract Book of ISESER 2018. Konya, Turkey, May 11- 12, 2018.

13. K. OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2018. Elaboration of an efficient and ecological Moroccan food formulation of rainbow trout. J. Mar. Biol. Oceanogr. 2018, Volume: 7. <https://doi.org/10.4172/2324-8661-C1-011>.

14. K. OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Comparison of Three Different Biochemical Compositions of Foods in the Rainbow Trout (*Onchorynchys mykiss*) and Their Effect on Oum Er-Rbia River Water Quality (Morocco). Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration EMCEI 2017. Recent Advances in Environmental Science from the Euro-Mediterranean and Surrounding Regions, 767-769. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70548-4_225.

15. K. OUAISSA, **A. KRITIHI**, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Effets d'un aliment extrudé sur les performances de croissance de la truite arc-en-ciel et sur la qualité de l'eau de l'Oued Oum Er-Rbia (Station Ain Aghbal, Azrou-Maroc). J. Wat. Env. Sci. Vol. 1, (2017), 132-139.

 Communications nationales et internationales

1. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2019. Enriching Fish Feed in Aquaculture with Essential Oils - An Interesting Perspective on Improving the Growth and the Immune System. International Conference On Environmental Protection And Climate Change- Barcelona, Spain. November 04-05, 2019.

2. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2019. Antibiotics use in aquaculture and their impact in environment and public health. The 6th International Symposium Environment & Sustainable Development 6th ISESD 2019. 2-3 Octobre. Faculté des sciences Rabat. Maroc.

3. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2019. Valorisation des milieux aquatiques par la pisciculture cas de la station de la pisciculture Ain Aghbal Azrou – Maroc. 1ère Journée Scientifique : Environnement et Climat 14 Juin 2019. EST Béni Mellal. Maroc.

4. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. BARAKATE, M. HASNAOUI 2019. Inspection of flavobacterium spp. Presence in fertilized rainbow trout eggs and its relationship with the international trade in Morocco. Congrès International: Zones Humides- Bassins Versants- Développement local (ZH-BV-DL, 2019). 25-26-27 Avril 2019. Faculté poly-disciplinaire Nador- Maroc.

5. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2018. Bacterial inspection of flavobacterium genus in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) with skin lesions in Morocco. International conference Advanced Technologies and Intelligent Systems for Sustainable Development AI2SD'2018. 11-14 juillet 2018. Tanger - Maroc.

6. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2018. Biocontrol against *Flavobacterium psychrophilum* bacteria in salmonid hatcheries (Ain AGHBAL farm, Azrou-Morocco). International Conference on Aquaculture & Marine Biology in Rome, 25-27 juin 2018. Rome -Italie.

7. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Développement durable de l'aquaculture dans le cadre d'un bien-être animal et environnemental. La 6^{ème} édition de Congrès International : Eaux, Déchets,

Environnement (EDE6). 12-14 Décembre 2017. Faculté des sciences et techniques Béni Mellal. Maroc.

8. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y.OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Biochemical and Enzymatic Characterization of a Gram-negative Fish Pathogen Isolated in Morocco from Rainbow Trout and Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration EMCEI 2017. 1stEuro-Mediterranean Conference for Environmental Integration. 22-25 Novembre 2017, Sousse. Tunisie.

9. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y.OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Characterization of a pathogenic bacteria isolated from rainbow trout fries in a hatchery in Azrou-Morocco: phenotypic & biochemical studies. Side event tenue en Zone Verte de la COP22 le 8 Novembre 2016. Marrakech-Maroc.

10. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Sustainable development of intensively-aquaculture in the context of animal and environmental well-being. 2nd Congrès International de AMSAR: «Ambition of sustainability in the context of territorial complexity and the society of risks». 11 - 12 Octobre 2017. INAU, Rabat. Maroc.

11. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y.OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2016. Biochemical and enzymatic characterization of a Gram-negative fish pathogen isolated in Morocco from Rainbow trout and comparison with isolated of other countries and sources. Colloque international : Les changements climatiques : Quelles stratégies pour un développement durable? 2-3 Novembre 2016. FS. Dhar El Mahraz- Fès. Maroc.

12. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2016. Flavobacterium psychrophilum screening with actinobacteria Producer of bioactive substances. 3rd International Conference « Microbial Biotechnology for Development » MICROBIOD 3, 24-26 Octobre 2016. Faculté des Sciences et Techniques Mohammedia, Maroc.

13. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, Y. OUMESSOUD, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2016. In-vitro antibacterial activity of some plant essential oils against the Flavobacteriosis agent. 1er Congrès International sur les algues, (Cialgues 2016), 31 Mars 2016- Faculté des sciences et techniques Guéliz, Marrakech. Maroc.

14. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, A. JERRADI, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2015. Criblage des actinobactéries productrices de substances bioactives contre Flavobacterium psychrophilum; agent causal de la maladie d'eau froide chez les salmonideae (cas de la truite arc en ciel). Congrès International « Biotechnologie au Service de la Société » (BioSeS2015). 22-24 Octobre Fès. Maroc.

15. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, A. JERRADI, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2015. Inhibition of flavobacterium psychrophilum biofilm formation in an aquaculture using actinomycetes (Ain Aghbal farm, Azrou, Morocco). Bioadhésion, Biocontamination des surfaces (BIOADH 2015). 5-7 Mai 2015- Faculté des sciences et techniques Béni Mellal. Maroc.

16. **A. KRITIHI**, K. OUAISSA, A. JERRADI, M. BARAKATE, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2015. Contribution à la réduction du taux de mortalité chez la truite arc en ciel en

élevage (station de pisciculture Ain Aghbal-Azou-Maroc). 2^{ème} édition des journées doctoriales (JDoc'15).26-28 Mars 2015. Faculté des sciences et techniques Béni Mellal. Maroc.

17. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2018. Elaboration of two ecological foods of rainbow trout (*onchorynchys mykiss walbaum*, 1792) by extrusion system. International conference Advanced Technologies and Intelligent Systems for Sustainable Development AI2SD'2018. 11-14 juillet 2018. Tanger - Maroc.

18. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2018. Elaboration of an efficient and ecological Moroccan feed formulation of rainbow trout. International Conference on Aquaculture & Marine Biology in Rome, 25-27 juin 2018. Rome -Italie.

19. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Effect of three extruded food on zootechnical performances of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) and their impact on the river oum er rbia. 6^{ème} Édition du Congrès International "Eaux, Déchets et Environnement EDE6". 12, 13 et 14 Décembre2017 à la FST de Béni Mellal-Maroc.

20. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Comparison of Three Different Biochemical Compositions of Foods in the Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*) and Their Effect on Oum Er-Rbia River Water Quality (Morocco).Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration EMCEI 2017. 1st Euro Mediterranean Conference for Environmental Integration. 22-25 Novembre 2017, Sousse. Tunisie.

21. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2017. Comparaison of three foods with different biochemical compositions in Rainbow trout (*Onchorynchus Mykiss*) based on zootechnicals performances and releases piscicoles (Fish farming of Oum Er-Rbia. Morocco). 2nd AMSR International congress. Ambition of sustainability in the context of territorial complexity and the society of risks. 11-12 Octobre2017. Rabat -Maroc.

22. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2016. Effets de trois types d'aliments de différentes compositions biochimiques sur les performances de croissance de la truite arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*). Quels impacts sur l'environnement? 5^{ème} colloque international "environnement et développement durable" 10-15 octobre 2016. FS Rabat-Maroc.

23. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2016. Effect of three types of food on the growth performance of Rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and their effects on the environment (Fish farm. Ain Aghbal-Azrou).Climate change adaptation through valorisation of water resources in arid and semi – arid areas. Side event en zone verte de la COP22. 8 Novembre 2016, Marrekch-Maroc.

24. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2016. Effect of three different biochemical compositions of foods in the Rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) on the growth performance and fish releases. Les changements climatiques : Quelles stratégies pour un développement durable? 2-3 Novembre 2016 Fac. Sci. Fés- Maroc.

25. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2016. Études des performances de croissance de la truite arc-en-ciel nourrie par trois types d'aliment de différente composition. 1ère Edition des journées scientifiques des doctorants de la FSTG, 22 Avril 2016. Marrakech -Maroc.
26. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2015. Rejets de la station de grossissement de la truite arc-en-ciel (station Oum Er Rbia, Maroc) : Caractérisation et modélisation. 2ème journée doctorale de la FST Béni Mellal, 26 - 28 Mars 2015. Béni Mellal-Maroc.
27. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2015. Comparaison de trois types d'aliments sur les performances de croissance, la qualité du produit fini de la truite arc-en-ciel et leur effet sur la rivière Oum Er-Rbia (Station de grossissement d'Oum Er-Rbia). 24-26 Novembre 2015, Settat- Maroc.
28. K. OUAISSA, A. **KRITIHI**, Y.OUMESSOUD, A. MAYCHAL, M. HASNAOUI 2015. Effet de trois aliments sur les performances, qualité du produit fini de la truite arc-en-ciel et leurs impacts sur l'environnement (Station de grossissement d'Oum Er rbia). 1er Congrès International poly-disciplinaire «Les enjeux stratégiques du développement durable intégré en Afrique». 5-6 Juin 2015, Béni Mellal. Maroc.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit marque la fin de mes six années de thèse, ces années ont constitué pour moi une étape clé de ma vie, avec son lot de moments exaltants et de grandes remises en questions. Cette aventure s'est construite avec la participation de nombreuses personnes qui m'ont encouragé, soutenu et conforté au long de toutes ces années. Les lignes qui suivent ne seront pas suffisantes pour l'expression de ma profonde reconnaissance à l'égard de toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce travail. Qu'elles trouvent l'expression de mes plus sincères remerciements.

Mes remerciements vont au **Pr. Said MELIANI**, Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal, ainsi qu'au **Pr. Ahmed ZEGHAL**, ex-Doyen de la même Faculté. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute considération.

Ma grande reconnaissance va au **Pr. HAFID** Vice doyen de la recherche scientifique à la Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal et au **Pr. Khalid HABBARI**, ex-vice Doyen et membre de l'équipe Génie de l'Environnement. Qu'ils trouvent ici mes marques de reconnaissance.

Mes plus profonds et sincères remerciements vont en premier lieu et tout particulièrement au Professeur **Mustapha HASNAOUI**, mon spirituel père, directeur de cette thèse et directeur de l'équipe de recherche «Génie de l'Environnement».

Je tiens à vous exprimer ma gratitude de m'avoir accueilli parmi votre équipe. J'ai eu le privilège de bénéficier de votre savoir et de votre grande expérience qui vous n'aviez d'ailleurs jamais hésité à partager et qui, alliés à vos qualités humaines resteront pour moi un modèle. Je vous remercie également pour tous les efforts que vous aviez prodigués pour la réalisation de cette thèse, pour l'intérêt que vous aviez toujours porté à ce travail et pour votre suivi perpétuel au fil des années passées. Votre confiance, votre dévouement et votre persévérance. Et aussi d'avoir cru en moi jusqu'au bout et tout fait pour que cette thèse soit une réussite. Vous étiez et vous resterez pour moi l'encadrant exemplaire et le père qui a su m'écouter et me guider dans les moments les plus difficiles.

Mes remerciements vont au nom du **Mr. BOUAMER** le DG des Domaines Agricoles qui m'a donné l'opportunité de réaliser cette thèse de Doctorat au sein de la Station de Pisciculture d'Ain Aghbal à Azrou.

Je tiens à remercier **Mr. Abdelaziz MAYCHAL**, responsable de la Station de Pisciculture d'Ain Aghbal, pour m'avoir offert l'opportunité de profiter de sa grande expérience dans le domaine de la pisciculture et d'avoir orienté et dirigé ce travail de thèse.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma reconnaissance **aux membres du jury**, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse ; leurs remarques et suggestions ont permis d'améliorer la qualité de ce rapport.

En premier, mes vifs remerciements sont adressés à Madame le **Pr. Nadia BERDAY** de m'avoir accordé un grand honneur en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Pr. HABBARI Khalid, je vous remercie Professeur, d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici, Professeur, l'expression de mes sincères remerciements.

Pr. CHAIR Hicham, veuillez accepter ma profonde reconnaissance et ma haute considération et je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Pr. FAHDE Abdel Ilah, Je suis particulièrement touché par la gentillesse avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail et siéger au jury. Permettez-moi, de vous exprimer mon profond respect et ma sincère gratitude.

Je souhaiterais adresser ma gratitude aux membres du Domaine Arôme et Spécialité- Tiddas, qui m'ont permis de faire l'extraction des huiles essentielles des plantes. Je cite spécialement **Mr Mohamed SAFI** et **Mr Younes OUMESSAOUD**.

Je tiens à remercier infiniment l'ensemble des techniciens et ouvriers du Domaines Aromes et Spécialité qui m'ont beaucoup aidé dans la collecte des espèces végétales utilisées dans cette thèse et qui m'ont aidé dans la détermination de la composition chimique des huiles essentielles des plantes étudiées par CPG-MS, Je cite spécialement **Mr Hicham LAHOUAL** responsable du laboratoire.

Je ne saurais oublier de remercier tous les membres des Stations de Pisciculture d'Ain Aghbal et d'Oum Er-Rbia, pour leur soutien et leur aide durant toute la période de stage.

Mes remerciements vont au **Pr. Mustapha BARAKATE** pour son assistance scientifique, ses conseils et ses remarques pertinentes.

Ma profonde gratitude va au **Pr. Nour-Eddine MEZRIOUI**, directeur du Laboratoire de Biologie et Biotechnologie des Microorganismes (LBBM), Faculté des Sciences Semlalia-Marrakech. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Je tiens à remercier les **Pr. Zehor AIT YASSINE et Sanae BATOUI** membres de l'Équipe Génie de l'Environnement.

Mes remerciements vont également aux Docteurs et doctorants membres de l'Équipe Génie de l'Environnement, en particulier **Mme Sanae FARID, Mr Anouar OUIZGANE, Mlle khadija OUAISSA, Mme Fatima-zahra MAJDOUBI, Mlle Sara EL GHIZI et Mlle Meryem BOUSSEBA.**

Je tiens à adresser mes vifs remerciements aux membres du laboratoire LBBM, **Pr. RAFOUK, Pr. IMZILIN, Pr. OUHEDDOUCH, Pr. OUFDOU et Pr. LOUDI KI** pour leur disponibilité, leur aide et leur encouragement. Un grand merci au personnel du Laboratoire **Mme N. FAKIHANI, Mme M. REGRAGUI, Mr. A. BAHSSAINE.** Je vous remercie de m'avoir chaleureusement accueilli et m'offrir d'excellentes conditions de travail. Grâce à vous, j'ai passé des moments agréables. Je vous remercie également pour votre aide, votre sympathie et vos conseils.

Je remercie chaleureusement les étudiants de l'équipe LBBM pour leur soutien logistique et moral ainsi que pour la très bonne ambiance que j'ai toujours trouvée au laboratoire. Je remercie plus particulièrement **Dr. Noura BECHTAOUI et Dr. Abdelkhalek EL ALAOUI** pour leur aide et pour nos nombreuses discussions scientifiques intéressantes, échanger des éclats de rire et partager des instants inoubliables. Je voudrais aussi remercier **Brahim OUBAHA, Ahmed NAFIS, Loubna BENIDIRE, Najoua ELHIDAR, EL KHALLOUFI Fatima, RAKLAMI Anas, TAHIRI Abdel-ilah, KATIF Chaima, AZMANI Asmaa, SAMRI Salah-eddine, KORICHI Wassila et IBRAHIMI Manar.**

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral : mes ami(e)s **Dr. Fatima AIT-NOUH, Aida BEDRI, Dr. Abdelkhalk ABOULOARD.** Je vous souhaite à tous un bon courage dans vos projets d'avenir et que cette amitié ne s'arrêtera jamais.

Que tous ceux que je n'ai pas cités et qui ont participé de près ou loin à la réalisation de ce travail, soient assurés de toute ma reconnaissance et mes vifs remerciements.

ملخص

على الرغم من الجهود التي تبذل في مكافحة والوقاية من الالتهابات البكتيرية عند الأحياء المائية، وخاصة عند سمك السلمون، لا يزال تأثير هذه الالتهابات مقلقا، خاصة في المراحل المبكرة من نمو هذه الأسماك. يبدو أن هذا يرتبط ارتباطاً وثيقاً ببراء وتنوع البكتيريا في المياه. الأمر الذي يستدعي إيلاء المزيد من الاهتمام بمصادر طبيعية للجزيئات النشطة تجاه هذه البكتيريا والاستغناء عن المعالجة الكيميائية التقليدية باستعمال المضادات الحيوية.

في هذا السياق، قمنا بتقييم قدرة مركبات طبيعية مختلفة تم استخراجها من الزيوت الأساسية لبعض النباتات العطرية والطبية المتوطنة في المغرب ضد بكتيريا *Flavobacterium* المسؤولة عن الالتهابات البكتيرية في محطات تربية الأسماك على الصعيد الوطني والدولي على حد سواء. تسبب هذه البكتيريا أضرارا اقتصادية وخسائر كبيرة في الإنتاج خاصة في المراحل المبكرة لنموها. خلال دراستنا نركز الاختيار بالأساس على أنواع من النباتات العطرية والطبية التي تنتمي إلى عائلات *lamiacées, pinacées, astéracées, myrtacées et géraniacées*.

في هذا الصدد شرعنا أولاً في تقييم التلوث ببكتيريا *Flavobacterium* في البيض المخضب المستورد وبلاعيط التروثة القزحية، وكذا في الأغشية الحيوية ومياه الأحواض في مزرعة الأسماك عين اغبال (أزرو). وقد تمكنا من عزل سلالات بكتيرية تنتمي إلى هذا الجنس بعد تحديد الهوية الظاهرية والمجهريّة وكذلك بعد دراسة خصائصها الكيميائية والانزيمية، مقارنة مع سلالات مرجعية من نوع *Flavobacterium psychrophilum* مستوردة من فرنسا وسويسرا.

كانت الخطوة التالية هي اختيار النباتات العطرية والطبية المغربية ذات قدرات مضادة للبكتيريا المرصدة واستخراج الزيوت الأساسية التي تظهر معايير محددة من حيث التركيب الكيميائي. وقد كشف التوصيف الكيميائي لهذه الزيوت الأساسية عن مركبات كيميائية متنوعة تتميز بوفرتها وذات قيمة مضافة عالية مثل الثيمول (Thymol)، الكارفاكرول (Carvacrol)، الأوجينول (Euganol) واللينولول (Lynalol). وأظهر تقييم النشاط المضاد للبكتيريا أن هذه الزيوت العطرية تمتلك نشاطا فعالا يتراوح بين المعتدل والقوي جداً. وكانت الزيوت الأكثر نشاطاً هي زيوت الزعيرة (*Thymus maroccanus*) والزعتر (*Origanum compactum*). من ناحية أخرى، أجرينا الفحص الأولي للنشاط المضاد لبكتيريا *Flavobacterium spp.* باستعمال 15 مستخلص من الزيوت الأساسية ضد جميع السلالات المرجعية. وتظهر نتائج الاختبارات أن 7 زيوت عطرية تتمتع بنشاط مضاد مهم للبكتيريا. وقد قمنا أيضاً باعتماد تقنيات التخفيف الكلي والجزئي بغرض تحديد الحد الأدنى من التركيز الكابح (CMI) وكذا الحد الأدنى لقدرة الإبادة (CMB) للزيوت الأساسية المدروسة. وأظهرت النتائج أن الزيوت الأساسية لـ *T. maroccanus* و *O. compactum* تمتاز بنشاط مبيد للبكتيريا، على خلاف الزيوت الأساسية الأخرى التي كانت قدراتها لحظية.

بالإضافة إلى ذلك قمنا باستخدام الثيمول و الكارفاكرول المستخلصان من الزيوت الأساسية مباشرة على الأسماك الحية كعلاج وإجراء وقائي ضد الالتهابات الشتوية التي تسببها بكتيريا *Flavobacterium spp.* في مزرعة الأسماك عين اغبال (أزرو). وتشير النتائج إلى أنه بالإضافة إلى مفعولهما المضاد للبكتيريا، فإن الثيمول يتميز بتأثير إيجابي على المؤشرات الحيوانية لأسماك التروثة القزحية (النمو واكتساب الوزن).

الكلمات المفتاحية: الاستزراع المائي، أسماك التروثة القزحية، *Flavobacterium spp.*، الزيوت الأساسية، النشاط المضاد للبكتيريا، CMI، CMB، مؤشرات تربية الحيوانات.

RESUME

Malgré tous les efforts déployés jusqu'à présent en matière de lutte et de prévention des infections bactériennes au niveau de l'aquaculture particulièrement en salmoniculture, leur impact demeure préoccupant surtout aux premiers stades d'élevage. Ceci semble être intensément en rapport avec la complexité du problème et la richesse et diversité de la flore bactérienne en milieu aquatique.

C'est ainsi que plus d'attention a été donnée aux sources naturelles de molécules actives, et à leur potentiel en comparaison avec la chimiothérapie antimicrobienne conventionnelle.

Dans ce contexte, nous avons évalué le pouvoir antibactérien des composés de différente nature chimique issues des huiles essentielles de certaines plantes endémiques du Maroc, sur des bactéries du genre *Flavobacterium* responsables des infections bactériennes engendrant des dégâts et pertes économiques importantes dans les stations de pisciculture à l'échelle internationale. Le choix a porté sur des espèces de plantes aromatiques et médicinales appartenant aux familles des lamiacées, pinacées, astéracées, myrtacées et géraniacées.

Pour ce faire, nous avons procédé dans un premier lieu à évaluer la contamination des œufs fécondés importés, des alevins de truite, des truitelles ainsi que les biofilms et les eaux des bassins par les bactéries du genre *Flavobacterium* au niveau de la station piscicole Ain Aghbal à Azrou. Nous avons pu isoler des souches bactériennes appartenant à ce genre après identifications macro et microscopique et des caractérisations biochimiques et enzymatiques, en comparaison avec des souches de référence de *Flavobacterium psychrophilum* importées de la France et de la Suisse.

L'étape suivante est de choisir des plantes aromatiques et médicinales Marocaines douées d'un potentiel antibactérien approuvé et d'extraire des huiles essentielles de bonne qualité qui répondent à des critères bien précis en termes de leur composition chimique.

La caractérisation phytochimique des huiles essentielles étudiées a révélé une composition chimique diversifiée caractérisée par l'abondance de molécules à haute valeur ajoutée telles que le thymol, le carvacrol, l'eugénol et le linalol selon les familles. L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré que ces huiles essentielles présentent une activité variant entre modérée et assez forte. Les huiles essentielles des espèces de thym et origan se sont montrées les plus actives, notamment celles de *Thymus maroccanus* et *Origanum compactum*.

Le screening primaire de l'activité antibactérienne des Huiles essentielles vis-à-vis des souches de *Flavobacterium spp.* a été réalisé en utilisant 15 huiles essentielles contre

l'ensemble des isolats et les souches de référence. Les résultats des aromatoigrammes montrent que 7 huiles essentielles sont douées d'une activité anti-flavobactérienne importante. L'utilisation des techniques de macro et micro-dilution nous a permis de déterminer les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles essentielles. Les résultats ont montré que seulement les huiles essentielles de *T. maroccanus* et *O. compactum*. ont une activité bactéricide, quant au reste des huiles essentielles leurs pouvoirs sont bactériostatiques.

Les principes actifs (thymol et carvacrol) de ces deux huiles essentielles *in-vivo* ont été utilisés comme traitement curatif et préventif contre les infections hivernales dues au *Flavobacterium spp.* chez les alevins à la station de pisciculture Ain Aghbal. Les résultats indiquent qu'en plus de leurs effets antibactériens, le thymol a un effet positif sur les paramètres zootechniques de l'élevage des truites (croissance et gain de la masse corporelle).

Mots-clés : Aquaculture, truite arc en ciel, *Flavobacterium spp.*, huiles essentielles, activité antibactérienne, CMI, CMB, paramètres zootechniques.

ABSTRACT

Despite all the efforts made so far to fight and prevent bacterial infections in aquaculture, (particularly in salmon and trout farming), the impact remains worrying, especially in the early stages of development. This seems to be intensely related to the complexity of the problem and the diversity of the bacterial communities in aquatic environments. Thus, more attention has been given to natural sources of active molecules against bacterial infections in order to limit the use of conventional antibiotics.

For this purpose, we evaluated the antibacterial effects of compounds from different essential oils extracted from aromatic plants, certain of them being endemic in Morocco. We were interested in the antibacterial effect against the genus *Flavobacterium* responsible for bacterial infections, and causing significant damage and economic losses in fish farming stations at national and International levels. The main aromatic and medicinal plants species belonged to Lamiaceae, Pinaceae, Asteraceae, Myrtaceae and Geraniaceae.

At first, we proceeded to assess the contamination of imported fertilized eggs, trout fry, trout, biofilms and pond water by *Flavobacterium* at Ain Aghbal fish farm (AZROU). In fact, we were able to isolate strains belonging to this genus after macroscopic, microscopic, biochemical and enzymatic characterization. This study was in comparison with reference strains of *Flavobacterium psychrophilum* imported from France and Switzerland.

The next step was to select and extract essential oils from Moroccan aromatic and medicinal plants with significant antibacterial potentials. Extracted essential oils were of very good quality and very specific criteria in terms of their chemical composition.

The phytochemical characterization of studied essential oils revealed a diversified chemical composition and high abundance of active molecules such as thymol, carvacrol, eugenol and linalool. The evaluation of the antibacterial activity showed that the essential oils had an activity varying between moderate and very strong. The essential oils of thyme and oregano were the most active, especially those of *T. maroccanus* and *O. compactum*.

The primary screening of antibacterial activities of essential oils against strains of *Flavobacterium spp.* was performed using 15 essential oils against all isolates and imported reference strains. The results of the chromatograms showed that 7 essential oils are endowed with a significant anti-flavobacterial activity.

The use of macro and micro-dilution techniques allowed us to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of active essential oils. The results showed that the essential oils of *T. maroccanus* and *O. compactum*

could inhibit all tested strains, as for the rest of the essential oils their powers were bacteriostatic.

The last part of this work focused on the use of thymol and carvacrol extracted from essential oils *in-vivo*, as a treatment against winter infections due to *Flavobacterium spp.* occurring at Ain Aghbal fish farm. The results indicated that, in addition to their antibacterial effects, thymol have a positive effect on the zootechnical parameters of trout farming (growth and body mass gain).

Keywords: Aquaculture, rainbow trout, *Flavobacterium spp.*, essential oils, screening, antibacterial activity, MIC, CMB, zootechnical parameters.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principaux flux commerciaux des produits de la pêche dans le monde (FAO, 2016).	8
Figure 2 : Photos montrant la pathologie générale chez les poissons du grand lac infectés par des flavobactéries.	3
Figure 3: Photos montrant la pathologie générale chez les poissons ayant fait l’objet de tests expérimentaux avec <i>Flavobacterium spp.</i> isolats qui ont été récupérés à l'origine chez les poissons du Grand Lac.	4
Figure 4 : Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram positif et Gram négatif (Bisognano, 2001).	23
Figure 5 : Structure schématique du peptidoglycane (Euzéby, 2004).	24
Figure 6 : Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse de la paroi (Paquet-Bouchard, 2006).	24
Figure 7 : Schéma de la structure chimique du LPS bactérien (Pupo et Hardy, 2009).	26
Figure 8 : Mode d’action des quinolones (Kohanski et al., 2010).	27
Figure 9 : Synthèse des protéines et les sites d’action des antibiotiques (Targant 2010).	28
Figure 10 : Apparence générale de la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i> ,Walbaum, 1792).	46
Figure 11 : Anatomie interne et externe d’un salmonidé.	47
Figure 12 : Cycle d’élevage de la truite arc-en-ciel.	48
Figure 13 : Culture de <i>Flavobacterium spp.</i> sur gélose TYES.	58
Figure 14 : Observation microscopique en coloration de Gram de <i>Flavobacterium spp.</i>	58
Figure 15 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des bactéries.	67
Figure 16 : Schéma du montage pilote utilisé pour extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau.	86
Figure 17 : Principe de la méthode de diffusion par disque.	106
Figure 18 : Méthode de dilution en milieu liquide pour la détermination de la CMI.	108
Figure 19 : Technique de microdilution en milieu liquide.	109
Figure 20 : Détermination de la CMB en milieu solide.	110

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Résultats d’identification de quelques isolats (a : galerie Api 20E / b : galerie Api 20NE).	60
Photo 2 : Prélèvement et conditions de manipulation des alevins Erreur ! Signet non défini. 31	
Photo 3 : Dissection d’un alevin sujet de traitement à base de thymol 13140	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Familles d'antibiotiques regroupant celles homologuées pour usage chez les poissons au Canada avec leur mode d'action.	21
Tableau 2 : Classes majeures des composés antimicrobiens d'origine végétale et leurs mécanismes d'action (Cowan, 1999).	31
Tableau 3 : Principales pathologies infectieuses rencontrées chez la truite arc-en-ciel en fonction du stade de l'élevage et des saisons (Ferra, 2008).....	50
Tableau 4 : Paramètres physiques de l'eau d'élevage.	57
Tableau 5 : Résultats des caractérisations macroscopique et microscopique.	59
Tableau 6: Caractérisation biochimique des isolats et des souches de référence.	62
Tableau 7 : Caractérisation enzymatiques des isolats et des souches de référence.....	64
Tableau 8 : Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques.	65
Tableau 9 : Plantes aromatiques médicinales choisies pour notre étude.....	77
Tableau 10 : Caractéristiques physiques des huiles essentielles étudiées.....	88
Tableau 11 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	89
Tableau 12 : Composition chimique de l'huile essentielle de deux espèces de Thym.	90
Tableau 13 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cedrus atlantica</i>	91
Tableau 14: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i>	92
Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	92
Tableau 16 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cladanthus mixtus</i>	93
Tableau 17 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	93
Tableau 18 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i>	94
Tableau 19 : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	95
Tableau 20 : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Origanum compactum</i>	95
Tableau 21 : Valeurs moyennes des zones d'inhibition (cm) - Tests de confrontation par méthode de diffusion en milieu gélosé.	111
Tableau 22 : Tests de détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles sur <i>Flavobacterium spp.</i>	115
Tableau 23 : Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB des huiles essentielles à pouvoir bactéricide et le rapport CMI/CMB.	117
Tableau 24 : Suivi du test de toxicité de Carvacrol.....	133
Tableau 25 : Suivi du test de toxicité de Thymol.....	134
Tableau 26 : Examen interne et externe des alevins après arrêt des apports de carvacrol et thymol.....	135
Tableau 27 : Diagnostic 14 jours après arrêt du test de toxicité.	136
Tableau 28 : Résultats du test curatif à base de thymol.....	138
Tableau 29 : Résultats des examens interne et externe après le test curatif.....	139

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BCWD	Bacterial Cold Water Disease
<i>C. atlantica</i>	<i>Cedrus atlantica</i>
<i>C. mixtus</i>	<i>Cladanthus mixtus</i>
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
<i>E. globulus</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
EUCAST	European comitte on antimicrobial susceptibility testing
FAO	Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
Gram-	Gram négative
Gram+	Gram positive
Kb	kilobase
<i>L. officinalis</i>	<i>Lavandula officinalis</i>
LPS	Lipopolysaccharides
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONPG	Ortho-Nitro-Phénol-Galactopyranoside
<i>O. compactum</i>	<i>Origanum compactum</i>
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
<i>P. graveolens</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pb	Paire de bases
<i>R.officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
RTFS	Rainbow Trout Fry Syndrome
<i>S. officinalis</i>	<i>Salvia officinalis</i>
<i>S. aromaticum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
<i>T. broussonetii</i>	<i>Thymus broussonetii</i>
<i>T. maroccanus</i>	<i>Thymus maroccanus</i>
TSA	Trypticase Soja Agar
TYES	Tryptone, Yeast Salt Extract
UFC	Unité Formant une Colonie

SOMMAIRE

AVANT PROPOS
REMERCEMENTS

ملخص

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES FIGURES

LISTE DES PHOTOS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. De l'aquaculture à la truiticulture et de l'hôte <i>Onchorhycus mykiss</i> aux maladies bactériennes du genre <i>Flavobacterium</i>	6
II. Consommation, production et commerce international des produits de la pêche et de l'aquaculture.....	6
III. Truite arc-en-ciel.....	9
IV. Maladies d'origines bactériennes en aquaculture.....	10
V. Flore bactérienne indésirable du poisson.....	11
1 Altérations bactériologiques	11
2 Principaux micro-organismes	12
3 Maladies Flavobactériennes et leurs agents	13
a. Généralités	13
b. Histoire des maladies Flavobactériennes chez les poissons	14
c. Famille Flavobacteriaceae.....	17
d. Genre <i>Flavobacterium</i>	18
e. Ecologie de <i>Flavobacterium spp.</i>	20
f. <i>Flavobacterium spp.</i> agents pathogènes des poissons	21
VI. Etude comparative des deux agents pathogènes <i>F. psychrophilum</i> et <i>F. columnare</i>	4
1. Analyse moléculaire du génome	1
a. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	1
b. <i>Flavobacterium columnare</i>	1
2 Aspects génétiques et pathogénicité / Spécificité de l'hôte	2
a. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	3
b. <i>Flavobacterium columnare</i>	4
3 Développement de traitements alternatifs et méthodes prophylactiques : probiotiques, Extraits de plantes, Phages	5
a. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	5
b. <i>Flavobacterium columnare</i>	7
4 Enquêtes sur différentes susceptibilités des souches de poissons et des espèces aux agents pathogènes	8
a. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	8
b. <i>Flavobacterium columnare</i>	8

5	Milieu de détection et de croissance de bactéries.....	9
a.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	9
b.	<i>Flavobacterium columnare</i>	10
6	Biologie et maladie.....	10
a.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	10
b.	<i>Flavobacterium columnare</i>	11
7	Méthodes de lutte	12
a.	Mesures préventives	12
8	Mesures thérapeutiques	14
9	Adhésion et formation de biofilms	14
10	Stratégies de contrôle de l'adhésion bactérienne et de la formation de biofilm	18
11	Antibiotiques en truiticulture : efficacité et effet sur l'environnement de l'élevage	20
a.	Antibiotiques en pisciculture : nature et mode d'emploi	20
b.	Classification des Antibiotiques	21
c.	Modes d'administration	21
d.	Mode d'action des antibiotiques.....	22
e.	Conséquences de l'utilisation abusive des antibiotiques	28
VII.	Plantes aromatiques et médicinales au Maroc : de la botanique à l'huile essentielle - phytothérapie.....	29
1.	Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales	29
a.	Historique.....	31
b.	Plantes médicinales et aromatiques à visée thérapeutique au Maroc	32
2	Généralités sur les huiles essentielles.....	33
a.	Définition des huiles essentielles.....	33
b.	Répartition des huiles essentielles dans la plante	34
c.	Caractères physico-chimiques des HE.....	34
d.	Facteurs influençant la composition chimique des HE.....	35
e.	Contrôle de la qualité des HE.....	36
f.	Procédés d'extraction des HE	36
g.	Méthodes d'analyse des HE	37
h.	Toxicité des HE.....	37
i.	Activité antimicrobienne des HE.....	38
j.	Activité bactéricide et bactériostatique des HE.....	38
k.	Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE	39
l.	Activité liée à la composition chimique.....	39
m.	Activité liée aux microorganismes	40
n.	Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des HE <i>in vitro</i>	40
3	Techniques de screening des HE.....	41
a.	Aromatogramme.....	41
b.	Technique de diffusion en puits	41
4	Techniques de détermination de la CMI des HE.....	41
a.	Techniques de diffusion en milieu solide	41
b.	Techniques de diffusion en milieu liquide	42
c.	Techniques de diffusion en phase vapeur	42
PARTIE I : ETUDE BACTERIOLOGIQUE : ETUDE DE L'AGENT PATHOGENE - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE, BIOCHIMIQUE ET ENZYMATIQUE DES BACTERIES		43

I.	Contexte.....	44
II.	Introduction.....	44
III.	Matériel et méthodes	45
1.	Site d'étude	45
2.	Espèce de poisson étudiée	46
a.	Méthodologie et relation avec la phase d'élevage.....	47
b.	Evénements et facteurs inducteurs de maladies en élevage	49
b.1.	Transports et manipulations	49
b.2.	Densité et interactions.....	49
b.3.	Facteurs environnementaux.....	50
b.4.	Maladies et parasites	50
c.	Intérêt.....	51
3.	Evaluation et suivi saisonnier	51
a.	Échantillonnage.....	51
4.	Observation macroscopique.....	52
a.	Observation macroscopique : Coloration de Gram	52
a.1.	Principe	52
5.	Caractérisation biochimique et enzymatique	54
6.	Antibiogramme	56
a.	Principe	56
b.	Technique.....	56
IV.	Résultats	57
1.	Qualité de l'eau et échantillonnage	57
2.	Caractérisations phénotypiques, macroscopiques	57
3.	Caractérisations phénotypiques, microscopiques	58
4.	Caractérisations biochimique et enzymatique.....	60
5.	Test de sensibilité aux antibiotiques.....	61
V.	Discussion.....	67
VI.	Conclusion.....	72
PARTIE II : ETUDE DU POUVOIR ANTIBACTERIEN DES HUILES ESSENTIELLES DES PLANTES ET DETERMINATION DES CMI ET CMB IN-VITRO.....		73
CHAPITRE 1 : Choix et collecte des plantes - Extraction et composition chimique des Huiles Essentielles.....		74
I.	Contexte.....	75
II.	Introduction.....	75
III.	Matériel et méthodes	76
1.	Choix des plantes	76
2.	Caractérisation phylogéniques des plantes étudiées.....	77
a.	Romarin	77
b.	Thym.....	78
c.	Cèdre	79
d.	Lavande vraie.....	80
e.	Sauge	80
f.	Camomille sauvage	81
g.	Clou de girofle.....	82
h.	Géranium rosat	83
i.	Eucalyptus.....	84

j.	Origan	85
3	Extraction des huiles essentielles et rendement	86
4	Analyse de la composition chimique des HE.....	86
IV.	Résultats	88
1.	Caractéristiques physiques des HE.....	88
2	Résultats de la séparation des constituants de l'HE par CPG/SM.....	89
a.	Romarin	89
b.	Thym.....	90
c.	Cèdre.....	91
d.	Lavande.....	91
e.	Sauge	92
f.	Camomille.....	93
g.	Clou de girofle.....	93
h.	Géranium	94
i.	Eucalyptus.....	94
j.	Origan	95
V.	Discussion.....	96
VI.	Conclusion	102
CHAPITRE 2 : Confrontation Huiles Essentielles - Bactéries <i>IN VITRO</i> , Détermination des CMI et CMB		
103		
I.	Contexte.....	104
II.	Introduction.....	104
III.	Matériel et Méthodes	105
1.	Matériel biologique	105
2	Milieu de culture	105
3	Etude microbiologique	105
a.	Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque	105
b.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	107
c.	Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB).....	109
IV.	Résultats	110
1.	Criblage de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur <i>Flavobacterium spp.</i>	110
2	Caractérisation du mode d'action des huiles essentielles sur <i>Flavobacterium spp.</i>	114
V.	Discussion.....	119
VI.	Conclusion	122
PARTIE III : PHYTOTHERAPIE : DE LA TOXICITE A LA DOSE – DETERMINATION DU POUVOIR GUERISON DES PRINCIPES ACTIFS		
124		
I.	Introduction.....	125
II.	Matériel et méthodes	126
1	Test de toxicité.....	126
a.	Tests létaux	126
b.	Tests sublétaux	126
b.1.	Protocole Expérimental.....	126
b.2.	Suivi et observation de l'état sanitaire des alevins	128
2	Tests <i>in-vivo</i>	128
III.	Résultats	130
1.	Test de toxicité.....	130
2	Test <i>in-vivo</i>	137

IV. Discussion.....	140
V. Conclusion.....	142
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

A l'échelle internationale comme au Maroc, la production piscicole continentale a doublé en dix ans pour atteindre le stade industriel. L'aquaculture d'eau douce marocaine produit un ensemble d'espèces entre autre la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'intensification de l'aquaculture s'est accompagnée d'un développement de différentes maladies (i) non-infectieuses liées aux conditions environnementales, nutritionnelles et génétiques de l'élevage, mais également (ii) infectieuses, liées au développement d'agents pathogènes.

Différents bio-agresseurs, seuls ou en association, peuvent infecter les poissons : des parasites (*Gyrodactylus sp.*), des virus (*Rhabdovirus*) responsables de la SHV (Septicémie Hémorragique Virale) et de la NHI (Nécrose Hématopoïétique Infectieuse) et/ou des bactéries.

De nombreuses bactéries ichtyopathogènes ont été décrites, on peut citer *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*, et les bactéries du genre *Flavobacterium*. Ces bactéries retrouvées chez nombreux poissons d'eau douce d'élevage sont des agents pathogènes responsables des épidémies et mortalités massives. Décrites pour la première fois en 1946 aux Etats-Unis, les pathologies liées aux bactéries *Flavobacterium spp.* en élevage, n'est apparue en France qu'au milieu des années 1980 (Bernardet et al., 2007). Les mécanismes de virulence liés à ces bactéries restent méconnus. Les pertes économiques induites dans les élevages aquacoles des truites sont considérables dans la mesure où les infections peuvent conduire à 70% de mortalité au stade alevin. Il est donc important de renforcer la mise en œuvre de programme de prophylaxie préventive qui relève de l'application des règles d'hygiène, des procédures de nettoyage et de désinfection, du traitement de l'eau, mais aussi des bonnes pratiques de nourrissage et d'élevage.

La prophylaxie médicale est basée sur l'utilisation de vaccins. Néanmoins, il n'existe pas de vaccins commerciaux permettant de protéger les poissons contre les flavobactérioses hivernales et seule l'antibiothérapie permet de limiter les pertes liées aux infections Flavobactériennes.

Actuellement, nombreuses recherches entreprises pour contrôler les flavobactérioses s'orientent vers des approches biotechnologiques via l'utilisation de bactériophages, (Castillo et al., 2012 ; Madsen et al., 2013) ou de vaccin à base de flavobactéries atténuées

(LaFrentz et al., 2008). Ces travaux semblent prometteurs pour proposer des traitements à bas coûts, mais présentent des difficultés d'application, en raison de l'interdiction de la dispersion d'organismes vivants dans le milieu naturel.

Le genre *Flavobacterium* englobe des pathogènes Gram négatif des poissons. Ces pathogènes sont connus comme étant des agents causals de nombreuses infections bactériennes chez les salmonidés en particulier. Ces maladies peuvent atteindre le niveau épidémique chez les poissons d'élevage et sauvages. Les éclosions de "Rainbow Trout Fry Sandrome" (RTFS) peuvent entraîner des taux de mortalité élevés et sont habituellement observées chez les truites arc-en-ciel. Les alevins de truite, sont les plus sensibles par rapport au reste des salmonidés (Grasteau, 2015). Aucun vaccin n'est actuellement disponible et les maladies dues aux bactéries de ce genre sont traitées avec des antibiotiques (Grasteau, 2015).

La culture des bactéries du genre *Flavobacterium* présente toujours une problématique, car ces bactéries sont fastidieuses et ne poussent pas sur des milieux riches en nutriments. Les bactéries ont été isolées chez des poissons cliniquement et non cliniquement affectés et peuvent survivre sous des conditions pauvres en nutriments pendant longtemps, ce qui peut expliquer la réapparition de foyers. La voie d'infection et les mécanismes de défense de l'hôte ne sont pas encore clairs.

Depuis leur découverte au 20e siècle, les antibiotiques ont permis de réduire considérablement la menace de maladies infectieuses. L'utilisation de ces "médicaments miracles" a entraîné une baisse spectaculaire de la mortalité imputable à des maladies en élevage, autrefois, impossibles à soigner et fréquemment mortelles et engendre des pertes économiques importantes. Mais ces progrès sont sérieusement remis en question par l'apparition et la propagation de germes résistants à ces médicaments (WHO, 2012). Cette émergence de la multi-résistance couplée à une pénurie apparente de nouveaux agents antimicrobiens, dicte qu'aucune autre voie réalisable en vue d'étendre l'efficacité et / ou l'utilité future des agents existants ne doit être ignorée (FAO, 2016). Donc la problématique d'inefficacité devient de plus en plus inquiétante.

Les composantes chimiques des huiles essentielles constituent une matière de recherche dans le but de substituer l'usage des antibiotiques conventionnels. Ces derniers s'avèrent moins efficaces contre les bactéries multi-résistantes.

Des extraits bruts de plantes médicinales se distinguent comme de véritables sources d'agents antibactériens. Un certain nombre d'études *in vitro* ont rapporté l'utilisation

d'extraits de plantes comme alternatifs aux antibiotiques. Néanmoins, Les huiles essentielles sont des substances naturelles complexes, possédant des caractéristiques physico-chimiques bien définies, et répondant à des critères de qualité qu'il faut connaître pour éviter tout risque de toxicité qui peut se révéler dangereux pour la santé animale (Bakkali et al., 2008). Par ailleurs, ces produits présentent une grande variabilité de leurs constituants chimiques, leur attribuant de nombreuses propriétés médicinales et biologiques qu'il convient de connaître et de valoriser. Leur activité antimicrobienne, constituant une de leurs grandes vertus, fait l'objet aujourd'hui de nombreux travaux de recherche, en testant ces huiles sur différents microorganismes (bactéries, champignons, virus, etc.), faisant ainsi de ces extraits naturels des agents antimicrobiens potentiels (Hemaiswarya et al., 2008 ; Langeveld et al., 2013).

C'est dans cette perspective que nous avons entrepris ce présent travail qui vise à étudier le pouvoir antibactérien des huiles essentielles (HE) de certaines plantes endémiques du Maroc sur des bactéries isolées du genre *Flavobacterium* pouvant être impliquées dans la mortalité de la truite arc en ciel au niveau de la station de pisciculture Ain Aghbal, Azrou-Maroc. Le but ultime de notre travail est de rechercher l'huile ou les huiles essentielles permettant la guérison des alevins de la truite et minimisant le taux de mortalité dû aux maladies d'origine bactérienne pendant l'hiver.

Dans ce cas, le résultat attendu serait non seulement de diminuer le nombre de mortalité et guérir les alevins mais aussi de produire un poisson BIO, vu que la stratégie de départ et d'éliminer l'utilisation des antibiotiques et antiseptiques en élevage de la truite arc en ciel.

Le choix des HE a porté sur celles extraites des plantes médicinales possédant d'innombrables vertus thérapeutiques et dont l'usage traditionnel n'a jamais cessé d'augmenter.

L'étape préliminaire consistait à isoler et identifier l'agent ou les agents bactériens causals des mortalités d'alevins, à choisir et collecter les plantes médicinales pour extraire les huiles essentielles et à caractériser les phytoconstituants de ces huiles essentielles par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG / SM).

Nous avons aussi pu traiter l'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles sur nos isolats et sur des souches de références de l'espèce *Flavobacterium psychrophilum* in vitro.

Enfin, l'activité *in vivo* de certains principes actifs des huiles essentielles ayant un pouvoir bactéricide a été évaluée afin d'élucider leur pouvoir de guérison sur les alevins malades et

leur rôle potentiel sur la restauration et le renforcement du système immunitaire des poissons. Egalement, nous avons tenté d'examiner l'effet toxique des doses, et si l'exposition prolongée peut avoir des résultats négatifs sur les alevins et leur bien-être. Nous avons aussi surveillé de près les changements des paramètres zootechniques pendant et après le traitement.

Ce manuscrit de thèse comporte essentiellement trois parties dépendantes en plus d'une synthèse bibliographique détaillée concernant la problématique en comparaison avec la situation de la truiticulture mondiale.

La première partie sera consacré aux études microbiologiques, précisément à l'isolement, l'identification et la caractérisation classique des isolats du pathogène.

Quant à la deuxième partie, elle comportera deux chapitres :

- Le premier chapitre traitera l'étude phyto-chimique et biologique des plantes aromatiques et médicinales utilisées dans cette étude pour le bio-contrôle contre les bactéries isolées.
- Le deuxième chapitre détaillera les tests de confrontation entre huiles essentielles et bactéries *in-vitro*, ainsi que la détermination des CMI et CMB

A travers la troisième partie, les protocoles expérimentaux suivis pour la confrontation *in-vivo* seront exposés, tout en incluant les études de toxicité et de contrôle zootechnique vis-à-vis les effets des composantes majoritaires des huiles essentielles sur les alevins sujet des traitements.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. De l'aquaculture à la truiticulture et de l'hôte *Onchorhynchus mykiss* aux maladies bactériennes du genre *Flavobacterium*.

Au niveau Mondial, la flavobactériose des eaux froides constitue la maladie la plus enregistrée dans les stations d'élevage des truites et de production piscicole après la furunculose (Grasteau, 2015). Depuis les années 2000, une mortalité massive due aux infections au *Flavobacterium* a été également observée dans les élevages de truites et de saumons au Maroc (Maychal, comm. pers.).

Afin de pallier à ce fardeau économique, de nombreux travaux ont été menés dans le but d'étudier la variabilité génétique de l'agent bio-agresseur *Flavobacterium* spécialement l'espèce *F. psychrophilum*. Ces études ont mis en évidence, une variabilité génétique en lien (de manière non exclusive) avec l'espèce de poisson hôte et une absence de structuration géographique de cette variabilité.

Ces données sont pratiquement inexistantes au Maroc surtout sur une espèce hôte particulière et sur une échelle géographique réduite (pisciculture). Elles sont pourtant essentielles pour comprendre les modalités de diffusion de cet agent et ses réservoirs environnementaux afin de mieux adapter des stratégies de lutte en élevage dans un contexte de limitation des intrants médicamenteux.

L'espèce hôte de *F. psychrophilum* choisie dans ce projet de thèse est la truite arc-en-ciel, en tant que principale production piscicole au Maroc et espèce particulièrement sensible à la flavobactériose des eaux froides. Les attentes des acteurs de la filière piscicole Marocaine sont donc fortes.

Afin de déterminer le niveau de contamination de la truite arc en ciel en élevage par le *F. psychrophilum*, un premier niveau d'analyse a visé une échelle géographique nationale, en ciblant la station privée de pisciculture Ain Aghbal, la seule dédiée au Maroc à la production de la truite arc en ciel pour le marché national et l'intérêt comparatif des résultats générés avec les bases de données existantes vue que la station fait l'importation des œufs de la France.

II. Consommation, production et commerce international des produits de la pêche et de l'aquaculture

Les produits de la pêche et de l'aquaculture sont une part importante des apports en protéines animales dans l'alimentation humaine. En 2014, ils représentaient 17 % de ces apports dans le monde (FAO, 2016). Ceci est le résultat d'une augmentation de la consommation des produits

aquatiques depuis 50 ans. Elle est passée de 9,9 kg/an/habitant dans les années 1960 à 20 kg/an/habitant en 2014. Cependant, la consommation de ces produits est inégale et dépend des régions du monde. Les pôles de consommation principaux sont l'Europe du Nord et de l'Ouest, avec 25 kg/an/habitant, l'Amérique du Nord, la façade pacifique de l'Asie et l'Asie du Sud-Est (EUMOFA, 2016). Au sein de l'union Européenne, il y a également des disparités de consommation entre les pays. En 2015, les Portugais consommaient 60kg/an/habitant de produits aquatiques alors qu'en Hongrie, la consommation était de 4,8kg/an/habitant (EUMOFA, 2016).

Pour soutenir la consommation croissante des produits aquatiques, la production mondiale des produits issus de la pêche a quadruplé, elle est passée de 20 millions de tonnes à près de 80 millions de tonnes à la fin des années 1980 puis s'est stabilisée (FAO, 2016). A partir de cette stabilisation de la pêche de capture, la production de l'aquaculture a fortement augmenté. Elle a été multipliée par 7, en passant de 10 millions de tonnes à la fin des années 1980 à 70 millions de tonnes en 2014 (FAO, 2016). Les pays asiatiques produisent près de 74 % des ressources de pêche et d'aquaculture mondiale. Quatre pays concentrent 78 % de la production aquacole du monde : la Chine ($\pm 45\,469\,000$ t), l'Indonésie ($\pm 4\,254\,000$ t), l'Inde ($\pm 4\,881\,000$ t) et le Vietnam ($\pm 3\,397\,000$ t). La Chine, à elle seule représente 60 % des ressources aquacoles (FAO, 2016).

L'Europe et les États-Unis produisent près de 10 % des ressources mondiales aquatiques chacun, l'Afrique et l'Océanie sont à 5 et 1 % respectivement (EUMOFA, 2016). En 2015, au sein de l'Union européenne, 4 686 000 tonnes de poissons ont été produits. Les principales espèces étaient le hareng (720 750 t, 15%), le sprat (553 714 t, 12 %) et le maquereau (464 160 t, 10 %). En ce qui concerne l'aquaculture, 80 % de la production aquacole européenne concernait l'élevage des mollusques bivalves et des salmonidés (saumon et truite) (38 % de moules, 15 % de truite, 11 % de saumon et 7 % d'huîtres). En 2016, la France était le troisième producteur Européen de produits de la pêche avec 785 000 tonnes, ce qui correspondait à 11 % de la production Européenne (FranceAgriMer, 2017c). Les principales espèces produites étaient le thon (102 880 t totalement issues de la pêche), les huîtres (79 010t entièrement issues de l'aquaculture) et les moules (77 040 t très majoritairement issues de l'aquaculture).

Les pôles mondiaux de production et de consommation des produits aquatiques sont différents. En effet, un tiers de la production halieutique mondiale est exportée. Les principales espèces échangées, en termes de valeur, sont le saumon (16,6 %), les crevettes (15,3 %) et les thonidés (10,2 %). En termes de volume, ce sont les morues, merlus, églefins

(14,4 %) puis les autres poissons pélagiques (12,7 %) et enfin les thonidés (8,3 %) (FAO, 2016). Les flux de marchandises aquatiques se font principalement des pays en développement vers les pays développés (Figure 1) (FAO, 2016). Les trois principaux pays exportateurs sont la Chine (20 980 millions dollars américain), la Norvège (10 803 millions dollars américain) et le Viet Nam (8 029 millions dollars américain). En parallèle, l'Union Européenne est le marché d'importation le plus important du monde (54 000 millions dollars américain) devant les Etats-Unis (20 317 millions dollars américain) et le Japon (14 844 millions dollars américain).

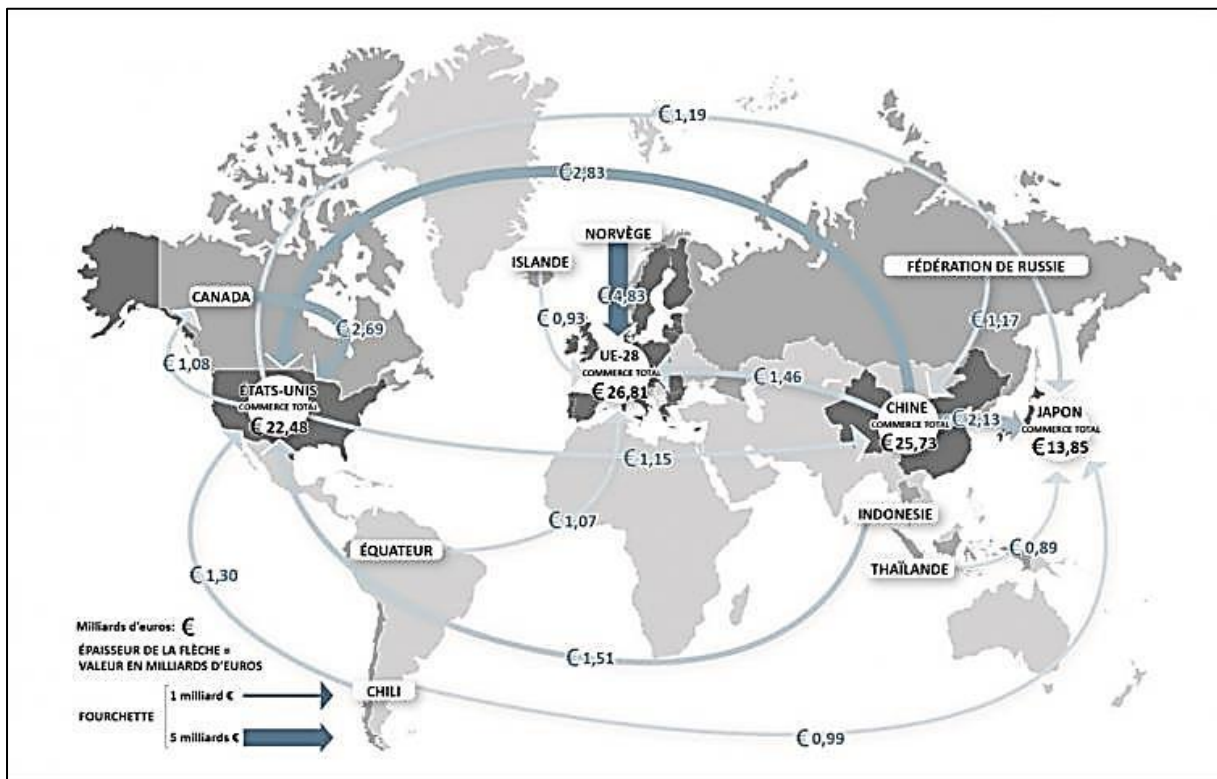


Figure 1 : Principaux flux commerciaux des produits de la pêche dans le monde (FAO, 2016).

Entrée en vigueur le 1er janvier 2006, la réforme de la réglementation européenne relative à l'hygiène des aliments a simplifié et harmonisé les textes applicables dans l'Union Européenne. Cet ensemble de textes réglementaires, appelé «Paquet hygiène», concerne l'ensemble de la filière agroalimentaire depuis la production primaire jusqu'au consommateur pour harmoniser le niveau de sécurité sanitaire. La consommation des produits aquatiques comporte des dangers dont font partie les bactéries. En effet certaines peuvent être des pathogènes alimentaires pour l'homme. Les producteurs doivent veiller à ce que les produits alimentaires vendus soient sains et sûrs pour les consommateurs, si non les produits non conformes doivent être retirés du marché.

III. Truite arc-en-ciel

L'Organisation nationale pour l'alimentation et l'agriculture reconnaît la contribution des gouvernements européens et Salmoniculture américaine, à la satisfaction de la demande en matière de produits de la pêche, avec les espèces les plus demandées ; la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et le saumon atlantique (*Salmo salar*) (FAO, 2012 ; Mente et Smaal, 2016).

Au cours des quatre dernières décennies, le gouvernement finlandais a tenté d'encourager la production de truites arc-en-ciel en raison de la position géographique du pays, la santé des poissons étant une priorité et objectif (FAO, 2016).

Dans les conditions d'élevage, les femelles de truites arc-en-ciel pondent en hiver. Après fécondation, l'éclosion des œufs de truite fécondés issus d'une reproduction artificielle nécessite des eaux de très bonne qualité, riches en oxygène et une température d'eau relativement froide, car elle dépend de manière directe de la température de l'eau.

Les alevins avec sacs vitellins restent dans le gravier pendant quelques semaines et se nourrissent de leurs sacs vitellins jusqu'à ce qu'ils émergent comme alevins nageant librement (Massa et al., 1999). Aujourd'hui, les œufs fécondés peuvent être expédiés partout dans le monde, des écloséries aux autres fermes d'élevage. La truite arc-en-ciel tolère une plage de température de l'eau avec une croissance optimale à une température de 16°C et une consommation maximale à 19°C pour leurs besoins énergétiques (Wurtsbaugh et Davis, 1977 ; Jobling, 1981).

Bien que l'élevage de la truite arc-en-ciel soit source de protéines de haute qualité pour la consommation humaine, seul un poisson en bonne santé peut produire des produits sûrs et de qualité destinés à la consommation humaine (Villaruel et al., 2009).

En milieu piscicole, le contact continu et intime en surface augmente le potentiel des agents pathogènes des tissus muqueux du corps du poisson et constituent toujours un défi pour l'immunité innée de l'hôte (Magnadóttir, 2006).

La truite arc-en-ciel possède un système de défense immunitaire muqueux qui fonctionne bien dans leurs organes externes tels que les nageoires, les branchies, la peau et les yeux, qui visent à bloquer la pénétration des agents pathogènes présents dans le poisson (Esteban et Cerezuela, 2015).

La couche muqueuse qui recouvre ces organes a non seulement la capacité de piéger l'envahisseur (mécanisme de dégagement mécanique), mais contient également divers facteurs antimicrobiens tels que les agglutinines et les précipitines (lectines), inhibiteurs

enzymatiques (lysozyme), pentraxines, protéines du complément, macrophages, antibactériens peptides et anticorps naturels (substances humorales) pour éliminer les agents infectieux (Uribe et al., 2011).

La peau est l'un des plus gros tissus muqueux qui contribue à la défense immunitaire contre les bactéries pathogènes, mais il est souvent susceptible à l'adhésion de la plupart des agents pathogènes (Martin, 2013).

En plus de l'épithélium cutané, les branchies et les nageoires sont considérés comme des points d'entrée importants pour plusieurs bactéries pathogènes, y compris *F. psychrophilum* (Magnadóttir, 2006).

Chez les poissons téléostéens, plusieurs immunoglobulines (Ig) différentes sont présentes dans les sécrétions muqueuses y compris IgD, IgT et IgM (Salinas, 2015).

Il a été suggéré que les IgD ont un impact significatif et un rôle fonctionnel à la surface des branchies (Verrier et al., 2013). Le taux d'IgM dans les branchies et la peau augmente chez la truite arc-en-ciel immunisée et infectée; alors qu'il a été constaté que des taux d'IgM supérieurs à ceux d'IgT dans les sécrétions muqueuses soulignant l'importance des IgM dans l'immunité muqueuse (Zhang et al., 2010 ; Makesh et al., 2015). L'IgM est produit au niveau des tissus muqueux, et est le premier anticorps à apparaître en réponse à une exposition initiale à un antigène chez le poisson (Parra et al., 2014). On pense qu'une adhésion réussie et une invasion par les muqueuses peuvent être atteintes si un agent pathogène est capable de faire face aux composantes humorale et cellulaire de l'immunité innée de l'hôte. Les agents pathogènes bactériens se lient aux glycanes de la surface cellulaire (mucus) de l'hôte par l'intermédiaire de protéines de surface liant les glucides (lectines ou autres). Les endogènes présentes à la surface du pathogène, induisant une réponse immunitaire permis la reconnaissance du pathogène (interaction cellule à cellule ou régulation homéostatique). In vivo, les expériences de défi peuvent fournir une approche réaliste pour dépister la relation hôte-pathogène.

IV. Maladies d'origines bactériennes en aquaculture

La maladie est universellement reconnue comme l'une des menaces les plus graves au succès commercial de l'aquaculture. Comme dans d'autres pays nordiques, les élevages de truites arc-en-ciel ont rencontré des problèmes de maladie causés par des bactéries (furonculose, fièvre rougeole entérique, la maladie des branchies (columnaris) et la maladie bactérienne de l'eau froide (BCWD). Le stress semble jouer un rôle considérablement important chez les

poissons en fonction de la gravité et du type de stress, de sa durée, et l'état physiologique du poisson (état nutritionnel).

La mauvaise qualité de l'eau est l'une des clés facteurs susceptibles d'affecter négativement la production de poisson dans les systèmes d'élevage (Noble et Summerfelt, 1996). Les maladies bactériennes du poisson entraînent des problèmes économiques pour les pisciculteurs et leur traitement contribue à la résistance aux antibiotiques, une des plus grandes menaces pour la santé mondiale et la sécurité alimentaire aujourd'hui. La vaccination des poissons joue un rôle important dans le commerce à grande échelle des espèces d'aquaculture de grande valeur, y compris la truite arc-en-ciel. À l'heure actuelle, il y a quelques vaccins commerciaux contre de nombreuses maladies bactériennes graves dans les piscicultures en eau douce, par exemple, contre la vibriose, la furunculose et la yersiniose (Nham, 2012), mais pas contre le BCWD en raison de la petite taille du poisson infecté (alevins de 1 à 2 g) (Kim et al., 2010).

V. Flore bactérienne indésirable du poisson

1 Altérations bactériologiques

Des micro-organismes sont présents sur toutes les surfaces externes (peau et branchies) et dans les intestins du poisson vivant ou fraîchement capturé. La charge microbienne, très variable est de l'ordre de 10^2 à 10^7 UFC (Unités Formant Colonies). cm^{-2} de peau et de 10^3 à 10^9 UFC.g⁻¹ de branchies ou d'intestins (Shewan, 1961 ; Liston, 1980). Cette grande variabilité reflète l'environnement et l'alimentation des poissons (Huss et Eskildsen, 1974 ; Liston, 1980 ; Adolphe, 2006 ; Nguyen, 2008).

Le muscle d'un poisson vivant est stérile et les foyers naturels de contamination correspondent aux régions du corps en contact avec l'eau (peau, mucus et branchies) et au tractus intestinal. La pénétration des bactéries s'effectue en partie par la peau, mais pour l'essentiel par le système vasculaire à partir des branchies et de la cavité abdominale. Les bactéries de l'intestin peuvent par ailleurs investir directement les muscles de la paroi abdominale, pénétration facilitée par l'action des enzymes digestives.

La nature du mucus est déterminante car celui de certaines espèces présente des propriétés antibiotiques du fait de la présence de lysozymes et de certains anticorps (Shewan, 1977). Dans le cas où ces propriétés antibactériennes n'existent pas, le mucus représente un foyer de contamination qu'il est nécessaire d'enlever par un lavage.

2 Principaux micro-organismes

Les micro-organismes indésirables sont opportunistes et responsables d'une forte mortalité aussi bien chez les poissons d'élevage que chez ceux qui vivent libre (Ronald, 1979). L'eau, surtout quand elle est fortement chargée en matières organiques, est un milieu idéal pour toute espèce de micro-organismes.

Des études précédentes ont montré que la flore bactérienne naturelle du poisson est le reflet de celle de l'eau où il vit et qu'elle contient également de rares espèces bactériennes qui sont des parasites obligatoires parce qu'ils sont incapables de survivre longtemps en dehors du poisson qui est normalement leur habitat (Ronald, 1979). La flore pathogène du poisson doit souvent sa présence sur ou dans le poisson à proximité de l'homme. Cette flore comprend *Aeromonas caviae*, *A. Eucrenophila*, *A. Hydrophila*, *A. Salmonicida*, *A. Veronii spp. Sobbria*, *A. Veronii spp. Veronii*, *Edwarsiella spp.*, *E. Tarda*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Listeria Monocytogenes*, *Pasteurella piscida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Vagococcus sp.*, *Vibrio anguillarum*, *V. Tubiashii*, *V. Vulinificus*, *V. Parahaemoliticus* et *Yersinia ruckeri* (Sadovski et Levin, 1969 ; Mulak et al., 1992). La flore d'altération du poisson est beaucoup plus complexe à analyser de par les interactions entre les différentes souches et surtout leur nombre comme le montre cette liste non exhaustive : *Aeromonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens*, *C. Maltaromaticum*, *Enterobacter sp.*, *Hafnia alvei*, *Halobacterium sp.*, *Halococcus sp.*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus Farciminis*, *Lactobacillus Plantarum*, *Leuconostoc Piscium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia liquefaciens*, *Shewanella putrefaciens*, *Streptococcus difficile*, *Streptococcus Iniae*, *Streptococcus Parauberis*, *Enterococcus faecalis* (Lerke et al., 1963 ; Levin, 1968 ; Sadovski et Levin, 1969 ; Mulak et al., 1992 ; Gram et Huss, 1996 ; Joffraud et al., 2001). Cette flore se divise en plusieurs groupes en fonction des altérations physiques et organoleptiques occasionnées par les bactéries sur la chair du poisson (Joffraud et al., 2001 ; Cardinal et al., 04).

3 Maladies Flavobactériennes et leurs agents

a. Généralités

Les maladies des flavobactéries chez les poissons sont causées par plusieurs espèces bactériennes de la famille des flavobactériaceae et sont responsables de pertes dévastatrices de stocks de poissons sauvages et d'élevage dans le monde. En plus d'imposer directement des effets économiques et écologiques négatifs, les flambées de maladies flavobactériennes sont notoirement difficiles à prévenir et à contrôler, même après cent ans de recherche scientifique. L'émergence de rapports récents établissant un lien entre les flavobactéries précédemment non caractérisées et les infections systémiques et les cas de mortalité dans les stocks de poissons d'Europe, d'Amérique du Sud, d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Nord sont également une source de préoccupation majeure et a mis en évidence certaines des difficultés liées au diagnostic et au traitement chimiothérapeutique des poissons à maladies flavobactériennes.

Nous présentons ici une veille de littérature portant principalement sur *Flavobacterium spp.* et mettons l'accent sur ceux associés aux pathologies des poissons. Les maladies flavobactériennes ont été signalées pour la première fois par Davis (1922) et ont depuis été reconnues comme une menace sérieuse pour les stocks de poissons sauvages et reproduits. A l'origine, ces maladies étaient attribuées à trois bactéries de la famille des flavobactériaceae (Bernardet et Nakagawa, 2006) ; à savoir *Flavobacterium psychrophilum*, l'agent étiologique de la maladie bactérienne de l'eau froide et du syndrome de la truite arc-en-ciel (Nematollaho et al., 2003 ; Starliper, 2011); *Flavobacterium columnare*, l'agent causal de la maladie de columnaris (Hawke et Thune, 1992 ; Shotts et Starliper, 1999); et *Flavobacterium branchiophilum*, l'agent présumé de la maladie bactérienne des branchies (Shotts et Starliper, 1999 ; Wakabayashi et al., 1989). D'autres ont signalé des cas supplémentaires de *Flavobacterium spp* associés à des poissons malades, dont *Flavobacterium johnsoniae* (Christensen, 1977), *Flavobacterium succinicans* (Anderson et Ordal, 1961), *Flavobacterium hydatidis* (Strohl et Tait, 1978), ainsi que d'autres bactéries pigmentées jaunes non caractérisées (Austin et Austin, 2007). Dans les flavobactérioses aiguës, une mortalité cumulative de 70% peut survenir parmi les stocks de poissons affectés, tandis que les survivants peuvent connaître une croissance médiocre et des anomalies de la colonne vertébrale (Austin et Austin, 2007). Dans les infections subaiguës et chroniques, la flavobactériose provoque des mortalités persistantes pouvant conduire à des pertes économiques continues (Center for Epidemiology and Animal Health, 2003). La taxonomie et les spécifications de cette famille

ont subi de nombreuses révisions ; par conséquent, tout au long de cette étude, la terminologie la plus connue des genres et espèces sera utilisée.

Avec les récents progrès de la biologie moléculaire et de la biotechnologie, plusieurs nouveaux genres de la famille des flavobactériaceae sont apparus comme des agents pathogènes du poisson, des amphibiens, des reptiles, des oiseaux et des mammifères, y compris l'homme (*Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Tenacibaculum* et *Ornithobacterium*) (Bernardet et Nakagawa, 2006). Parmi ceux-ci, les *Tenacibaculum spp.* sont d'importants agents pathogènes des poissons marins qui ont été examinés ailleurs (Avendano-Herrera et al., 2006 ; Toranzo et al., 2005) et ne seront pas abordés plus en détail dans la présente étude. On se concentre principalement sur le genre *Flavobacterium*, au sein duquel plusieurs nouvelles espèces ont été décrites au cours de la dernière décennie en association avec des poissons malades du monde entier (Bernardet et al., 2005 ; Flemming et al., 2007 ; Ilardi et al., 2009 ; Kampf et al., 2011 ; Kampf et al., 2012 ; Zamora et al., 2012a,b,c ; Zamora et al., 2013 ; Zamora et al., 2014).

b. Histoire des maladies Flavobactériennes chez les poissons

Davis (1922) a observé plusieurs événements de mortalité chez les poissons au cours des étés de 1917-1919 qu'il a associés à un bactérien non identifié.

Les poissons touchés, qui comprenait des buffles (*Ictiobus bubalus*), des carpes-soleil (*Leopomis spp.*), des carpes communes (*Cyprinus carpio*), des achigans à grande bouche et à petite bouche (*Micropterus salmoides* et *Micropterus dolomieu*), du crappie (*promixis spp.*), de la daurade aux yeux rouges (*Leopomis gulcusus*), (*Perca flavescens*), la barbue (*Morone chrysops*), l'omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), le mullet à gorge arrondie (*Pimephalus notatus*), le poisson-chat d'Amérique (*Ictalurus punctatus*) et le poisson-chat à tête blanche (*Ameiurus spp.*) ont été élevés dans des aquariums et des étangs en terre. Davis (1922) a noté que les poissons affectés présentaient sur le corps des “zones très sales ou jaunâtres”, entraînant la formation de lésions puis la mort en 24 à 72 heures. Les nageoires (en particulier la nageoire caudale) ont été érodées et, dans les cas les plus graves, il ne reste plus que de simples «talons». Il y avait une alsonécrose des branchies visibles sous forme de plaques blanches qui se propagent rapidement, causant la mort. Davis (1922) a également observé des cas de mortalité chez les poissons sauvages du Mississippi associés à cette bactérie. Bien qu'il ait été incapable d'isoler la bactérie dans aucun de ces foyers, il a observé un grand nombre de bâtonnets longues, minces et flexibles, associées aux lésions nécrotiques de la peau et des

poissons atteints qui formaient des «masses en forme de colonne», c'est ainsi qu'il a baptisé la bactérie *Bacillus columnaris*. Deux décennies plus tard, Ordal et Rucker (1944) ont isolé avec succès une bactérie à pigments jaunes et l'ont nommé *Chondrococcus columnaris* en raison de son association avec le cartilage et ce qui la caractérise comme la production de fructifications et de microkystes. Cependant, Garnjobst (1945) a montré que *C. columnaris* n'a pas produit de telles structures et a reclassé la bactérie dans le genre *Cytophaga*, comme *Cytophaga columnaris*. Bien que l'accord sur les impacts négatifs de cette bactérie sur les stocks de poissons a été bien accepté, comme en témoigne son inclusion dans la liste des maladies des poissons à déclaration obligatoire décrites dans la loi britannique sur les maladies des poissons de 1937 (Austin et Austin, 2007), le désaccord sur sa taxonomie s'est poursuivi lorsqu'il a été provisoirement placé dans la liste du genre *Flexibacter* (Leadbetter et Order, 1974 ; Bernardet et Grimont, 1989). De vastes études moléculaires et phylogénétiques ont placé la bactérie dans le genre *Flavobacterium* comme *F. columnare*, où il est resté jusqu'à aujourd'hui et qui est reconnu comme l'agent étiologique de la maladie de Columnaris (Bernardet et al., 1996).

Une autre bactérie à pigment jaune a également une longue histoire en association avec les maladies des poissons d'eau douce. Davis (1926, 1927) signala de multiples épidémies chez des ombles de fontaine et des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) élevées dans le Vermont et à New York, qu'il attribuait à une bactérie inconnue qui était associée à causé la maladie. Il a noté une lente mortalité chronique qui augmentait avec le temps, lorsque les températures commençaient à monter. Davis (1926) a noté que les bactéries formaient une "croissance luxuriante à la surface des branchies" qui coïncidait avec une augmentation de la production de mucus, la maturation des lamelles des branchies et la prolifération de l'épithélium provoquant la fusion des lamelles secondaires. Sinon, la vie était normale jusqu'à la mort. D'autres chercheurs ont observé des épidémies similaires et des bactéries pigmentées jaunes isolées chez des poissons atteints, mais elles étaient incapables de reproduire la maladie à titre expérimental (Rucker et al., 1949 ; Rucker et al., 1952 ; Bullock, 1972). Wakabayashi (1980) a réussi à récupérer une bactérie à pigmentation jaune chez des salmonidés d'élevage en écloserie originaires du Japon et de l'Oregon qui était différente de celles utilisées dans les études susmentionnées de Rucker et de Bullock et à reproduire la maladie avec succès. Cette bactérie a été classée dans la catégorie *Flavobacterium branchiophila* (Wakabayashi et al., 1989) devenue par la suite *F. Branchiophilum* (Bernardet et al., 1996). Il est maintenant largement admis que *F. branchiophilum* est un agent causal de la maladie bactérienne des branchies BGD (Bullock, 1990). Cependant, on pense que les

paramètres environnementaux et d'autres bactéries jouent également un rôle dans certaines épidémies de BGD.

Une troisième bactérie à pigmentation jaune non identifiée a été associée à une maladie grave chez les alevins de truite arc-en-ciel (*O. mykiss*) élevés dans une éclosérie nationale à Leetown, en Virginie occidentale (Davis, 1946). Bien que Davis n'ait pas pu isoler cette bactérie, il a observé un nombre considérable de bâtonnets bactériens non mobiles dans des raclures prélevées sur des ulcérations profondes présentes sur le pédoncule caudal des poissons touchés. Ces bactéries ne forment pas les «colonnes» caractéristiques associées à *F. columnare*. Peu de temps après, Borg (1948) a signalé un état pathologique similaire chez les alevins du saumon coho (*O. kisutch*) élevés en éclosérie en provenance de Washington. Dans ce cas, une bactérie a été isolée avec succès des reins et de lésions externes de poissons systématiquement infectés. Borg (1948, 1960) a reproduit la maladie chez des poissons soumis à des épreuves expérimentales, avec des signes incluant des ulcérations au pédoncule caudal qui étaient si profondes qu'elles détachaient presque la queue du corps. Bien que cette bactérie ait été initialement placée dans l'ordre Myxobactérales et appelée *Cytophaga psychrophila* (Borg, 1960 ; Pacha, 1968), elle a été reclassée comme étant *Flexibacter psychrophilus* (Bernardet et Grimont, 1986) et plus tard *Flavobacterium psychrophilum* (Bernardet et al., 1996). Comme son nom l'indique, *F. psychrophilum* pousse mieux à des températures basses (15°C) et provoque souvent des maladies lorsque la température de l'eau est inférieure à 10°C. En Amérique du Nord, les termes maladie à basse température (Borg, 1960) et maladie bactérienne due à l'eau froide (Holt, 1987) sont utilisés pour décrire les épidémies associées à cette bactérie, alors que les épidémies en Europe sont communément appelées syndrome des alevins de truite arc-en-ciel (Lorenzen et al., 1991- 1997) à partir de l'histoire susmentionnée des flavobactéries pathogènes des poissons, leur taxonomie a été presque totale. La littérature sur la santé des poissons regorge des rapports sur les maladies des poissons associées à des bactéries à pigmentation jaune non identifiées ou partiellement caractérisées, appelées *Cytophaga spp.* et des bactéries apparentées à *Flexibacter spp.*, des espèces apparentées à *Flavobacterium* et "myxobacteria" (Wood, 1968 ; Bullock et McLaughlin, 1970 ; Lien, 1988 ; Kent et al., 1988 ; Starliper, 1992 ; Pepin et al., 1993 ; Frelie et al., 1994 ; Austin et Austin, 2007), beaucoup d'entre eux appartiennent maintenant à la famille des flavobactéries.

c. Famille Flavobacteriaceae

La famille Flavobacteriaceae (Phylum Bacteroidetes ; Classe Flavobacteriia ; Order Flavobacteriales) (Bernardet et Bowman, 2011) a été proposée pour la première fois par Jooste (1985). Bien que mentionné par Reichenbach (1989), la famille n'a été validée qu'en 1992 par Reichenbach et sa description officielle publiée par Bernardet et al. (1996). À ce moment-là, le genre *Flavobacterium* (Bernardet et al., 1996) faisait partie de la famille Flavobacteriaceae et des genres *Chryseobacterium* (Holmes et al., 1984 ; Vandamme et al., 1994), *Bergeyella* (Vandamme et al., 1994), *Empedobacter* (Holmes et al., 1978 ; Vandamme et al., 1994), *Capnocytophaga* (Holt, 1987 ; Vandamme et al., 1994), *Ornithobacterium* (Vandamme et al., 1994), et *Riemerella* (Segers et al., 1993 ; Vancanneyt et al., 1999), ainsi que les espèces qui comprendraient éventuellement les genres *Myroides* (Holmes et al., 1977 ; Vancanneyt et al., 1996) et *Tenacibaculum* (Suzukiet al., 2001). Bernardet et al. (2002) ont publié des normes minimales pour la description de nouveaux taxons appartenant à la famille des Flavobacteriaceae, qui, outre les genres mentionnés ci-dessus, comprenaient également *Coenonia* (Vandamme et al., 1999), *Psychroserpens* et *Gelidibacter* (Bowman et al., 1997), *Polaribacter* (Gosink et al., 1998), *Psychroflexus* (Bowman et al., 1998), *Salegentibacter* (McCammon & Bowman, 2000), *Cellulophaga* (Johansen et al., 1999) et *Zobellia* (Barbeyron et al., 2001), ainsi que deux taxons génétiquement mal classés (Bernardet et al., 2002). Au cours des quinze dernières années, la famille s'est rapidement étendue de moins 20 genres à plus 100 genres décrits (Bernardet, 2011 ; Kim et al., 2011). Selon Bernardet (2011), les caractéristiques de cette famille sont les suivantes : verges filamenteuses courtes et longues ne formant pas de pores qui se colorent à Gram négatif, sont mobiles par glissement ou non, et ne sont pas flagellés, à de rares exceptions près (par exemple *Polaribacter irgensii*) (Gosink et al., 1998). La forme des colonies peut varier de ronde et convexe à rhizoïde et plat et peut fortement adhérer à la surface de la gélose (*F. Columnare*). Certaines n'ont pas de coloration, mais la plupart contiennent un pigment jaunâtre à orange non diffusible du fait de la présence de caroténoïdes et / ou de flexirubine. La croissance est généralement aérobie, mais certains genres présentent une croissance micro-aérophile à anaérobie. Les nitrates ne sont généralement pas réduits, tandis que les activités oxydase et catalase sont courantes. La plupart des genres contiennent des espèces qui dégradent les substrats organiques, y compris les protéines (par exemple la caséine, la gélatine), les glucides simples et complexes (par exemple l'amidon, l'esculine, la pectine, la chitine, la carboxyméthyl et la cellulose) et les lipides (par exemple le Tween). De nombreuses espèces sont halophiles et mésophiles, tandis

que d'autres sont halotolères et psychrophiles. Les hydroxyacides gras en C15 à C17, saturés, mono-insaturés et ramifiés sont fréquemment présents en grande quantité. Le terme flavobactérie sera utilisé tout au long de cette étude bibliographique pour englober les membres pathogènes de la famille des Flavobacteriaceae.

Habitats de la famille des Flavobacteriaceae

Les flavobactéries résident généralement dans des habitats extrêmement divers, allant des environnements aquatiques frais et marins, des sols, des aliments, des boissons, ainsi que des hôpitaux humains et vétérinaires (Bernardet et Nagakawa, 2006). De nombreuses flavobactéries sont pathogènes pour de nombreux organismes, y compris les plantes (Bernardet et Bowman, 2006), les invertébrés (Li et al., 2010), les amphibiens (Xie et al., 2009), les reptiles (Hernandez-Divers et al., 2009), les oiseaux (Segers et al., 1993), les mammifères (Haburjak et Schubert, 1997) et les humains (Benedetti et al., 2011).

d. Genre *Flavobacterium*

Le genre *Flavobacterium* a été décrit pour la première fois par Bergey et al. (1923). Il était alors composé de 46 espèces comprenant des bactéries Gram-négatif, Gram positif, variables de Gram et des bactéries flagellées (McMeekin et Shewan, 1978). Lors de la publication de la huitième édition du Manuel de Bergey en 1974, la majorité des souches flagellées et positives ont été systématiquement éliminées, ne laissant que 12 espèces dans le genre (McMeekin et Shewan, 1978). Ce bouleversement taxonomique s'est poursuivi, il ne restait que 7 espèces en 1984 (Holmes et al., 1984). Ensuite, les travaux approfondis publiés par Bernardet et al. (1996) ont abouti à l'espèce type *Flavobacterium aquatile* comme étant le seul membre original à être retenu dans le genre *Flavobacterium*. Autres espèces assimilées dans le genre *Flavobacterium* à cette époque-là inclus *F. psychrophilum*, *F. branchiophilum*, *F. columnare*, *F. hydatis*, *F. succinicans*, *F. johnsoniae*, *F. flevense*, *F. pectinovorum* et *F. saccharophilum* (Bernardet et al., 1996). Une grande partie de la taxonomie a été réglée, des normes minimales pour la description des nouvelles flavobactéries ont été publiées (Bernardet et al., 2002), date à laquelle le nombre de *Flavobacterium spp.* était de 15 espèces.

De 2002 à 2006, 11 autres espèces de *Flavobacterium* ont été décrites (Bernardet & Bowman, 2006), ce qui porte le total à 26 et ce nombre s'est rapidement étendue à plus de 100 espèces publiées. (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon> ; Kim et al., 2011).

Les bactéries du genre *Flavobacterium* sont des bâtonnets Gram négatif dont le diamètre varie entre 0,3 et 0,5 µm et de 1 à 40 µm de longueur. Toutes les espèces sont non mobiles ou

mobiles par glissement (la présence de flagelles n'a pas été signalée). Il convient de noter que le degré de glissement des flavobactéries est optimal dans les milieux peu nutritifs et très humides. Les colonies contiennent des pigments de type flexirubine et/ou caroténoïdes non diffusibles, non fluorescents, leur donnant une apparence jaune pâle à jaune vif. La croissance optimale se produit entre 20 et 30°C pour la plupart des espèces, bien que la croissance soit meilleure entre 15 et 20°C pour les espèces les plus psychrophiles. La majorité des *Flavobacterium spp.* se développent sur des géloses nutritives et trypticase de soja (TSA) sans avoir besoin de facteurs de croissance. Cependant, les espèces pathogènes dominantes des poissons (*F. psychrophilum*, *F. columnare* et *F. branchiophilum*) ne sont pas capables de croître sur TSA sans ajout de facteurs de croissance. Certaines espèces sont capables d'oxyder les glucides, mais une forte activité protéolytique est presque toujours présente.

Les bactéries *Flavobacterium spp.* varient dans la facilité avec laquelle ils sont cultivés sur des milieux microbiologiques. Par exemple, bon nombre des espèces qui vivent dans le sol et l'eau douce se développent facilement sur des plaques en agar fabriquées à partir de milieux disponibles dans le commerce (gélose nutritive et TSA), comme c'est également le cas pour les espèces marines (gélose marine) (Bernardet et Bowman, 2006). Cependant, une partie des espèces pathogènes des poissons d'eau douce est fastidieuse et nécessite des milieux de culture spécialisés, tels que le cytophaga agar (Anacker et Ordal, 1955), le milieu de Shieh (Shieh, 1980), le milieu Hsu-Shotts (Shotts et al., 1985) et le milieu à base de sels d'extrait de levure tryptone (TYES) (Holt, 1987), pour en nommer quelques-uns. Certains de ces milieux et de leurs dérivés ont été rendus plus sélectifs en incorporant de la polymyxine B, de la néomycine, de la tobramycine et/ou de la vancomycine pour éviter la prolifération excessive de bactéries moins fastidieuses pouvant également être présentes dans un inoculum, en particulier à partir de lésions externes du poisson. Les températures d'incubation optimales varient considérablement et dépendent des espèces, mais la plupart des espèces pathogènes pour les poissons ont une température comprise entre 15 et 25°C (Bernardet et Bowman, 2006). Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques qui permettent de différencier *Flavobacterium* des autres genres de la famille des Flavobacteriaceae ont été examinées de manière approfondie par Bernardet (2011), et les caractères différentiels parmi *Flavobacterium spp.* sont présentés dans le travail de Bernardet et Bowman (2011). Outre la culture bactérienne et son identification ultérieure au moyen de tests phénotypiques (Austin et Austin, 2007), de nombreux autres moyens de détection et d'identification ont été développés. L'agglutination de cellules entières (Pacha, 1968 ; Morrison et al., 1981), les tests de détection d'anticorps fluorescents FAT (Panangalal et al., 2006 ; Lindstrom et al., 2009), les

tests d'immunosorbants (MacPhee et al., 1995 ; Lindstrom et al., 2009), l'hybridation in situ (Liu et al., 2001), l'amplification isothermique à boucle induite (LAMP) (Yeh et al., 2006 ; Fujiwara-Nagata et Eguchi, 2009), la réaction en chaîne polymère-PCR (Toyama et al., 1994 ; Toyama et al., 1996 ; Bader et Shotts, 1998 ; Triyanto et Wakabayashi, 1999 ; Wiklund et al., 2000 ; Bader et al., 2003 ; Crumlish et al., 2007), la séparation immunomagnétique en conjonction avec la cytométrie en flux (Hibi et al., 2008), la PCR quantitative (Orioux et al., 2011 ; Marancik et Wiens, 2013) et le dosage multiplex basé sur un réseau d'ADN (Lievens et al., 2011) sont utilisés pour détecter et identifier *F. psychrophilum*, *F. columnare* et *F. branchiophilum*. Toutefois, il existe peu de méthodes de diagnostic spécifiques aux flavobactéries moins connues associées au poisson, ce qui rend leur identification plus difficile et laborieuse.

e. Ecologie de *Flavobacterium* spp.

Bien que généralement considérées comme psychrophiles ou psychrotolérantes, certaines flavobactéries peuvent également se développer à des températures de 37°C (*F. granuli*, *F. columnare*, *F. suncheonse* et *F. succinicans*), ou même entre 40 et 45°C (*F. défluvi*, *F. indicum*, *F. croceum*) (Bernardet et Bowman, 2011). Cependant, la grande majorité d'entre elles sont récupérées dans des habitats froids ou même polaires (Bernardet et Bowman, 2011). *Flavobacterium* spp. réside dans des habitats divers, y compris des cours d'eau douce, des lacs et des sédiments (Qu et al., 2009), des puits profonds, des glaciers et des glaces arctiques (Xu et al., 2011), des plantes et du matériel végétal (Kim et al., 2011 ; Liu et al., 2011), des sols (Lim et al., 2011), des étangs de crevette d'eau douce (Sheu et al., 2011), des sédiments marins (Fu et al., 2011), de l'eau de mer (Yoon et al., 2011), des systèmes de traitement des eaux usées (Ryu et al., 2008 ; Zhang et al., 2010), des algues marines (Miyashita et al., 2010) et même dans les climatiseurs (Bernardet et Bowman, 2006).

Flavobacterium spp. ont également été détectées dans les amibes (Horn et al., 2001) et dans les entrailles des vers de terre *Aporrectodea caliginosa* (Horn et al., 2005), des papillons (Xiang et al., 2006), des moustiques (Campbell et al., 1951), des nématodes (Park et al., 2011), des sangsues (Schulz et Faisal, 2010) et en association avec des coraux (Kannapiran et al., 2012), des éponges marines (Imhoff & Stohr, 2003) et des mammifères marins, tels que les baleines à bec *Ziphius cavirostris* (Vela et al., 2007). Il convient de faire preuve de prudence lorsqu'on se réfère à la littérature primaire documentant *Flavobacterium* spp., de nombreux autres animaux, y compris les humains, car de nombreux taxons appartenant initialement au genre *Flavobacterium* ont ensuite été transférés vers d'autres genres, comme le

cas du *Flavobacterium breve*, maintenant nommé *Empedobacter brevis*, (Vandamme et al., 1994); *Flavobacterium meningosepticum*, maintenant nommé *Elizabethkingia meningoseptica*, (Kim et al., 2005). De loin, les rapports les plus nombreux sur *Flavobacterium spp.* chez les animaux sont ceux qui documentent leur présence sur des produits à base de poissons. Par exemple, *Flavobacterium spp.* ont été détectées dans les intestins (Huber et al., 2004 ; Hu et al., 2007), sur les branchies (Farkas, 1985), les nageoires (Anderson et Ordal, 1961), dans le mucus (Bernardet et Bowman, 2006), à partir d'œufs (Brown et al., 1997) et de fluides de l'appareil reproducteur (Rangdale et al., 1996), ainsi qu'à partir des organes internes des poissons d'eau froide et poissons d'eau chaude (Shotts et Starliper, 1999 ; Bernardet et Bowman, 2006, et Austin et Austin, 2007). Bien que certaines *Flavobacterium spp.* sont commensaux (Shewan, 1961 ; Pacha, 1968 ; Trust, 1975), dont certain nombre d'entre eux sont des pathogènes majeurs des poissons d'eau douce et marins.

f. *Flavobacterium spp.* agents pathogènes des poissons

Depuis le rapport initial de Davis (1922), de nombreux membres du genre *Flavobacterium* ont été reconnus comme des agents pathogènes sérieux des poissons dans le monde entier; à savoir, *F. columnare*, (Davis, 1922 ; Ordal et Rucker, 1944 ; Bullock et al., 1986) ; *F. psychrophilum* (Davis, 1946 ; Wood, 1968 ; Lorenzen et al., 1991, 1997 ; Starliper, 2011); et *F. branchiophilum* (Wakabayashi 1980 ; Wakabayashi et al., 1989 ; Bullock 1990). Des revues approfondies sur *Flavobacterium spp.* ont mis en évidence la prédominance de *F. psychrophilum*, *F. columnare*, et *F. branchiophilum* sur la santé des poissons (Shotts et Starliper, 1999 ; Bernardet et Bowman, 2006 ; Austin et Austin, 2007). Ces mêmes auteurs ont décrit l'impact que le "bigthree" (poisson pathogène) *Flavobacterium spp.* peut avoir sur les stocks de poissons dans le monde entier et des publications supplémentaires ont fourni encore plus de profondeur concernant les impacts de *F. psychrophilum* (Holt, 1987 ; Nematollahi et al., 2003 ; Starliper, 2011 ; Barnes et Brown, 2011), *F. columnare* (Amend, 1983 ; Bullock et al., 1986 ; Kunttu, 2010 ; Eissa et al., 2010) et *F. branchiophilum* (Snieszko, 1981 ; Wakabayashi et al., 1989 ; Bullock, 1990 ; Ferguson et al., 1991 ; Ostland et al., 1994 ; Good et al., 2008). Alors que l'importance de ces trois espèces comme des agents étiologiques des maladies des poissons est indéniable. Le reste de la synthèse bibliographique sera axé sur les flavobactéries «moins connues» associées au poisson d'eau douce, avant d'entamer en particulier les espèces connues.

✚ Epidémiologie liée aux *Flavobactéries* et réservoirs

Autres *Flavobacterium spp.* telles *F. johnsoniae* qui est parfois associé à des maladies chez les poissons. Christensen (1977) a mentionné pour la première fois *F. johnsoniae* en association avec des poissons malades, suivi du rapport de Carson et al. (1995) sur *F. johnsoniae* causant des lésions ulcéreuses peu profondes sur la peau, les nageoires et la mâchoire des juvéniles aquaculés de Barramundi (*Lates calcarifer*) en Australie. Pour tenter de satisfaire les postulats de Koch, Soltani et al. (1994) ont utilisé un isolat de *F. johnsoniae* de l'épidémie de la maladie chez les barramundis et ont mis au défi divers poissons par l'exposition au bain. Les juvéniles barramundi n'étaient que les espèces étudiées susceptibles d'être infectées par *F. johnsoniae* et des infections ne se sont produites que lorsque les poissons ont été soumis à une contrainte thermique (Soltani et al., 1994). Rintamaki-Kinnunen et al. (1997) ont également trouvé une bactérie ressemblant à *F. johnsoniae* associée à des lésions externes sur les branchies, les mâchoires, la peau et les nageoires chez de nombreux salmonidés aquaculés en Finlande. Plus récemment, des isolats apparentés à *F. johnsoniae* ont été associés à des maladies chez des anguilles à long bec (*Anguilla mossambica*), des truites arc-en-ciel et des carpes (*C. carpio*) cultivés en Afrique du Sud (Flemming et al., 2007), chez des esturgeons (*Acipenser gueldenstaedtii*) cultivés en Turquie (Karatas et al., 2010) et dans des filières à plumes en Corée (Suebsing et Kim, 2012). Une autre *Flavobacterium spp.* impliqué comme agent putatif de la maladie du poisson est *F. hydatis* anciennement appelé *Cytophaga aquatilis* (Strohl et Tait, 1978 ; Bernardet et al., 1996). Cette bactérie a été isolée pour la première fois dans les branchies de salmonidés agités présentant «des signes de maladie bactérienne des branchies» au Michigan par Strohl et Tait (1978), mais sa pathogénicité n'a pas été évaluée. D'autres ont récupéré une bactérie similaire des branchies de poissons atteints d'épizootie de maladie bactérienne des branchies. (Austin et Austin, 2007 ; Bernardet et Bowman, 2006) suggérant ainsi un rôle de poisson pathogène opportuniste. De même, les *F. succinicans* ont été initialement isolés de l'eau et de la nageoire caudale érodée d'un saumon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) et d'une lésion sur un saumon chinook adulte recueilli auprès du barrage de Brownlee sur le Snake River (Anderson et Ordal, 1961). Cependant, ces auteurs ont suggéré que cette bactérie n'était pas un agent pathogène du poisson, mais plutôt un virus commensal.

Très récemment, de nouvelles *Flavobacterium spp.* ont été isolées de poissons malades en Amérique du Sud, en Europe et en Amérique du Nord. *Flavobacterium chilense* était, à

l'origine, récupérée d'une lésion externe d'une truite arc-en-ciel d'élevage en culture mélangée avec *F. psychrophilum*, tandis que *F. araucanum* a été retrouvée dans les reins et dans des lésions externes de saumon d'Atlantique (*Salmo salar*) d'élevage dans une culture mixte avec *F. psychrophilum* (Kampfer et al., 2012), tous deux cultivées au Chili. Les isolements originaux de *F. oncorhynchitook* en Espagne, où la bactérie a été récupérée dans le foie et les branchies de truites arc-en-ciel d'élevage et présentant des signes évocateurs d'une infection à *F. psychrophilum* (Zamora et al., 2012). De même, *F. plurextorum* a été initialement retrouvée dans les foies et les œufs de truites à tête perdue d'élevage en Espagne, atteints de septicémie (Zamora et al., 2013), tandis que *F. tructae* et *F. piscis* ont été retrouvées dans le foie et les branchies, ainsi que dans les reins et les branchies de truites arc-en-ciel malades cultivées en Espagne (Zamora et al., 2014). Trois autres espèces *F. collinsii*, *F. branchiarum* et *F. branchicola* ont également été retrouvées chez des truites arc-en-ciel d'élevage en Espagne en 2008, bien qu'aucun signe de maladie n'ait été signalé par Zamora et al. (2013). En Amérique du Nord, *F. spartansii* a été retrouvée dans les reins de saumons quinnats, ainsi que dans les branchies de saumons quinnats élevés en éclos, dans le bassin du Grand Lac (Loch et Faisal, 2013).

En plus des *Flavobacterium spp.* Associées aux poissons susmentionnés, d'autres *Flavobacterium spp.* partiellement caractérisées et/ou non identifiées ont été signalées périodiquement à partir de poissons malades. En fait, dans leur revue, Shotts et Starliper (1999) ont mentionné brièvement «d'autres organismes apparentés à *Flavobacterium* mal définis» qui ont été impliqués comme agents pathogènes du poisson, alors qu'une déclaration similaire implique des bactéries partiellement caractérisées, à pigmentation jaune, comme agents causaux des maladies chez les poissons (Austin et Austin, 2007). Holliman et al. (1991) ont découvert une bactérie qui possédait les caractères de «bactéries ressemblant à *Cytophaga*» qui étaient distincts de *F. aquatile*, *F. psychrophilum* et *F. columnare* et ont indiqué que cette bactérie n'avait jamais été signalée auparavant en association avec une maladie des poissons. En outre, les auteurs ont confirmé la pathogénicité par voie de transmission par immersion, par voie intrapéritonéale et par voie intramusculaire chez la truite arc-en-ciel et le saumon Atlantique. De même, Bowman et Nowak (2004) ont détecté *Flavobacterium spp.* au niveau des branchies de Saumon atlantique en filet en Tasmanie, souffrant simultanément de la maladie amibienne. Leur isolat était très semblable à *F. frigidarium* selon les séquences d'ADNr 16S.

Ce n'était pas clair cependant, quel rôle cette bactérie avait-elle joué dans le processus de la maladie? En effet, un certain nombre de 'bactéries ressemblant à *Cytophaga* non identifiées

ont également été rapportées en association avec des épidémies de maladies chez les poissons de mer (Kent et al., 1988 ; Pepin et al., 1993 ; Frelief et al., 1994).

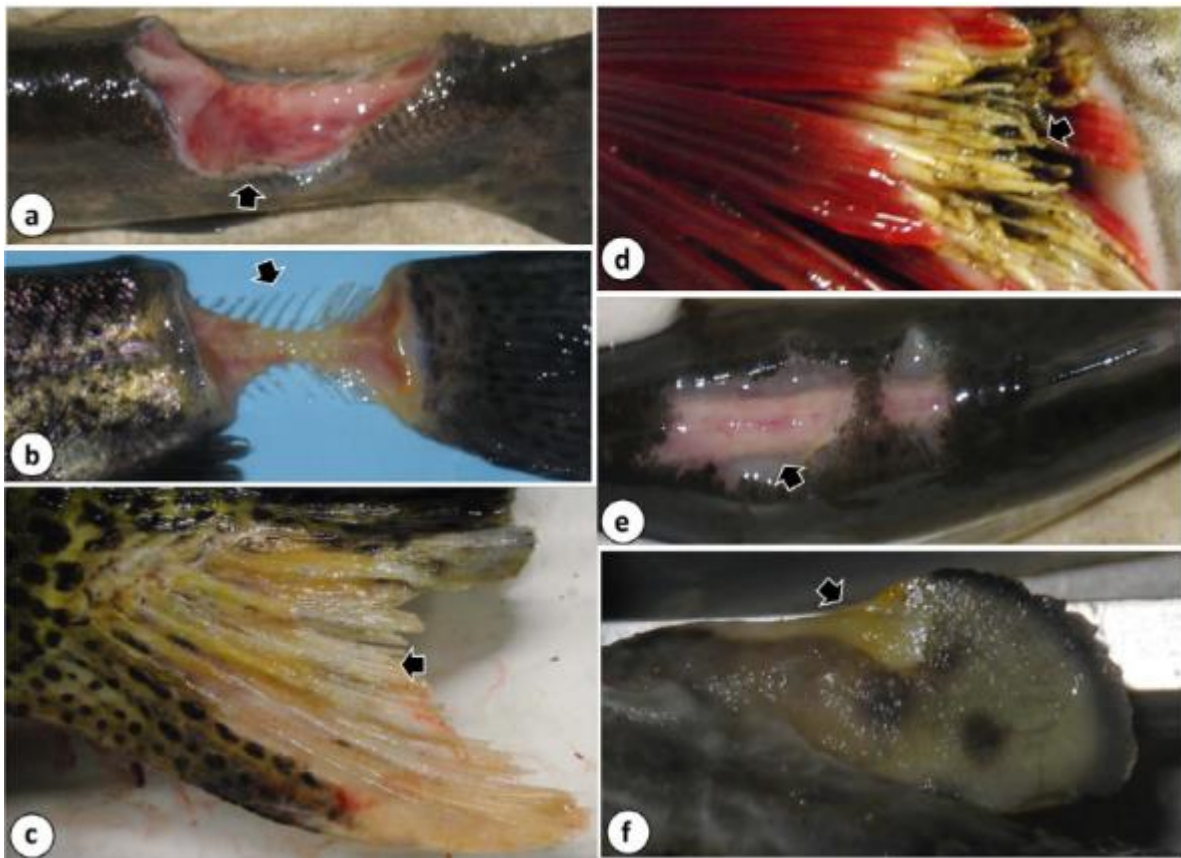


Figure 2 : Photos montrant la pathologie générale chez les poissons du grand lac infectés par des flavobactéries.

(a) ulcération musculaire profonde et hémorragie concomitante (flèche) du pédoncule caudal chez une truite arc-en-ciel infectée par *F. psychrophilum*, (b) ulcération du pédoncule caudal associée à *F. psychrophilum*. la colonne vertébrale (flèche) est complètement exposée. Notez également la décoloration jaunâtre de la lésion due à la bactérie à pigment jaune, (c) une érosion et une nécrose étendues (flèche) de la nageoire anale d'un saumon quinnat (*O. tshawytscha*) infecté par *F. columnare*. Notez également la coloration jaunâtre de la lésion due à la présence de la bactérie à pigment jaune, (d) une nécrose grave des lamelles branchiales (flèche), accompagnée également d'une coloration jaunâtre, d'un saumon quinnat à partir duquel *F. columnare* a été récupérée, (e) ulcération multifocale (flèche) et hémorragie sur le dos de la truite arc-en-ciel infectée par un *Flavobacterium* spp. précédemment caractérisée par une anomalie (coloration jaunâtre à droite de la flèche), qui s'accompagne d'une décoloration jaunâtre chez un saumon quinnat infecté par une espèce de bactérie flavobactérienne non caractérisée.



Figure 3: Photos montrant la pathologie générale chez les poissons ayant fait l'objet de tests expérimentaux avec *Flavobacterium spp.* isolats qui ont été récupérés à l'origine chez les poissons du Grand Lac.

(a) exophtalmie unilatérale sévère avec hémorragie pédiculaire diffuse *flavobacterium spp.* chez l'omble de fontaine infecté (b) le rein pâle, tacheté, hémorragique et œdémateux de *flavobacterium spp.*

VI. Etude comparative des deux agents pathogènes *F. psychrophilum* et *F. columnare*

Généralement, *F. psychrophilum*, *F. columnare* et *F. branchiophilum* sont les trois espèces les plus étudiées affectant les poissons d'eau douce et causant des pertes économiques. Toutefois, *F. branchiophilum* ne présente son agressivité qu'au-delà de 20°C. Les deux autres espèces *F. psychrophilum* et *F. columnare* montrent, en revanche, leur pathogénicité élevée à des températures plus faibles ne dépassant pas 15°C. Pour ces deux dernières espèces, une distribution généralisée est rapportée, avec une dominance de *F. psychrophilum* associée à des élevages intensifs en salmoniculture (Nematollahi et al., 2003 ; Bernardet et Bowman, 2006) et une dominance de *F. columnare* dans la pisciculture en chaîne (Loch et Faisal, 2013).

Le manque d'informations moléculaires et génétiques sur l'espèce causant la maladie dans la ferme piscicole Ain Aghbal nous a poussé à traiter et comparer les deux espèces *F. psychrophilum* et *F. columnare*.

Il faut toutefois mentionner que lors de notre travail, nous avons réalisé des analyses moléculaires sur 48 échantillons des isolats au CNRST, Rabat. Mais les résultats ont montré une contamination de nos échantillons par des bactéries humaines due probablement à une contamination des appareils d'analyse.

1. Analyse moléculaire du génome

De gros efforts ont été déployés pour démêler les bases génétiques de *F. psychrophilum* et de *F. columnare*, où les génomes ainsi que leurs parties ont été analysés par différentes techniques.

a. *Flavobacterium psychrophilum*

Le typage de séquence multilocus (MLST) est une technique importante pour évaluer les différences génétiques entre Isolats de *F. psychrophilum*. Des analyses successives ont été réalisées sur un certain nombre d'isolats provenant de souches isolées de nombreux pays (Siekoula-Nguedia et al., 2012 ; Fujiwara-Nagata et al., 2012 ; Strepparava et al., 2013 ; Nilsen et al., 2014 ; Apablaza et al., 2015 ; Van Vliet, 2016). Certains des complexes clonaux (CC) ont été découverts dans le monde entier alors que d'autres ont été limités à une origine géographique spécifique. De plus, en Amérique du nord, un lien clair entre CC et espèces de poisson était suggéré. En outre, des enquêtes sur ces pays nord-américains ont révélé que la majorité des types de séquence identifiés (ST) ont infecté une seule espèce hôte (Van Vliet et al., 2016). Collectivement, ces investigations ont permis d'identifier une grande diversité d'isolats. Un similaire résultat a également été découvert par d'autres génotypages et techniques de sérotypage dans des isolats du Royaume-Uni (Ngo et al., 2017).

Une autre approche pour mieux comprendre le fond génétique des mécanismes impliqués dans la virulence, la transmission, la pathologie, les sérotypes et l'expression des protéines est le séquençage du génome complet. Récemment, de telles analyses ont été effectuées sur différents isolats de différentes espèces et origines géographiques (Shimizu et al., 2016 ; Neiger et al., 2016 ; Rochat et al., 2017(a,b) ; Imajoh et al., 2017). Encore une fois, une grande variété au sein du génome était trouvée entre différents isolats et une spécificité d'hôte claire de différents isolats étaient évidents (Rochat et al., 2017a). En outre, pour compléter les analyses de séquence génomique et les méthodes de sérotypage ont mis en évidence une association entre le sérotype PCR et l'espèce hôte (Rochat et al., 2017b).

b. *Flavobacterium columnare*

De même, différentes techniques ont été appliquées pour démêler la composition génétique de *F. columnare*. Basé sur un séquençage partiel du gène ARNr 16S de tous les génomovars connus, un protocole standard de typage des isolats de *F. columnare* par polymorphisme de

longueur des fragments de restriction (RFPL) a été mis au point (LaFrentz et al., 2014). La technique a été optimisée en concevant une nouvelle amorce inverse dégénérée pour l'amplification d'un produit de 1250 pb. du gène ARNr 16S (LaFrentz et al., 2016). L'amplification du gène de l'ARNr 16S et les techniques RFPL qui ont suivi ont montré que, dans le bassin du Grand Lac (Amérique du Nord), l'infection du poisson semble être provoquée par des isolats appartenant à un génomovar particulier, c'est-à-dire génomovar I (Faisal et al., 2017). Ceci a été conclu à partir des analyses d'un sous-ensemble de 34 sur plus de 300 isolats d'une variété d'espèces de poissons différentes. En revanche, Barony et al. (2015) au Brésil, ont montré que les isolats de *F. columnare* prélevés chez la même espèce de poisson appartenaient à différents génomovars.

Par des moyens de PCR extragénique palindromique répétitive (REP-PCR), les mêmes auteurs ont également démontré une grande diversité intragénomovar. Une diversité similaire d'isolats appartenant au même génomovar et à la même région géographique (Idaho, USA) a été enregistrée sur la base d'un fragment amplifié de polymorphisme de longueur (AFLP) (Evenhuis et al., 2016). Un séquençage complet du gène a été réalisée pour des isolats de *F. columnare* provenant de diverses espèces de poissons et appartenant à différents génomovars (Tekedar et al., 2012 ; Bartelme et al., 2016 ; Kumru et al., 2016, 2017 ; Evenhuis et al., 2017). Les isolats appartenant à différents génomovars ont révélé des différences génétiques nettes (Kayansamruaj et al., 2017) mais des similitudes fonctionnelles (Kumru et al., 2017). Les chercheurs ont tentés de reconsidérer l'affiliation de certains isolats et suggérer que certains d'entre eux pourraient appartenir à un nouveau taxa ou sous-taxa du genre *Flavobacterium* à cause de leur degré de diversité (Kayansamruaj et al., 2017). Les analyses de séquence ont permis d'identifier des régions codant pour des protéines et de prédire leurs fonctions (Tekedar et al., 2017), bien que les fonctions de nombreuses protéines restent encore à déterminer (Lawrence et al., 2012). La comparaison des séquences complètes de génomovars et d'autres espèces de *Flavobacterium* suggèrent que les génomovars I et II de *F. columnare* sont plus étroitement liées les unes aux autres que celles de *F. psychrophilum* (Lawrence et al., 2012).

2 Aspects génétiques et pathogénicité / Spécificité de l'hôte

Démêler l'arrière-plan génétique d'un agent pathogène permet une meilleure compréhension et élucidation de la relation entre différents isolats ainsi que des mécanismes impliqués dans la pathogénicité. Pour les deux espèces *F. psychrophilum* et *F. columnare*, des avancées majeures dans ce domaine ont été réalisées au cours des 5 dernières années.

a. *Flavobacterium psychrophilum*

Le pangénome de *F. psychrophilum* a été décrit sur la base de 11 isolats provenant de populations temporellement et spatialement différentes (Chili, Amérique du Nord, Danemark et France) (Castillo et al., 2016). Comme avec chaque nouveau génome, des gènes supplémentaires ont été détectés, les auteurs ont conclu que *F. psychrophilum* possède un pangénome ouvert (Castillo et al., 2016), ce qui indique qu'avec tous les isolats séquencés jusqu'à présent, la diversité est encore loin d'être couverte. Les facteurs de virulence étaient répartis également entre les isolats en correspondance avec des traits phénotypiques tels que la production de biofilm et la sécrétion d'enzymes extracellulaires. À partir de ces résultats, Castillo et al. (2016) ont conclu que les isolats de *F. psychrophilum* avaient des modes similaires d'adhésion, de colonisation et de pathogénicité à travers de grandes espaces spatiaux et temporels.

La gamme géographique dans laquelle *F. psychrophilum* est enregistrée, augmente constamment. À titre d'exemple, l'agent pathogène a été décrit pour la première fois en 2016 à partir d'un élevage de truite arc-en-ciel en Argentine (Moreno et al., 2016) et au Mexique (Castillo et al., 2014). Cependant, ce n'est pas vraiment clair si cela est une véritable propagation de la bactérie ou plus une question de première détection.

La vaccination a montré être une mesure appropriée pour une variété de maladies bactériennes. Cependant, jusqu'à présent, les tentatives contre *F. psychrophilum* n'ont pas encore cédé à la protection complète. L'optimisation de l'effet de la vaccination à l'aide d'une procédure d'immersion atténuée a été obtenue au moment du rappel après 12 semaines de vaccination initiale (Sudheesh et Cain, 2016). Or une souche spécifiquement résistante à la rifampicine produite par passages contre des concentrations croissantes, a montré un degré d'atténuation élevé. Bien qu'un deuxième rappel n'ait pas entraîné de valeurs plus élevées de pourcentage de survie (RPS), Néanmoins, la RPS a été augmentée par une exposition plus longue à l'immersion vaccinale (30 min au lieu de 3 min). L'efficacité de la vaccination a été encore améliorée par l'adoption d'un régime «améliorant la santé» pour poisson (Sudheesh et al., 2015). Hoare et al. (2017) ont pu augmenter de manière significative le RPS chez la truite arc-en-ciel vaccinée par immersion avec un ensemble polyvalent de vaccin cellulaire contenant *F. psychrophilum* inactivé au formol. Les auteurs ont constaté une augmentation des taux d'immunoglobuline T (IgT) dans les organes systémiques. Cependant, il n'était pas clair si l'IgT jouait un rôle fonctionnel dans la protection. Dans ce contexte, la vaccination par

voie orale ne différaient pas significativement avec un vaccin vivant atténué à base d'une souche de *F. psychrophilum* résistante à la rifampicine, il n'y avait pas non plus de différence significative lorsque les cellules bactériennes ont été administrées microencapsulées ou non encapsulées (Ghosh et al., 2016). Nakayama et al. (2017) ont exploré le potentiel de *F. psychrophilum* collagenase comme antigène dans une immersion vaccin pour l'espèce de poisson ayu (*Plecoglossus ltivelis*). Le recombinant de *F. psychrophilum* collagenase a été exprimée dans *Escherichia coli* et *Brevibacillus chosinensis*, et le surnageant de culture *Bacillus. chosinensis* a été utilisé comme solution de vaccin par immersion. Ayu vacciné a été soumis à un défi de bain avec *F. psychrophilum*, et les résultats ont révélé un effet protecteur chez ayu (Nakayama et al., 2017). Kato et al. (2014) ont décrit trois protéines de surface (3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HCD), ATP synthase bêta sous-unité (atpD) et glutamate déshydrogénase (gdhA) comme étant antigènes protecteurs contre *F. psychrophilum* qui ont donc été considérées comme de bons candidats au développement de vaccins contre cet agent pathogène dans ayu. Plant et al. (2014) ont validé une protéine recombinante de la motilité du glissement, *F. psychrophilum*, comme vaccin candidat sans succès. Ceci est en accord avec kim et al. (2010) qui ont détaillé les difficultés rencontrées pour mettre au point un vaccin commercial efficace contre cette même espèce.

b. *Flavobacterium columnare*

Le séquençage complet du génome d'un isolat de *F. columnare* est autorisé pour déterminer une gamme de facteurs de virulence potentiels associés avec différents modes d'action ainsi que des gènes responsables pour une variété de protéases sécrétées (Zhang et al., 2017). Li et al. (2017) ont démontré l'implication potentielle d'un système de sécrétion de type IX (T9SS) dans la sécrétion de protéines et de molécules extracellulaires associées à la motilité par glissement. Les mutants sans noyau composant de T9SS avait perdu la motilité de vol à voile (Le glissement (sorte de "vol à voile"), en tant que forme de motilité, semble permettre les interactions entre les bactéries, la pathogénèse et des comportements sociaux accrus) et étaient nettement moins virulent au poisson zèbre (*Danio rerio*), le poisson-chat (*Ictalurus punctatus*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Li et al., 2017).

Comme décrit pour *F. psychrophilum*, la répartition géographique des isolats de *F. columnare* enregistrés sont aussi en expansion. En 2013, l'agent pathogène a été enregistré pour la première fois dans des élevages de *Catla catla* en Inde (Verma et Rathore, 2013).

Les infections à Flavobactéries étant un problème majeur dans de nombreuses installations d'aquaculture, les méthodes efficaces de prophylaxie et de traitement sont d'une importance

vitale. Les vaccins vivants représentent toujours un danger potentiel de réversion, l'utilisation de cellules fantômes exclut ce potentiel, les cellules utilisées ont expulsé le contenu des cellules cytoplasmiques mais ont toujours l'enveloppe complète représentant l'antigène modèle. L'utilisation de cellules fantômes de *F. columnare* en tant que vaccin a réussi avec 70% comparé à 41,9% pour un vaccin utilisant des bactérie tuée par du formol dans la carpe de roseau vaccinée par voie intrapéritonéale (*Ctenopharyngodon idella*), offrant ainsi une alternative prometteuse aux vaccins à base d'agents pathogènes (Zhu et al., 2012). Des tentatives supplémentaires pour produire un vaccin efficace ont été effectuées par recherche de protéines bactériennes immuno-génitiquement actives (Luo et al., 2016a,b). Dans des expériences de provocation, des vaccins ont procuré un certain degré de protection contre *F. columnare*. Ces vaccins sont à base de la protéines identifiées lipoprotéine de motilité glissante et du précurseur de la protéine d'efflux de la membrane externe (Luo et al., 2016a) ou une recombinaison de différentes protéines a été testé (Zhang et al., 2016).

3 Développement de traitements alternatifs et méthodes prophylactiques : probiotiques, Extraits de plantes, Phages

Développement de la résistance à une grande variété des antimicrobiens utilisés et le manque de vaccins efficaces et enregistrés rendent les méthodes alternatives de traitement des infections à flavobactéries particulièrement souhaitables. Un certain nombre d'enquêtes dans ce domaine ont été effectuées au cours des 5 dernières années.

a. *Flavobacterium psychrophilum*

La désinfection des œufs en pré-durcissement (œufs fécondés avant que le chorion ne devienne rigide en raison de l'exposition à l'eau) avec de la povidone iodée (50 ppm) dans des écloséries de salmonidés au Japon s'est avéré une méthode de prévention prometteuse d'infection des œufs par *F. psychrophilum* (Kumagai, 2016). La supplémentation des diluants utilisés pour la désinfection du sperme de truite arc-en-ciel avec la pénicilline et la streptomycine ont permis de réduire l'infection ultérieure à *F. psychrophilum*, mais certains facteurs comme une fertilisation et une survie des œufs moins élevées nécessitent plus d'enquête (Oplinger et Wagner, 2015). L'utilisation des mêmes antibiotiques ajoutés à 0,5% de NaCl, a réduit de manière significative *F. psychrophilum* à la surface et à l'intérieur des œufs par rapport aux témoins (Oplinger et al., 2015). Aussi, une combinaison des deux antibiotiques et des températures élevées tuent la bactérie dans des conditions de laboratoire (Oplinger et Wagner, 2013).

Cependant, il pourrait exister un écart entre les résultats in vitro et l'efficacité in vivo, comme indiqué pour l'enrofloxacin, la doxycycline et le florfenicol lors du traitement de la truite de l'infection par RTFS (Boyacıoğlu et al., 2015).

Dans les expériences de traitement, le sulfate de cuivre pour le contrôle des infections à *F. psychrophilum* ne se sont pas avérées appropriées car les concentrations requises pour éliminer les bactéries étaient toxiques pour les œufs (Wagner et Oplinger, 2013). Long et al. (2014) ont suggéré que le dépistage des géniteurs soit un outil potentiel pour évaluer les niveaux d'infection par *F. psychrophilum*, qui pourrait devenir un élément important dans la gestion de la maladie. Différentes substances et techniques liées au régime alimentaire ont été testées pour leur effet préventif sur les infections par *F. psychrophilum*. Les hydrolysats de sous-produits de truite, avaient une activité antibactérienne élevée contre *F. psychrophilum* (Wald et al., 2016). Les truites arc-en-ciel nourries d'un régime naturellement contaminé par le déoxynivalénol étaient mieux protégées contre une infection expérimentale à *F. psychrophilum* par rapport aux témoins (Ryerse et al., 2016). De plus, il a été démontré que la consommation alimentaire restreinte avait un effet protecteur pour la truite arc-en-ciel infectée par l'agent pathogène (Ryerse et al., 2016). L'effet d'un vaccin pourrait être amélioré lorsque les poissons sont nourris avec un régime «améliorant la santé» (Sudheesh et al., 2015). L'administration (orale ou intrapéritonéale) d'un probiotique de l'espèce *Enterobacter* était une méthode potentielle pour protéger les alevins contre *F. psychrophilum*, (LaPatra et al., 2014 ; Ghosh et al., 2016). En revanche, la supplémentation prébiotique des régimes avec 30% de tourteau de soja uniquement ont eu un effet minime sur la résistance à la maladie de la truite fardée (*Oncorhynchus clarkii lewisi*) infecté expérimentalement par *F. psychrophilum* par une méthode de cohabitation (Sealey et al., 2015). D'autre part, le traitement probiotique de l'eau d'un réservoir a diminué la population de *F. psychrophilum* dans l'eau lors de l'étude de Boutin et al. (2013).

Un traitement à base de phages contre *F. psychrophilum* a été suggéré (Madsen et al., 2013) et a montré des caractéristiques prometteuses dans des expériences de laboratoire (Christiansen et al., 2016). Une résistance aux phages a été observée, mais les petites populations de clones de bactéries résistants ont réduit la capacité relative à la souche ancestrale sensible (Christiansen et al., 2016 ; Castillo et al., 2015). Il était montré que les phages étaient capables de survivre au passage à l'estomac du poisson, pour pénétrer dans la barrière intestinale et par la suite dans l'appareil circulatoire après administration orale, ce qui signifie que l'administration de phages via des granulés d'aliments enrobés pourrait constituer un traitement potentiel (Christiansen et al., 2014).

b. *Flavobacterium columnare*

En outre, pour prévenir les infections à *F. columnare*, une variété des méthodes et des substances ont été évaluées. Ainsi, la chloramine-T et le traitement au peroxyde d'hydrogène étaient efficaces pour contrôler la mortalité associée à columnaris externe à la basse et Bluegills (Bowker et al., 2014). Un effet positif concernant la survie à columnaris, a été observé chez plusieurs espèces de poissons après l'addition de sulfate de cuivre à l'alimentation (Farmer et al., 2013, 2015, 2017).

L'argile kaolinique ajoutée à l'eau a eu un effet positif sur la survie du poisson-chat du chenal infecté par *F. columnare* (Beck et al., 2015). Le Poisson-chat d'Amérique maintenu dans l'eau avec l'argile kaolinique a été trouvé avec moins de dégâts des branchies que le poisson de contrôle car il semblait que le kaolin réduisait l'adhérence de la bactérie aux branchies (Beck et al., 2015). Straus et al. (2015) ont constaté que la concentration de cations divalents (dureté) dans l'eau affectait la pathogenèse de la maladie de columnaris. D'autre part, les nutriments environnementaux peuvent être des déclencheurs importants de l'expression de virulence des gènes chez *F. columnare* (Penttinen et al., 2016).

Le chitosane a montré des activités antibactériennes et était un candidat prometteur à explorer comme alternative aux antibiotiques (Yildirim-Aksoy & Beck, 2017).

On a découvert que les graines et l'huile de *Nigella sativa* (cumin noir) inhibe la croissance des souches de *F. columnare* en laboratoire, ainsi que pour avoir un effet positif sur la survie du poisson-chat et le poisson zèbre lorsqu'il est ajouté à leur régime alimentaire (Mohammed et Arias, 2016). La carpe herbivore nourrie avec les régimes fournis avec *Ficus carica* étaient plus résistants aux infections à *F. columnare* (Yang et al., 2015). Aussi, ungeremine et ses analogues ont été testés avec succès comme bactéricides contre *F. columnare* (Schrader et al., 2013). Wogonin (un flavone) était efficace in vitro contre *F. columnare* (Tan et al., 2015). La carence en vitamine C dans le régime alimentaire a diminué les barrières physique et immunitaire au niveau des branchies chez la carpe de roseau infectée par *F. columnare* (Xu et al., 2015).

Différents additifs alimentaires prébiotiques ont réduit la susceptibilité à l'infection à Colaris (Zhao et al., 2015). Deux *Pseudomonas fluorescens* isolés de la peau et des intestins de sujets sains (*Sander vitreus*) et utilisés comme probiotiques avaient un effet positif avec une survie améliorée en matière de Maladie de *F. columnare* (Seghouani et al., 2017).

Les phages sont une alternative à la chimiothérapie contre columnaris en aquaculture, comme démontré par des expériences contrôlées de Laanto et al. (2015).

4 Enquêtes sur différentes susceptibilités des souches de poissons et des espèces aux agents pathogènes

a. *Flavobacterium psychrophilum*

Dans la même famille de poissons, des différences de virulence de *F. psychrophilum* ont été notées en fonction de l'espèce de poisson concernée (Wagner et Oplinger, 2014). Sur le défi avec *F. psychrophilum*, des souches sensibles et résistantes de truite arc-en-ciel ont été caractérisées et différenciées par une expression différente des gènes codant pour des protéines particulièrement impliquées dans la réponse immunitaire innée (Paneru et al., 2016). Une enquête sur les isolats récupérés de différentes espèces d'*Oncorhynchus* du Bassin du Grand Lac en Amérique du Nord a révélé une population de *F. psychrophilum* génétiquement hétérogène et une association entre la variation de séquence et les espèces hôtes de poisson (Van Vliet, 2016). Ainsi, qu'une virulence différente pour différents espèces, certaines souches bactériennes étaient spécifiques à la truite arc-en-ciel, Saumon quinnat (*Oncorhynchus tshawytscha*), ou saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*), tandis que d'autres ne présentaient pas de spécificité d'hôte marquée.

Au Chili, des espèces de salmonidés ont été également trouvées comme sensibles aux isolats de *F. psychrophilum*, ces isolats sont hautement pathogènes pour la truite arc-en-ciel mais ils n'ont pas entraîné de mortalité chez le saumon Atlantique (*Salmo salar*) (Fredriksen et al., 2016). Enquêtant sur les isolats du Japon appartenant à quatre génotypes extraits de quatre poissons de différentes familles, un seul génotype présentait une forte pathogénicité pour ayu (*Plecoglossus altivelis*), tandis que les trois autres génotypes n'avaient aucune ou seulement une faible pathogénicité (Fujiwara-Nagata et al., 2012). Dans une étude approfondie sur l'infection à *F. psychrophilum* chez des salmonidés en élevage et des salmonidés sauvages, il a été démontré que les poissons sauvages ont présenté une prévalence nettement supérieure à la bactérie comparée aux poissons d'élevage (Van Vliet et al., 2015).

b. *Flavobacterium columnare*

Les poissons-chats (*Ictalurus punctatus*) spécifiquement élevés pour leur résistance à *Edwardsiella ictaluri* se sont avérés être plus susceptibles à l'infection par *F. columnare* que les poissons qui étaient moins résistants à *E. ictaluri* (LaFrentz et al., 2012). Ceci démontre qu'il n'y a pas nécessairement un point commun de résistance aux bactéries pathogènes. L'étude comparative du bar rayé hybride et du blanc basse (*Morone chrysops*) dans des expériences de défi avec *F. columnare* a révélé une susceptibilité plus élevée d'infection de la

souche hybride, exprimée par un degré plus élevé de lésions des branchies et une diminution du taux de survie (Fuller et al., 2014). Les analyses de l'expression des gènes dans les branchies de poisson-chat entre races sensibles et résistantes a démontré clairement différents modèles d'expression, principalement des gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée et dans la sécrétion de mucus (Peatman et al., 2013).

5 Milieu de détection et de croissance de bactéries

a. *Flavobacterium psychrophilum*

Différentes approches pour identifier *F. psychrophilum* ont été développées, parmi lesquelles la désorption laser assistée par matrice liée à la spectrométrie de masse à temps de vol d'ionisation (MALDI-TOF) MS) (Pérez-Sancho et al., 2017). Selon Fernández-Álvarez et al. (2017), cette méthode permettait de discriminer les sérotypes, alors que dans d'autres laboratoires, cela n'était pas possible. La détermination des sérogroupes est également possible par une PCR multiplexée récemment développée (Rochat et al., 2017b). Les avancées ont également été faites en ce qui concerne la détection de *F. psychrophilum* dans l'eau des rivières afin de se faire une idée de la distribution environnementale de cette espèce (Fujiwara-Nagata et al., 2012). Dans une série d'expériences, Long et al. (2014) ont appliqué les méthodes ELISA et PCR pour détecter *F. psychrophilum* dans les organes, le liquide ovarien et la progéniture de la truite arc-en-ciel et du saumon coho pour étudier le taux de potentiel de transmission verticale. Fait intéressant, la détermination de l'agent pathogène dans le liquide ovarien n'était pas une méthode fiable alors qu'une bonne corrélation entre les bactéries dans les reins des géniteurs (mesuré par ELISA) et le niveau d'infection de la progéniture pourrait être établie. Lors de l'isolement des bactéries du poisson ou de l'environnement, l'adéquation du support de l'isolement joue un rôle crucial. À cet égard, Oplinger et Wagner (2012) ont comparé différents milieux de culture, c'est-à-dire un bouillon standard enrichi d'Anacker-Ordal (EAO) avec différentes suppléments, des sels d'extrait de tryptone et de levure, et extraits de tryptone et de tryptone infusés au maltose. Ils ont trouvé la meilleure croissance en EAO, pour laquelle les suppléments n'améliorent pas le résultat de manière significative. La méthode appliquée est également importante en ce qui concerne les tests de résistance, illustrée par Giesecker et al. (2012) et Miranda et al. (2016) qui ont normalisé et optimisé des méthodes pour déterminer la susceptibilité aux antibiotiques. Miranda et al. (2016) ont considéré que la détermination de la CMI sur EAO est plus précise en raison de la bonne diffusion des antibiotiques sur ce milieu.

b. *Flavobacterium columnare*

Une comparaison de différentes méthodes de détection révèle que la PCR spécifique à l'espèce doit être plus sensible que les méthodes de culture conventionnelles (Patra et al., 2016). Plusieurs adaptations et améliorations des méthodes de détection ont été effectuées. Une seule méthode colorimétrique en tube d'amplification isotherme à médiation par boucle détecte de manière fiable le *F. columnare* dans différents organes de tilapia apparemment en bonne santé avec une sensibilité dix fois plus que la PCR conventionnelle (Suebsing et al., 2012). En optimisant l'amorce inverse d'une méthode de qPCR, il est devenu possible d'amplifier également l'ARNr 16S d'isolats de Thaïlande, ce qui n'était pas possible avant (Lafrentz et al., 2017). Gibbs (2015) a développé et validé un qPCR qui reconnaît *F. columnare* indépendamment du génomovar à la fois dans le tissu de poisson et l'eau de l'étang, respectivement. Des recherches sur les milieux de culture appropriés pour la susceptibilité des tests d'antibiotiques ont également été effectuées pour *F. columnare*. Gao et Gaunt (2016) ont comparé la croissance des différents *F. columnare* isolés sur trois bouillons et trois géloses. En outre, différents ingrédients ont été ajoutés ou soustraits et l'effet sur la croissance bactérienne a été testé. La plus rapide et uniforme croissance a été obtenue avec un milieu "G" nouvellement développé. Gieseke et al. (2012) ont réalisé un essai dans plusieurs laboratoires afin de tester une méthode de micro-dilution en bouillon et l'améliorer (Gieseke et al., 2012).

6 Biologie et maladie

De nouvelles connaissances sur les mécanismes de pathogénicité et de transmission sont importantes pour comprendre la maladie et les facteurs influençant. De nouvelles informations sur ce sujet ont été publiées principalement pour *F. columnare*.

a. *Flavobacterium psychrophilum*

Des tentatives ont été faites pour démêler les mécanismes de la pathogénèse. Dans une expérience *in vitro*, Iturriaga et al. (2017) ont pu démontrer que *F. psychrophilum* induit l'apoptose dans les cellules musculaires par la modulation de la voie de signalisation NF-KB. Dans des expériences d'exposition, des cellules de *F. psychrophilum* de cellules lisses et les colonies rugueuses présentaient un tropisme tissulaire avec le degré le plus élevé pour le tissu de la nageoire, indépendamment du type de colonie (Papadopoulou et al., 2017). Cependant, les bactéries du type colonie lisse ne sont restées que peu de temps sur le tissu hôte. Le mucus cutané favorise la croissance des deux phénotypes de colonies (Papadopoulou et al., 2017). La transmission verticale est toujours en discussion. Une enquête d'œufs de saumon de

l'Atlantique détenus comme géniteurs captifs a montré que l'espèce bactérienne prédominante à la surface est *Pseudomonas fluorescens*. Cependant, de l'intérieur des œufs, différentes concentrations de *F. psychrophilum* pourraient être isolées en fonction de l'origine du poisson (Cipriano, 2015), ce qui indiquerait une infection intraovum, bien qu'il faille garder à l'esprit que les bactéries n'avaient été isolées que d'œufs morts.

b. *Flavobacterium columnare*

La formation de biofilms est un paramètre important pour la pathogénicité d'une bactérie et pour sa formation sur des tissus biotiques (tissu hôte) et les surfaces abiotiques. Le biofilm diminue l'efficacité des antimicrobiens et les mécanismes de défense de l'hôte. Les produits extracellulaires (EPS) contribuent à la formation de biofilms. Par conséquent, les connaissances sur la composition pourraient aider à trouver des mesures contre la production du biofilm. Une enquête sur l'EPS des isolats de *F. columnare* du Brésil a révélé que le monosaccharide prédominant est le glucose (Sebastião et al., 2013). L'amélioration de la production de biofilms a été obtenue en fournissant du L-rhamnose (Lange et al., 2017). Les bactéries cultivées à des concentrations plus élevées de L-rhamnose ont augmenté la mortalité chez le poisson-chat, démontrant encore plus l'importance de la production de biofilm en tant que facteur de virulence. Un autre facteur a été suggéré d'être impliqué dans la virulence est le potentiel d'absorption du fer. Un système d'absorption du fer à médiation sidérophore a été démontré chez *F. columnare* (Guan et al., 2013). L'importance de l'absorption de fer dans la virulence a été corroborée dans une comparaison d'une souche très virulente d'un *F. columnare*, et une souche faiblement virulente, la première ayant une expression plus élevée de gènes impliqués dans l'absorption de fer (Beck et al., 2016). La chondroïtine AC lyase a également fonctionné comme un facteur de virulence. Le fond génétique de ce facteur a été étudié en produisant des mutants dépourvus de gène impliqué dans l'expression de l'enzyme (Pereira, 2012). La virulence d'un mutant déficient en enzyme était quatre fois plus faible chez un poisson zèbre modèle (Conrad, 2013). Le rôle de la chondroïtinase en tant que facteur de virulence a également été confirmé par son expression plus élevée dans la colonie virulente (rugueuse) (Penttinen, 2016). La virulence est également influencée par la quantité de mucus libéré par les poissons, car le mucus a montré soutenir la croissance et la survie de *F. columnare* (Shoemaker et LaFrentz, 2015). Kinnula (2016) a mis en évidence une relation entre la dose d'infection et la charge en nutriments dans l'eau, la co-infection par différents isolats et la virulence chez le poisson-zèbre et la truite arc-en-ciel. Le rôle de la charge en éléments nutritifs a été également montré dans l'eau (Penttinen 2016). Egalement, la dureté de

l'eau semble influencer la virulence de *F. columnare* (Straus et al., 2015). Comme déjà mentionné, le morphotype des colonies joue un rôle important en matière de virulence, dans lequel le type du rhizoïdes est plus virulent que les colonies non rhizoïdes (Dong et al., 2016 ; Laanto et al., 2014). La virulence peut également résulter d'un processus de sélection révélé par Kunttu et al. (2010) qui ont démontré que les isolats des fermes piscicoles étaient plus virulents que les isolats environnementaux non influencés par les activités piscicoles. Cette hypothèse est en partie corroborée par la découverte d'une séquence non existante et de très faible variation de protéines parmi 70 très virulents du génomovar I isolé d'une ferme piscicole de l'Idaho (Evenhuis et al., 2014). La vérification de la virulence et de la pathogénèse des isolats nécessite des modèles de défi appropriés. LaFrentz et al. (2012) ont présenté un modèle de défi pour l'infection de la truite arc-en-ciel, et Declercq et al. (2015) ont développé des modèles de challenge pour la carpe (*Cyprinus carpio*) et la truite arc-en-ciel.

Les autres facteurs qui influencent l'évolution de la maladie à colonne sont les co-infections avec d'autres agents pathogènes. Dans les deux poissons rouges (*Carassius auratus*) infecté par *Dactylogyrus intermedius* (Zhang et al., 2015) et chez des tilapias hybrides (*Oreochromis spp.*) infectés par *Ichthyophthirius multifiliis* (DH et al., 2014), la susceptibilité à *F. columnare* a été améliorée. *F. columnare* est régulièrement montré dans de nouveaux organes ou nouvelles espèces de poisson. À titre d'exemple, une bactérie de type *F. columnare* a été isolée du cerveau du tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) de trois exploitations piscicoles en Thaïlande (Tohmee et Deemagarn, 2014). La majorité des poissons décédés dans l'environnement ont été attribués à *F. columnare*, par exemple: bluegill (*Lepomis macrochirus*), une infection au génomovar II a été décrite pour la première fois par Bullard et al. (2013). Au Canada, la mortalité de la perche (*Perca flavescens*) et le grand corégone (*Coregonus clupeaformis*) était liée à une infection par *F. columnare* et *Aeromonas hydrophila* (Scott et Bollinger, 2014).

7 Méthodes de lutte

a. Mesures préventives

La réduction de la prévalence de l'agent responsable de la flavobactériose des eaux froides en élevage repose sur le respect des conditions sanitaires (désinfection systématique des installations, installation de pédiluves, etc.), la surveillance et le maintien d'une bonne qualité de l'eau (Cipriano et Holt, 2005 ; Madsen et Dalsgaard, 2008). La désinfection des œufs avec des iodophores est souvent répertoriée en tant que mesure préventive contre la flavobactériose

des eaux froides (Taylor, 2004 ; Cipriano et Holt, 2005; Kumagai et Nawata, 2010b). Cependant, *F. psychrophilum* est très tolérante à l'iode, et peut survivre à des traitements d'au moins 100 mg.L⁻¹ d'iode actif pendant 30 minutes (Brown et al., 1997 ; Kumagai et al., 1998 ; Kumagai 2005). Des études récentes ont néanmoins démontré que la charge bactérienne sur les œufs pouvait être réduite grâce à des composés tels que le peroxyde d'hydrogène (Wagner et al., 2010). L'élimination rapide des poissons morts de flavobactériose des eaux froides, qui rejettent d'importantes concentrations en bactérie dans l'eau, est également fortement recommandée (Madetoja et al., 2000).

Le stress engendré par les manipulations répétées, les densités élevées dans les bassins et la présence d'autres pathogènes dans le milieu peuvent influencer sur la sévérité des épizooties en jouant sur le fitness du poisson. Ce sont donc également des paramètres à prendre en compte pour limiter l'impact de la maladie dans les bassins.

Même si d'importants efforts ont été fournis pour la mise au point de vaccins, aucun n'a été, à ce jour, mis sur le marché. Des essais de vaccination par voie orale, balnéation ou injection ont montré des résultats de protection variables. Dans la plupart des essais, les solutions vaccinales ont été élaborées à partir de suspensions de cellules entières de *F. psychrophilum* inactivées au formol (Holt 1987 ; Rahman et al., 2000 ; LaFrentz et al., 2002 ; Kondo et al., 2003 ; Lorenzen et al., 2010) ou à la chaleur (Obach et Baudin Laurencin, 1991). Ces derniers auteurs ont confirmé des résultats antérieurs de Holt (1987) qui montraient que la vaccination par injection offre une protection plus importante que la vaccination par immersion. L'émulsion de la solution vaccinale dans un adjuvant semble être un facteur élicitant l'action protectrice du vaccin (Rahman et al., 2000). Il est intéressant de noter qu'assez récemment, une étude a montré qu'une immersion dans un bain contenant des cellules non-inactivées de *F. psychrophilum* n'entraînait aucune mortalité chez des truites arc-en-ciel et était capable de générer de l'immunité (Lorenzen et al., 2010).

Les travaux de Rahman et al. (2002) ont montré que la fraction antigénique de la membrane externe (outer membrane fraction ou OMF) de *F. psychrophilum* utilisée dans une solution vaccinale engendrait une protection humorale supérieure à celle obtenue avec des cellules entières. Depuis, de nombreuses études ont porté sur l'identification de protéines immunogènes présentes dans l'OMF potentiellement utilisables dans des solutions vaccinales pour le développement de vaccins recombinants (Dumetz et al., 2008 ; LaFrentz et al., 2008 ; LaFrentz et al., 2012). Plusieurs fractions immunogéniques de l'OMF ont été testées, ainsi que les protéines EFTU (facteur d'élongation Tu), SufB (protéine d'assemblage) et l'ATP synthase β . Elles ont été produites in vitro et administrées sans pouvoir montrer de protection

chez les truites arc-en-ciel testées (Plant et al., 2011). Le même échec a été constaté avec les protéines recombinantes Hsp60 et Hsp70 (Plant et al., 2009), qui sont des protéines fortement immunogènes de *F. psychrophilum*.

8 Mesures thérapeutiques

Les mesures thérapeutiques actuelles reposent essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques au moment des épizooties. Les antibiotiques autorisés et les procédures de traitement agréées varient d'un pays à un autre. Ces procédures sont soumises à l'approbation des autorités compétentes qui prennent en compte, entre autres, le temps d'élimination dans les tissus, la toxicité pour les poissons et la charge rejetée dans l'environnement (Starliper, 2011). Par exemple, le nifurpirinol, le furanace et les sulfonamides qui ont montré de l'efficacité dans le contrôle de la flavobactériose des eaux froides sont désormais interdits aux USA, du fait de leur propriétés cancérigènes (Starliper, 2011). Au niveau mondial, l'antibiotique autorisé le plus utilisé est l'oxytétracycline et en Europe, il s'agit de l'amoxicilline et de l'acide oxolinique (Barnes et Brown, 2011). Le développement de résistance à ces trois antibiotiques a été rapporté et a conduit à une préférence de prescription pour le florfénicol (Barnes & Brown, 2011 ; Bruun et al., 2000), majoritairement utilisée en France. Néanmoins, une récente étude a montré une résistance au florfénicol et à l'acide oxolinique et a confirmé la résistance observée à l'oxytétracycline (Henríquez-Nuñez et al., 2012).

Souvent administrés par voie orale via l'alimentation, les traitements antibiotiques peuvent voir leur action limitée par deux facteurs. D'une part, les épizooties les plus sévères sont observés chez les très jeunes alevins, qui ne se nourrissent pas encore par voie orale, et d'autre part, les poissons affectés par la maladie souffrent d'anorexie et n'absorbent donc pas les doses thérapeutiques (Cipriano et Holt, 2005). D'autres thérapies reposent sur la combinaison d'un traitement antibiotique classique et de bains thérapeutiques réguliers contenant des agents antimicrobiens tels que le peroxyde d'hydrogène qui va permettre de diminuer la charge du pathogène dans l'environnement du poisson (Gultepe et Tanrikul, 2006).

9 Adhésion et formation de biofilms

L'adhérence bactérienne ou l'attachement bactérien est l'étape typique de la pathogenèse des infections par biofilm, car la surface n'est pas toujours une condition préalable à la formation de biofilms et les cellules sessiles peuvent apparaître sous forme d'agrégats dans un liquide contribuant à la virulence (Berlanga et Guerrero, 2016). Les bactéries peuvent adhérer aux

surfaces via leurs protéines et/ou annexes polysaccharidiques (LPS, polysaccharides capsulaires) selon les espèces (Katsikogianni et Missirlis, 2004). Le biofilm bactérien est défini comme un mécanisme de transition dans des cellules amassées en une communauté multicellulaire (sessile) formée progressivement au fil du temps et caractérisée par des cellules attachées à des surfaces biotiques et abiotiques et par la production et la sécrétion de produits extracellulaires (PCU) dans une gamme variée de produits naturels, milieux industriels et cliniques (Giaouris et al., 2014). Les cellules sessiles sont communément appelées phénotypes de biofilm permettant le succès de l'agent pathogène et conduisant à une infection responsable de nombreuses maladies chroniques d'origine humaine et d'origine alimentaire. La formation de biofilms permet également aux pathogènes de survivre dans de nombreux environnements adverses et divers en utilisant leur propre défense et systèmes de communication rendant leur éradication difficile (Bjarnsholt, 2013). Les biofilms mono et multi-espèces hébergent des agents pathogènes en tant que réservoir de cellules persistantes avec une tolérance au rayonnement UV, des molécules oxydantes, désinfectants, antibiotiques et phagocytose (défenses de l'hôte). La lente pénétration des agents biofilms et les micro-changements environnementaux dans les biofilms sont quelques exemples des mécanismes résistants (Kart et al., 2014).

Qu'est-ce qui poussent les cellules planctoniques simples à se former?

Les biofilms sont souvent la réponse à des changements nutritionnels et environnementaux tels qu'un changement de pH et état nutritionnel. Ce changement facilite l'agrégation cellulaire entraînant une expression différente des molécules de surface cellulaire (phase variation), des gènes, des facteurs de virulence et une série d'autres événements reflétant l'adaptation à ces facteurs aux conditions (Kostakioti et al., 2013). Le transfert génétique horizontal au sein des biofilms génère la diversité génétique et les sous-populations de cellules en tant que variantes de petites colonies avec des partages du travail dans la formation du biofilm (Bordi et Bentzmann, 2011). En général, le développement de biofilms bactériens peut être divisé en différentes étapes, y compris la fixation réversible de cellules bactériennes aux surfaces (couche de conditionnement); entraînés par des forces physiques (forces de van der Waals, interactions stériques et réactions électrostatiques), et des interactions moléculaires spécifiques (pili, flagelles, liaison au ligand) (Gupta et al., 2016). La prochaine étape est la fixation irréversible de cellules bactériennes déterminant l'adhérence connue sous le nom de co-adhésion à médiation par les forces de cisaillement, la motilité et les adhésines de liaison (flagelles, protéines amyloïdes). En particulier, il a été démontré que les forces hydrophobes

jouent un rôle important dans l'adhérence bactérienne (Dufrêne, 2015). Différents facteurs tels que la disponibilité de la température, des ions et du fer peuvent également grandement moduler la bactériose irréversible adhérence. La production de ces adhésines influence les mécanismes d'agrégation cellulaire et contribue aux propriétés de cohésion et à la formation de biofilm bactérien (Garrett et al., 2008 ; Borlee et al., 2010). A ce stade, les cellules sessiles sont entourées par un système extracellulaire polymérique constituée principalement de polysaccharides, ADN, protéines, lipides, adhésines (protéines liant les glucides) et d'autres substances telles que les cellules mortes. La composition de la matrice pourrait être différente entre les espèces et au sein des espèces. La matrice agit comme un capteur pour les molécules (nutriments, ions) et assemble des cellules, soutient la formation de réseaux de signalisation, se lie aux antibiotiques et aux boucliers contre les prédateurs et les phagocytes (Kostakioti et al., 2013).

Ensuite, les biofilms bactériens mûrissent. Une quantité croissante de composants de la matrice et de bactéries stimulent la communication de cellule à cellule par des systèmes de détection comprenant le dimère cyclique, les monophosphates de guanosine et la détection du quorum (QS), qui aboutissent à la production d'autoinducteurs, les lactones N-acyl-L homosérine pour les bactéries à Gram négatif et les oligopeptides pour bactéries à Gram positif (Donlan, 2002). QS joue un rôle conditionnel dans la formation de biofilm ou la régulation génique bas qui conduisent à des modèles coordonnés d'expression génique, la production de facteurs de matrice et de virulence. QS peut déclencher des sous-populations de cellules qui entrent de manière réversible dans l'état cellulaire à croissance lente ou en sommeil dans des conditions stressantes. Ces événements décrivent la nature hétérogène des biofilms, y compris les événements mutationnels (physiologique, réponses phénotypiques et expressions des gènes et des protéines) (Bordi & Bentzmann, 2011).

La transition entre le mode de croissance planctonique relativement sensible aux antibiotiques et l'état de biofilm plus résistant est réversible. Une fois que le biofilm a mûri, la dispersion devient une possibilité pour certaines cellules sessiles uniques ou de petites grappes sessiles de reprendre une activité planctonique (free-living) forme cellulaire en raison de modifications de la disponibilité des éléments nutritifs, des fluctuations de l'oxygène, de l'augmentation de produits toxiques ou autres conditions génératrices de stress (augmentation de la quantité de carbone et d'azote).

Ces conditions peuvent entraîner la dispersion et la mort des cellules, lesquelles sont régulées par des cellules sensorielles. Systèmes de signalisation de cellule à cellule (protéines détectant

l'oxyde nitrique), enzymes dégradant l'ESP (des polysaccharides lysases, des acides D-aminés) et / ou des tensioactifs (une induction par un bactériophage) (Donlan 2002 ; Hochbaum et al., 2011). Cette dispersion est également connue sous le nom de dispersion par ensemencement où les populations de sous-cellules «sacrifiées» échappent aux biofilms ou meurent à l'intérieur des biofilms pour offrir une source et emplacement des nutriments pour les cellules survivantes (Kaplan, 2010). Ces sous-populations dispersées montrent des variations dans la croissance, la motilité et la formation de biofilms. Cette différenciation cellulaire assure la survie et la colonisation des bactéries planctoniques sur de nouvelles surfaces (Gupta et al., 2016). La dispersion des biofilms est un processus programmé impliquant de multiples processus génétiques et réglementaires et déterminant une étape bénéfique pour les bactéries qui peuvent se propager dans les environnements et ré-initier le processus de formation de biofilm.

Cependant, où les nutriments sont disponibles, les bactéries pathogènes adhèrent et forment des biofilms sur les équipements de pisciculture (Cai & Arias, 2017), ce qui pose un certain nombre de problèmes. Pour le moment, un travail intensif est nécessaire pour manipuler ces biofilms nocifs, y compris le nettoyage lors d'une exposition adéquate et prolongée, une température plus élevée, un flux plus élevé et éventuellement avec la combinaison de détergents et des désinfectants tels que *Virkon Aquatic*, la vérification quotidienne des aquariums, des unités de filtration, des pipelines et pompes (Yanong & Erlacher-Reid, 2012). Des stratégies efficaces contre ces biofilms bactériens doivent être ré-examinées. Jusqu'ici, les connaissances sur le processus de formation de biofilms de *F. psychrophilum* sont limitées. Il a été suggéré que la capacité de *F. psychrophilum* à former des biofilms servirait de réservoirs pour les facteurs de virulence putatifs (Levipan & Avendaño-Herrera, 2017) et que la formation de biofilms de *F. psychrophilum* est une stratégie visant à assurer le maintien de la structure et les fonctions (Levipan et al., 2018). Il a également été démontré qu'un comportement mobile ne peut être observé dans les cellules de biofilm de *F. psychrophilum* (Castillo et al., 2016), et qu'au niveau de ces biofilms les cellules peuvent rapidement développer une résistance aux antibiotiques si elles sont exposées à des concentrations sous-inhibitrices de ces composés (Sundell & Wiklund, 2011).

10 Stratégies de contrôle de l'adhésion bactérienne et de la formation de biofilm

Les bactéries présentes dans un biofilm présentent des niveaux élevés de résistance aux biocides et aux antibiotiques. Ça peut arriver à 1000 fois plus d'antibiotiques pour tuer les bactéries contenues dans les biofilms par rapport aux cellules planctoniques libres (Harper et al., 2014). Des stratégies alternatives ont été suggérées pour inhiber l'adhésion bactérienne et éliminer les biofilms tels que les méthodes mécaniques, méthodes physiques et chimiques. Au sens figuré, la formation de biofilm peut être décrite comme une courbe de croissance bactérienne à quatre phases : la phase de latence (adhésion), la phase exponentielle ou logarithmique (log) (formation précoce de biofilm), la phase stationnaire (biofilm mature) et la phase de déclin ou de la mort (détachement). Des composés qui peuvent combattre l'adhésion bactérienne, la formation de biofilms et les biofilms matures sur les surfaces doivent être identifiés. Les concentrations inhibitrices sous-minimales (sous-CMI) de ces composés ne sont pas assez pour tuer ou inhiber les cellules bactériennes, mais pour réguler à la baisse une partie de la chimio-physiologie activités (Macé et al., 2017). Il a été suggéré que les cellules bactériennes ne développent pas une résistance aux composés utilisés à des concentrations inférieures à la CMI, contrairement aux antibiotiques conventionnels (Cortés et al., 2011).

Les recherches menées sur *F. psychrophilum* et *F. columnare* permettent de mieux comprendre les facteurs de virulence, la sensibilité de l'hôte, la génétique et les méthodes de traitement. En comparant ces deux espèces, il devient évident qu'il existe un nombre considérable de problèmes posés, les thèmes abordés et les pistes à explorer pour les recherches futures. Malgré tous les efforts déployés pour révéler les mécanismes des agents pathogènes et trouver des méthodes appropriées pour prévenir ou traiter l'infection, les deux bactéries représentent toujours une menace majeure pour l'aquaculture en zones à climats tempéré et chaud, et les vaccins efficaces, enregistrés au niveau international font toujours défaut. En outre, la mortalité des populations de poissons sauvages illustre l'importance de ces agents pathogènes.

La recherche sur les flavobactéries est essentielle en raison de leur rôle en tant qu'agents étiologiques importants de la maladie et de leur importance dans l'écologie microbienne. Cependant, les chercheurs travaillant avec ces organismes sont confrontés à des défis importants. Premièrement, de nombreuses flavobactéries, en particulier celles qui sont pathogènes pour les poissons, sont fastidieuses et ne se développent que sur un milieu pauvre en éléments nutritifs (Bernardet & Bowman, 2006) qui, dans de nombreuses conditions, doit

être complété par une variété d'antibiotiques pour empêcher la prolifération d'autres bactéries moins fastidieuses. Le rapport et la marque des ingrédients incorporés dans ces milieux, ainsi que les conditions osmotiques, peuvent affecter la capacité à cultiver certaines flavobactéries (Lorenzen 1993; Cipriano et Teska, 1994 ; Michel et al., 1999). Même quand un milieu de culture idéal est utilisé dans une situation donnée, la durée de génération lente de certaines espèces et variétés dans des conditions d'incubation préférées (température, atmosphère aérobie ou micro-aérophile, par exemple) peut entraver la réussite de la culture de tous les organismes, au-dessus, est le rythme thérapeutique à laquelle les membres de la famille des flavobactéries sont découverts et décrits. En effet, il faut constamment rechercher dans la littérature scientifique des espèces qui doivent être intégrées à tout système d'identification et se tenir au courant des nombreux changements de nomenclature (Kampfer et al., 2011). Un troisième défi, en particulier lorsque l'on travaille avec des flavobactéries associées au poisson, est leur omniprésence dans les habitats aquatiques et sur / dans la peau, les branchies, le mucus et les intestins de poisson (Bernardet et Bowman, 2006). Pendant que certaines flavobactéries sont présentes chez des poissons apparemment en bonne santé ont également été impliqués en tant que pathogènes du poisson (Anderson et Ordal, 1961 ; Strohl et Tait, 1978 ; Mudarris et al., 1994), le rôle que jouent de nombreuses flavobactéries dans la santé des poissons est encore mal compris. On ne sait peut-être pas si les flavobactéries externes sont des habitants transitoires du poisson ou si elles sont des constituants normaux de leur flore bactérienne et lesquelles des espèces nouvellement décrites sont réellement des agents pathogènes. En effet, une partie de la flore bactérienne présente dans la peau, les branchies et l'intestin de poissons ont inhibé les agents pathogènes connus des poissons (Smith et Davey, 1993 ; Spanggaard et al., 2001), tandis que certaines souches de *Chryso bacterium* présentes sur la peau de salamandres (*Hemidactylum scutatum*) présentent une activité antifongique (Lauer et al., 2007) et peuvent ainsi jouer un rôle mutualiste avec leur hôte.

Quatrièmement, il n'y a pas suffisamment de réactifs de diagnostic spécifiques disponibles pour détecter et identifier de nombreuses flavobactéries associées au poisson en plus de celles qui sont couramment associées à la maladie du poisson. Par exemple, la majorité des rapports récents sur les flavobactéries nouvelles ou moins communes associées au poisson ont fondé leur identification sur une caractérisation polyphasique extensive, comme le soulignent Bernardet et al. (2002). Ces méthodes fonctionnent bien pour une identification définitive et permettent une comparaison cohérente entre les flavobactéries décrites, mais elles nécessitent une culture de l'organisme et des capacités techniques permettant de réaliser une gamme

d'analyses biochimiques et moléculaires, dont certaines sont spécialisées (par exemple, l'hybridation ADN-ADN ; les analyses d'ester méthylique d'acides gras). Enfin, un autre obstacle à la recherche sur les flavobactéries, en particulier les flavobactéries pathogènes pour les poissons, est la difficulté associée à des modèles expérimentaux de défi pour étudier leur pathogénicité. Malgré le fait que *F. psychrophilum* provoque des épidémies déprimantes sur le plan économique chez des poissons partout dans le monde et a fait l'objet d'études approfondies; il n'existe toujours pas de modèle expérimental véritablement fiable pour évaluer sa pathogénicité. Par exemple, des infections expérimentales menées par de nombreux auteurs utilisant des épreuves d'immersion ont donné des résultats très variables et soulignent que les infections par le bain sont difficiles à contrôler, normaliser et reproduire (Madsen et Dalsgaard, 1999 ; Decostere et al.,2000 ; Garcia et al.,2000 ; Madetoja et al., 2000 ; Liu et al., 2001 ; Busch et al., 2003). Cependant, Madsen et Dalsgaard (1999) ont étudié la reproductibilité de *F. psychrophilum* et ont montré que, dans la plupart des cas, l'injection intrapéritonéale de la bactérie était reproductible, bien que certains paramètres (isolement utilisé, nombre de poissons dans le réservoir, origine du poisson, poids du poisson) puissent introduire une variabilité. Ainsi, les recherches récentes visaient à élucider les mécanismes de virulence et la pathogénèse de *F. psychrophilum*, ainsi que les moyens de prévenir et de traiter les maladies qu'il cause, en utilisant des solutions intra-péritonéales (Korkea-aho et al., 2011 ; Castillo et al., 2012), sous-cutanées (Plant et al.,2011) ou intramusculaires (Hadidi et al., 2008 ; Silverstein et al., 2009 ; Leeds et al., 2010), même s'il est reconnu que ces méthodes contournent des aspects importants du système immunitaire inné.

11 Antibiotiques en truiticulture : efficacité et effet sur l'environnement de l'élevage

a. Antibiotiques en pisciculture : nature et mode d'emploi

Un antibiotique est une substance chimique capable d'empêcher le développement des microorganismes. Les antibiotiques peuvent provenir de sources variées, comme la Pénicilline qui a été isolée pour la première fois à partir des champignons. Les tétracyclines et les chloramphénicol prennent leur origine chez les bactéries du genre *Streptomyces* (Bartlett et Tally, 1980).

La synthèse biochimique de ces molécules peut être effectuée une fois qu'on en connaît la structure chimique.

Les antibiotiques sont regroupés en familles en fonction de leur structure moléculaire et de leur mode d'action (Dixon, 2001). Ceux homologués au Canada pour l'utilisation chez les poissons font partie de trois familles différentes (Tableau 1).

b. Classification des Antibiotiques

Les antibiotiques peuvent aussi être classés comme étant bactéricides ou bactériostatiques, les premiers tuent les bactéries tandis que les seconds inhibent leur croissance. Un système immunitaire qui fonctionne adéquatement chez le poisson est nécessaire pour le rétablissement de l'équilibre entre les pathogènes et l'hôte. Deux facteurs importants sont à prendre en considération pendant et après l'administration d'un traitement antibiotique dans une station piscicole. En premier lieu, le médicament doit être administré pendant le nombre de jours prescrit. Si un traitement n'est pas administré sur une assez longue période, il est possible que le système immunitaire du poisson n'aie pas eu suffisamment de temps pour réagir aux pathogènes et être efficace à les combattre. Donc, une récurrence rapide de l'infection est possible en interrompant le traitement antibiotique prématurément. Par ailleurs, les conditions stressantes qui ont provoqué l'émergence de la maladie dans le cheptel doivent être corrigées en même temps que le traitement est administré.

Tableau 1 : Familles d'antibiotiques regroupant celles homologuées pour usage chez les poissons au Canada avec leur mode d'action.

Famille d'antibiotiques	Ingrédient actif	Nom commercial	Mode d'action
Tétracyclines	Oxytétracycline	TM-Aqua®	Affecte la synthèse des protéines
Chloramphénicol	Florfenicol	Aquaflor®	Affecte la synthèse des protéines
Sulfonamides	Sulfadiméthoxine/ ormétoprime Sulfadiazine/ trimétoprime	Romet-30® Tribrissen 40®	Perturbe les voies métaboliques, la formation des acides aminés et des molécules structurantes de l'ADN

c. Modes d'administration

Les antibiotiques peuvent être administrés par bain, par injection, ou par voie orale. Les bains d'antibiotiques sont réservés normalement aux petits poissons et s'administrent dans des bassins qui sont de volumes restreints. En l'occurrence, on utilise cette méthode lors de l'alevinage. Les doses sont calculées en mg d'ingrédient actif par litre d'eau. Par ailleurs, l'incapacité de contrôler les rejets d'antibiotique dans l'émissaire est une préoccupation en rapport avec ce type d'administration.

Le traitement de gros poissons dans de grands bassins est trop dispendieux. L'administration des antibiotiques par injection peut être effectuée dans la cavité abdominale, dans le sinus dorsal, ou bien directement dans le muscle. Les doses sont ainsi calculées pour chaque individu en mg par kg de poisson. Ce type de traitement est réservé normalement aux poissons de grande taille à valeur élevée comme les géniteurs. Le besoin important de main d'œuvre et le temps nécessaire rendent cette technique plus dispendieuse et fastidieuse que les autres méthodes d'administration. Par ailleurs, la manipulation des poissons malades déjà affaiblis peut empirer leur état de santé. Les injections sont plus courantes comme pratique d'administration des vaccins chez des poissons en santé, afin de prévenir les épidémies.

L'administration des antibiotiques par voie orale en les incorporant à la moulée est loin de la pratique la plus commune. La biomasse totale de poisson est calculée en connaissant leur nombre et leur poids moyen en grammes. La connaissance exacte de l'inventaire est alors nécessaire pour calculer le plus exactement possible la quantité de médicament requise pour respecter la dose recommandée. Les antibiotiques sont normalement mélangés aux aliments à la ferme quand il y a une petite quantité de moulée à préparer. Des moulées médicamenteuses peuvent aussi s'obtenir directement du fabricant afin d'éviter les contraintes liées à la manipulation des produits antibiotiques à la ferme.

d. Mode d'action des antibiotiques

Le principe d'action des antibiotiques consiste à bloquer sélectivement la survie ou à la multiplication des micro-organismes. Le mécanisme ciblé par l'antibiotique est le plus souvent spécifique des bactéries et n'a pas d'équivalent chez les eucaryotes et en particulier chez l'Homme (Wright, 2012). Ainsi, les antibiotiques agissent au niveau de la biosynthèse et le maintien de la paroi cellulaire, des protéines et de l'ADN bactérien (Walsh, 2000 ; Wright, 2012).

- Action sur la paroi bactérienne

Dans la paroi bactérienne, le peptidoglycane est un constituant principal qui entoure la bactérie et lui confère sa forme et sa rigidité (Typas et al., 2012). Cette molécule occupe une position différente chez les bactéries Gram positif et Gram négatif (Green, 2002) (Figure 4). Mais, dans tous les cas, le peptidoglycane est étroitement lié aux processus de croissance et de division cellulaire (Green, 2002 ; Typas et al., 2012).

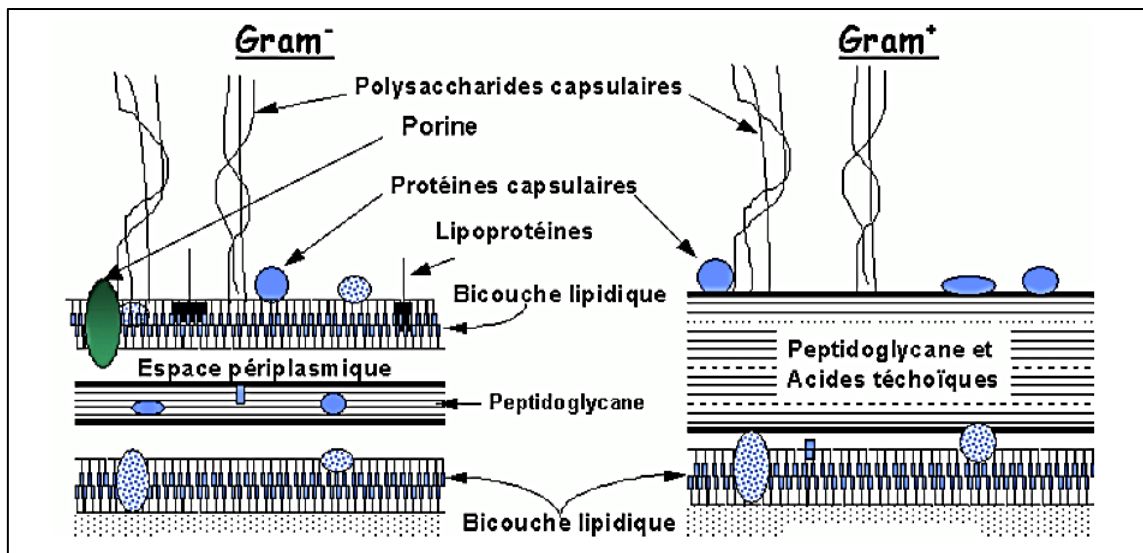


Figure 4 : Structures de la membrane et de la paroi de peptidoglycane chez les bactéries Gram positif et Gram négatif (Bisognano, 2001).

C'est un mucopolysaccharide composé de chaînes linéaires osidiques pontées par de courts peptides. Les chaînes osidiques sont formées par une alternance de résidus N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Chaque disaccharide porte un tétrapeptide fixé au groupement lactyle de l'unité NAM. La formation de ponts entre les peptides des chaînes glycanes voisines crée une véritable réticulation de la paroi (Figure 5).

La synthèse du peptidoglycane débute dans le cytoplasme de la bactérie, se poursuit dans la membrane cytoplasmique et se termine dans la paroi déjà formée (Typas et al., 2012). Un certain nombre d'enzymes interviennent dans cette synthèse, les plus importantes sont les transpeptidases, les transglycosylases, et les carboxypeptidases (Green, 2002 ; Typas et al., 2012). Les β -lactamines bloquent la réticulation du peptidoglycane par inhibition de la formation de liaison peptidique qui est catalysée par les Protéines de Liaison aux Pénicillines (PLP) (Fontana et al., 2000, Honderlick et al., 2007 ; Park & Uehara, 2008 ; Soares et al., 2012). Le β -lactame, analogue de la borne D-alanyl-Dalanine dipeptide du peptidoglycane, agit comme substrat pour la PLP pendant la phase d'acylation de la formation de réticulation. La pénicilline acylation du site actif des PLP bloque l'hydrolyse de la liaison créée avec le β -lactamine, ce qui désactive l'enzyme (Fontana et al., 2000 ; Honderlick et al., 2007 ; Park et Uehara, 2008 ; Soares et al., 2012) (Figure 5).

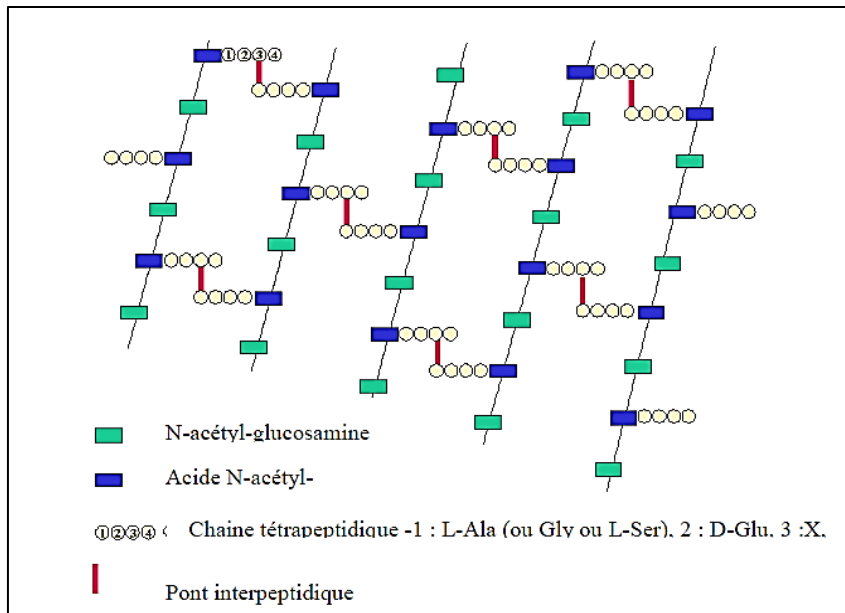


Figure 5 : Structure schématique du peptidoglycane (Euzéby, 2004).

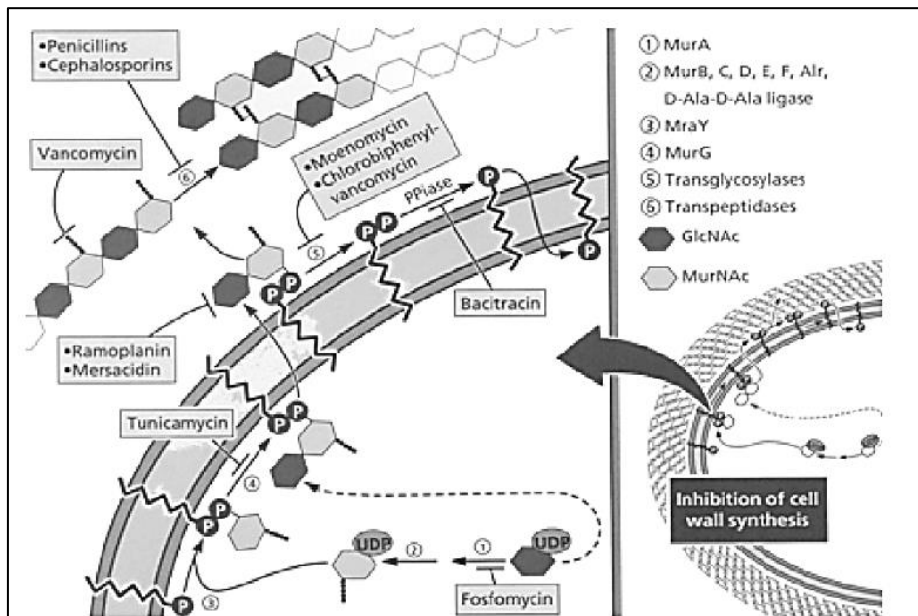


Figure 6 : Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse de la paroi (Paquet-Bouchard, 2006).

Les glycopeptides inhibent également la synthèse de la paroi, leur action est toutefois différente. L'analogie structurale avec la partie peptidique du peptidoglycane (pentapeptide) leur permet de se fixer au niveau des extrémités peptidyl-D-Ala-D-Ala des précurseurs lipopeptidiques lorsqu'ils émergent de la membrane cytoplasmique, durant leur transport à travers celle-ci en formant des liaisons hydrogène impossible (Leclercq et Cattoir, 2012). Cette fixation inhibe la transglycosylase (Kahne et al., 2005) (Figure 6) l'enzyme qui assure le transfert du disaccharide du précurseur de la peptidoglycane au polymère glycane en formation (Typas et al., 2012).

Les inhibiteurs des bêta-lactamases ont un mécanisme identique à une action suicide. En effet, l'enzyme β -lactamase reconnaît son inhibiteur comme substrat. L'inhibiteur se lie à la serine du site actif de manière irréversible et provoque une double inactivation : sa propre inactivation et celle de l'enzyme (Brown et al., 1996). L'antibiotique β -lactamine non inactivé se fixe sur les PLP et exerce son activité pharmacologique.

Quant à la fosfomycine, elle agit au niveau des étapes précoces de la synthèse du peptidoglycane (Figure 6). Elle se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme pyruvyl transférase qui bloque la synthèse de la NAM, un des constituants essentiels de la peptidoglycane de la paroi bactérienne (Kahan et al., 1974 ; Jin et al., 2012).

- **Action sur la membrane des cellules**

La perméabilité de la membrane est la première étape impliquée dans la résistance des bactéries aux antibiotiques (Pagès et al., 2008). Les modifications de cette perméabilité membranaire sont largement responsables de la diminution drastique de la sensibilité aux antibiotiques (Delcour, 2009 ; Cox et Wright, 2013). Parmi les antibiotiques qui agissent sur la membrane cellulaire, les polymyxines exercent leur activité bactéricide en se liant aux phospholipides et aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane cellulaire des bactéries, entraînant une fuite des composants intracellulaires et par conséquent la mort cellulaire (Arnold et al., 2007 ; Vaara, 2010). En effet, les LPS sont des composants de structure de la membrane externe bactérienne comprenant l'antigène O, un polysaccharide et un noyau lipidique qui ancre dans la membrane externe (Valvano, 2011) (Figure 7). Ils portent une charge négative qui confère l'intégrité et la stabilité à la membrane externe bactérienne. Les polymyxines, ayant une charge positive (Mg^{2+} ou Ca^{2+}), se lient sur le lipide A, entraînant la déstabilisation et la désintégration de la membrane externe (Clausell et al., 2006 ; Arnold et al., 2007 ; Vaara, 2010).

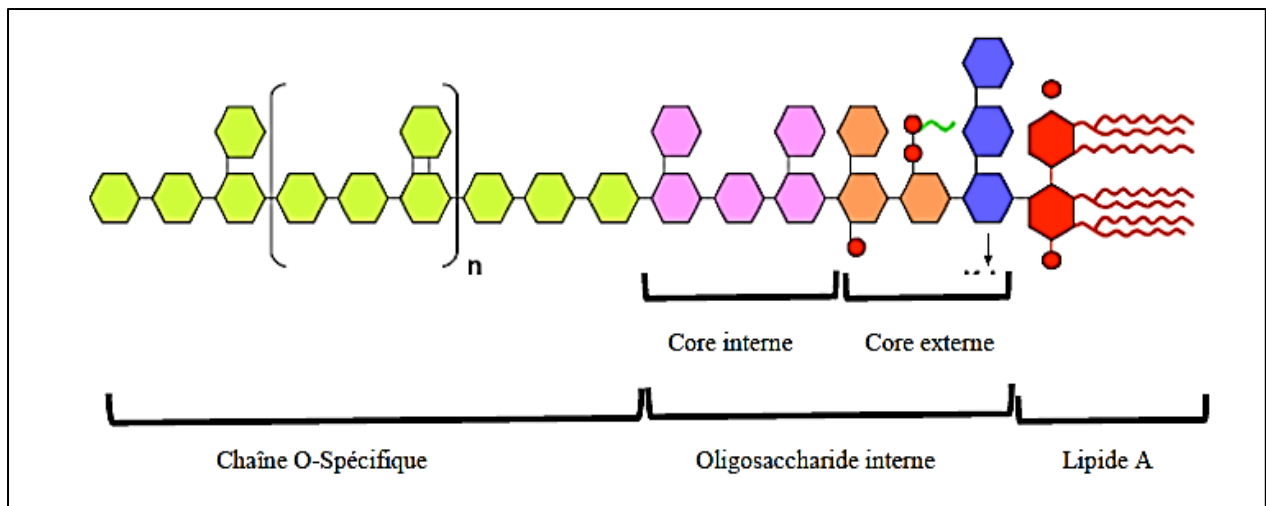


Figure 7 : Schéma de la structure chimique du LPS bactérien (Pupo et Hardy, 2009).

Les imidazoles inhibent l'accumulation des stérols méthylés, dont le rôle est de renforcer la membrane cellulaire grâce à leur propriété amphiphile qui leur permet de s'intégrer dans la bicouche lipidique (Xi et al., 2008). Cette inhibition entraîne la destruction de la composition de la bicouche lipidique des membranes. Certains imidazoles, à des concentrations élevées, peuvent exercer une action inhibitrice directe sur la membrane, sans interférence avec les stérols et les esters de stérols (Ujtinamatada et al., 2007 ; Xi et al., 2008).

- Action sur les acides nucléiques

La synthèse des acides nucléiques, ADN et ARN, est absolument vitale pour les cellules. Sans cette synthèse, la division cellulaire et la fabrication des protéines sont impossibles. Un certain nombre de composés peuvent bloquer de manière directe ou indirecte ces voies de biosynthèse des acides nucléiques, et ont en conséquence une activité antibiotique. Les quinolones provoquent la mort cellulaire bactérienne en inhibant la synthèse de l'ADN. Ils interfèrent avec le maintien de la topologie chromosomique en ciblant la topoisomérase II et la topoisomérase IV. Le piégeage de ces enzymes, au stade de clivage de l'ADN, inhibe le surenroulement de l'ADN, la transcription et la réparation (Hooper, 2000 ; Drlica et al., 2008 ; Cattoir, 2012). Ce qui conduit à la formation de cassures au niveau de l'ADN double brin et par la suite à la mort cellulaire (Figure 8).

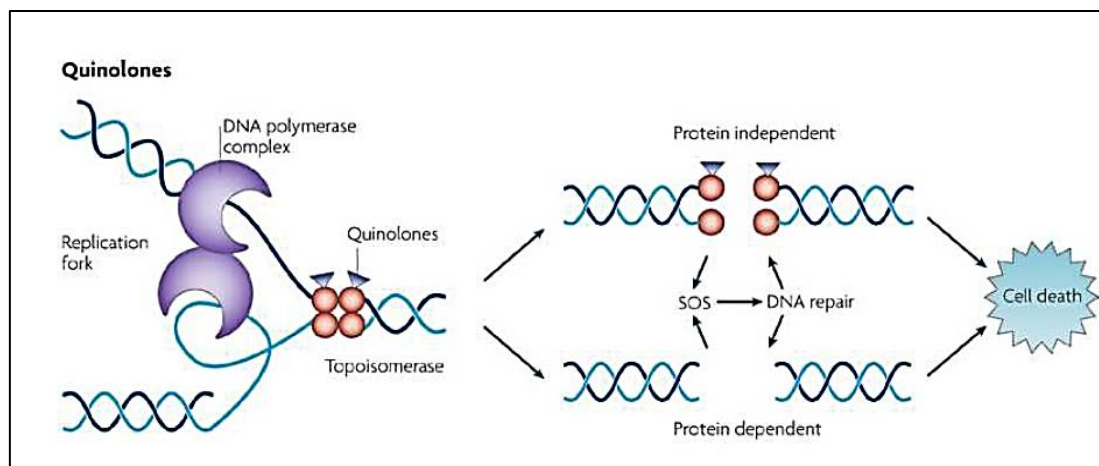


Figure 8 : Mode d'action des quinolones (Kohanski et al., 2010).

La rifampicine agit en se liant à la sous-unités β de l'ARN polymérase, enzyme responsable de la transcription de l'ADN des bactéries, empêchant ainsi la transcription de l'ADN en ARN (Hartmann et al., 1967 ; Floss et Yu, 2005).

- Action sur la synthèse des protéines

La synthèse des protéines est un processus essentiel des cellules vivantes. L'acteur central de ce processus, dans lequel l'ARNm est traduit en protéine, est le ribosome. Ce processus se produit en trois phases séquentielles (Initiation, Elongation, Terminaison) (Figure 9), et il implique le ribosome et une gamme de facteurs cytoplasmiques (Filipovska et Rackham, 2013). Les détails du mécanisme de traduction et les ribosomes des bactéries sont sensiblement différents de ceux des eucaryotes (Filipovska et Rackham, 2013). Il existe un grand nombre de molécules antibiotiques qui exploitent ces différences et sont capables de bloquer sélectivement la traduction des protéines (Targant 2010) (Figure 9).

Les tétracyclines se fixent au niveau du site A de la sous-unité 30S du ribosome, bloquant la liaison de l' aminoacyl-ARNt (Chopra et Roberts, 2001 ; Soares et al., 2012). Il en résulte une inhibition de la synthèse des protéines, avec des effets bactériostatiques (Figure 9). De même, les aminoglycosides se lient aux polysomes et interfèrent dans la synthèse protéique. La cible prioritaire des aminoglycosides est la sous-unité 30S, ils inhibent la reconnaissance du codon de l'acide ribonucléique messager (ARNm) avec l'anticodon de l'ARNt (Zhang et al., 2008 ; Coiffier et Albert, 2012) (Figure 9). Les phénicolés (Chloramphénicol) se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe aminoacyl-ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation (Aakra et al., 2010 ; Adebusuyi et Foght, 2013) (Figure 9).

Comme les phénicolés, les macrolides se fixent sur la sous-unité 50S du ribosome au niveau du site P, ils empêchent ainsi le transfert du complexe peptidyl-ARNt depuis le site P vers le site A, ce qui entraîne une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique (Tenson et al., 2003 ; Gamerding & Deuerling, 2012) (Figure 9).

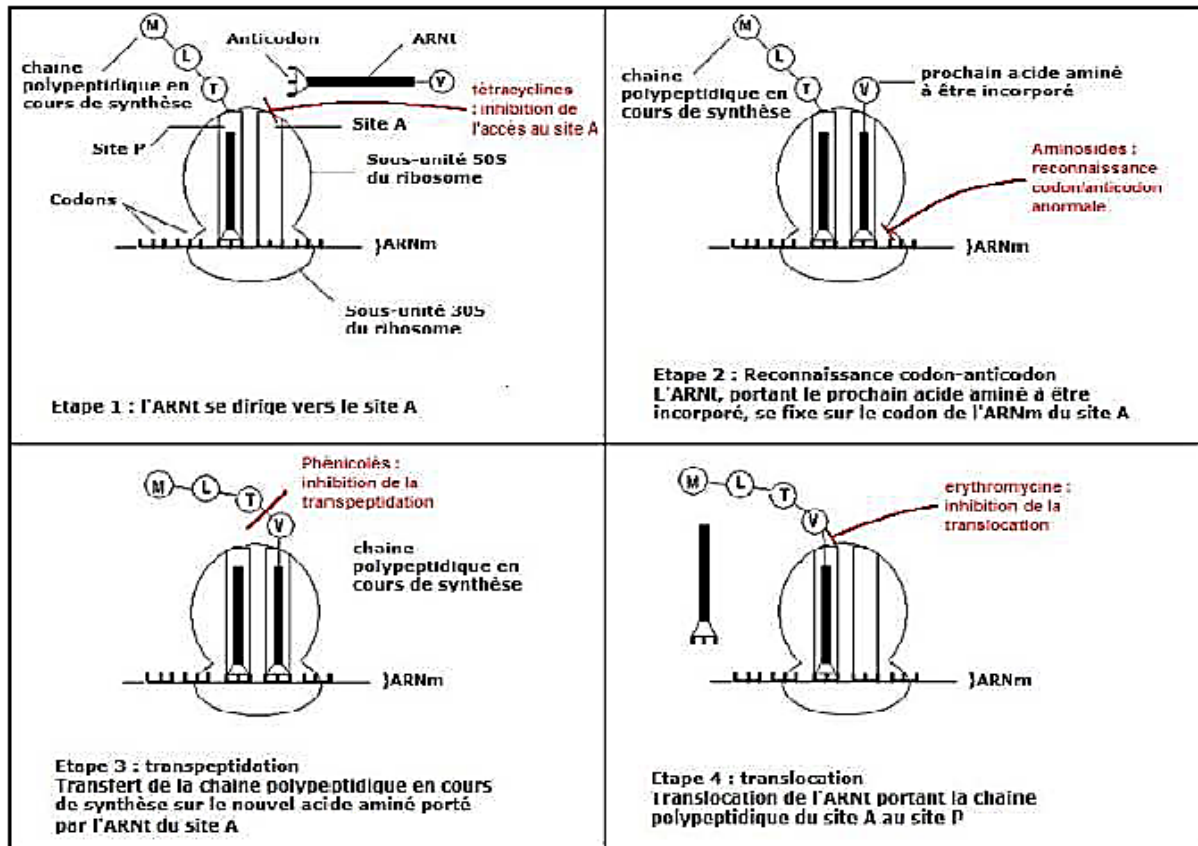


Figure 9 : Synthèse des protéines et les sites d'action des antibiotiques (Targant 2010).

e. Conséquences de l'utilisation abusive des antibiotiques

Dès 1945, Alexandre Fleming avait signalé que l'utilisation inappropriée de pénicillines pouvait conduire à la sélection des souches résistantes de *Staphylococcus aureus*. Quelques années après avoir introduit la pénicilline en thérapeutique, plus de 50% des souches de *S. aureus* étaient devenues résistantes (Levy, 2002). Après les années 1960, la recherche s'est focalisée à la recherche des nouveaux antibiotiques contre les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM) (Jevons et al., 1963). Ainsi, pour chaque nouveau antibiotique introduit en thérapeutique, la découverte de souches bactériennes résistantes à cet antibiotique est fréquemment rapportée (Guillemot & Leclercq, 2005 ; Wright, 2012).

En effet, les bactéries sont devenues résistantes à la plupart des agents antimicrobiens naturels qui ont été développés au cours des 50 dernières années (Hancock, 2007). Cette résistance limite de plus en plus l'efficacité des antibiotiques actuels. Le problème n'est pas seulement la

résistance aux antibiotiques, mais aussi l'apparition de la multirésistance (Wright, 2012). En 2004, plus de 70% des bactéries pathogènes ont été estimées être résistantes à, au moins, l'un des antibiotiques actuellement disponibles (Katz et al., 2006). Ces bactéries multirésistantes peuvent conduire à des impasses thérapeutiques (Vogtlander et al., 2004 ; Kumarasamy et al., 2010 ; Wright 2012), et à des problèmes d'épidémies comme le cas de SARM et d'Enterocoques résistants à la vancomycine (Kelly et Monson, 2012 ; Majumdar et Padiglione, 2012).

Le problème de l'émergence de la résistance des bactéries aux antibiotiques est d'autant plus inquiétant que l'arrivée de nouvelles molécules dans cette classe thérapeutique s'est fortement ralentie (Alanis, 2005 ; Wright, 2012). Le développement des résistances bactériennes progresse plus rapidement que le développement des antibiotiques et laisse entrevoir une augmentation des difficultés thérapeutiques.

VII. Plantes aromatiques et médicinales au Maroc : de la botanique à l'huile essentielle - phytothérapie

1. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales

Dans les pays développés et les pays en voie de développement, les applications médicales de produits à base de plantes sont fréquentes dans les communautés pauvres depuis l'Antiquité (Yadaiah et al., 2011). Selon l'OMS (2002), plus de 80% de la population en Afrique utilisent les plantes médicinales dans le traitement des maladies graves, alors qu'en Europe, en Amérique du Nord et dans d'autres régions industrialisées, plus de 50 % de la population a eu recours au moins une fois à la médecine complémentaire. Ce recours peut s'expliquer par le fait que les plantes sont disponibles partout et c'est une médecine qui est abordable surtout dans les pays en voie de développement. De plus, les effets secondaires causés par les plantes sont minimes voire absents par rapport aux médicaments synthétiques (Cowan, 1999).

Le marché mondial des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) est estimé à 19,4 milliards dollars (Neffati, 2014). Au Maroc, la flore est riche avec environ 4200 plantes dont 800 sont exploitées dans des conditions souvent artisanales ignorant tous des modalités modernes de production, de commercialisation et de valorisation (Bellakhdar, 1984). Pourtant, ce secteur pourrait contribuer de façon appréciable au développement socio-économique du pays. Les valeurs des exportations des aromates et produits d'herboristerie ont varié entre 40 et 60 millions de DH/an entre 1995 et 2003.

Les plantes produisent une énorme variété de métabolites secondaires, et il est communément admis qu'une partie importante de cette diversité chimique sert à protéger les plantes contre les microbes pathogènes (Dixon 2001 ; Gibbons 2008). Ces substances végétales sont classées comme phyto-anticipines, des composés qui sont présents de manière constitutive, ou phytoalexines, dont les niveaux augmentent fortement en réponse à l'invasion microbienne. On distingue plusieurs groupes chimiques, les phénols (simples phénols, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et les coumarines), les alcaloïdes, les terpénoïdes, les lectines et polypeptides. Cowan (1999) a fait une revue sur ces composés en mettant en exergue leur activité biologique surtout l'activité antimicrobienne. Leur mécanisme d'action passe par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes, et l'interaction avec l'ADN (Tableau 2) (Cowan, 1999).

Ainsi, les propriétés antimicrobiennes des PAM sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Yano et al., 2006). Depuis, une attention particulière s'est portée sur les composés phytochimiques naturels et potentiels qui ont montré une appréciable activité antimicrobienne (Helander et al., 1998 ; Bozin et al., 2006 ; Matasyoh et al., 2009).

Ces produits naturels sont relativement non toxiques, peu coûteux et disponibles. Au cours des deux dernières décennies, plus de 25% des médicaments sont utilisés en médecine traditionnelle directement dérivés des plantes, tandis que 25% ont été modifiés chimiquement à partir de produits naturels (Vuorelaa et al., 2004).

Tableau 2 : Classes majeures des composés antimicrobiens d'origine végétale et leurs mécanismes d'action (Cowan, 1999).

Classe	Sous-classe	Effet	Exemple(s)	Mécanisme d'action
Composés phénoliques	Phénols simple	Antimicrobien	Catéchol Épicatéchine	- Privation du substrat et rupture de la membrane.
	Acides phénoliques	Antimicrobien	Acide cinnamique	
	Quinones	Antimicrobien	Hypéricine	-Se lie à l'adhésine, se lie à la paroi cellulaire, inactive les enzymes.
	Flavonoïdes	Antimicrobien	Chrysin	-Se lie à l'adhésine, se lie à la paroi cellulaire.
	Flavones	Antimicrobien	Abyssinone	-Inactivent les enzymes, inhibent la transcriptase inverse du VIH.
	Flavonols	Antimicrobien	Totarol	?
	Tannins	Antimicrobien	Éllagitannin	-Se lie aux protéines, Se lie à l'adhésine, se lie à la paroi cellulaire, inactive les enzymes, privation du substrat.
	Coumarines	Antiviral	Warfarine	-Interagissent avec l'ADN des eucaryotes.
Terpénoïdes, huiles essentielles		Antimicrobien	Capsaïcine	-Rupture de la membrane.
Alcaloïdes		Antimicrobien	Berberine Pipérine	-S'intercalent dans la paroi cellulaire et/ou dans l'ADN.
Lectines et polypeptides		Antiviral	Mannose-spécifique agglutinin Fabatin	-Bloquent la fusion ou l'adsorption virale, forment des ponts disulfures.
Polyacétylènes	-	-	8S-Heptadéca-2(Z),9(Z)diène-4,6-diyne-1,8-diol	?

a. Historique

Les végétaux peuplaient la planète bien avant l'homme et ont d'abord servi à le nourrir *via* la cueillette puis la culture (Lorrain, 2013). Leur emploi a rapidement évolué en constatant leurs propriétés thérapeutiques pour traiter les blessures et les maladies. L'utilisation des arômes était également connue des civilisations de l'antiquité pour des usages religieux, cosmétiques mais aussi thérapeutiques (Lardry & Haberkorn, 2007). Ce sont les égyptiens, 3150-1085 avant Jésus-Christ, de l'époque pharaonique, qui furent les premiers à avoir recours aux plantes aromatiques pour embaumer les morts, avec notamment un mélange d'huiles essentielles comme l'huile de cèdre, de basilic (Franchomme et al., 1990 ; Abrassart, 1997), et en utilisant des plantes aux propriétés antiseptiques connues comme le nard de l'Himalaya, la cannelle, le ciste, des produits de sécrétion aromatique comme l'encens ou la myrrhe (Lonic-

Marinier & Lobstein, 2013). En Grèce antique, Hyppocrate indiquait les bains aromatiques dans le traitement des maladies de la femme (Lardry & Haberkorn, 2007). Et dans les grandes épidémies, on faisait brûler de la lavande, sarriette, romarin et de l'hysope (Franchomme et al., 1990). En Inde, à l'âge d'or de la médecine ayurvédique coïncidant avec l'apogée du bouddhisme (de 327 av. J-C. à 750 apr. J-C.), on conseillait couramment les plantes médicinales et aromatiques pour différentes indications : massages, bains, hygiène, santé et diététique (Lardry & Haberkorn, 2007 ; Roulier, 1990). Au 1er siècle apr. J-C., apparut le traité intitulé « De materia medica » écrit par Dioscoride, médecin et grand voyageur, dressant l'inventaire de 519 espèces de plantes et qui servira de référence dans la société Romaine et Arabe. Les arabes ont ainsi poursuivi les recherches sur les plantes médicinales en devenant les premiers à mettre au point la distillation des plantes, permettant d'en extraire l'huile essentielle, il y a de cela plus de mille ans (Nogaret-Ehrhart, 2008).

Cependant, avec les progrès de la science, l'avènement de la pharmacologie de synthèse (l'aspirine, la pénicilline, etc.) et l'émergence de la médecine basée sur la preuve, l'usage des médicaments chimiques a pris son essor, et ce depuis la seconde guerre mondiale, tandis que la phytothérapie ainsi que l'aromathérapie ont perdu de leur intérêt.

Récemment, depuis le début des années 2000, il y a un retour en force vers cette discipline alternative. En effet, la prise de conscience par les patients et le personnel médical d'une image de plus en plus défavorable des médicaments de synthèse suite à l'apparition des effets indésirables, d'une efficacité parfois insuffisante ou nulle, l'émergence de résistances bactériennes a renvoyé à nouveau vers l'usage de produits naturels à base de plantes médicinales qui semblent avoir de grands avantages.

b. Plantes médicinales et aromatiques à visée thérapeutique au Maroc

Le Maroc constitue un climat et un cadre favorable à la culture d'une flore riche et variée. Sur les 7000 espèces et sous-espèces existantes, on retrouve environ 537 espèces endémiques du pays et 1625 rares ou menacées (Benabid, 2000). Le Maroc occupe ainsi la première place parmi les pays du Sud de la Méditerranée pour sa richesse en plantes endémiques. On compte 800 espèces potentiellement exploitables de PAM (Fennane, 1998). Vu cette richesse, le Maroc dispose d'un savoir-faire ancestral pour la médication par les plantes. En effet, il existe un véritable arsenal thérapeutique traditionnel de recettes et de pratiques au sein de notre pays, issu de traditions et de croyances, transmis à travers les générations et/ou recueilli auprès des herboristes et enrichi par les expériences personnelles ou celles des proches.

Cette pratique de la médecine traditionnelle est liée à plusieurs paramètres : âge, sexe, niveau d'étude, situation familiale, type de maladie, famille des plantes utilisées, connaissances sur la toxicité des plantes (Benkhigne et al., 2011 ; Mehdioui & Kahouaji, 2007).

Plusieurs enquêtes ont été menées au Maroc dans l'optique de recenser et répertorier les PAM les plus fréquemment utilisées et collecter les informations sur les usages thérapeutiques pratiqués par la population locale en fonction des différentes régions du pays et des pathologies à traiter.

2 Généralités sur les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des substances odorantes et volatiles, non grasses, extraites d'un végétal sous forme liquide (Couic-Marinier & Lobstein, 2013a-c). Elles sont synthétisées par des plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires (Bakkali et al., 2008). La plupart des végétaux renferment des HE, mais habituellement en quantité infime. Seules les plantes dites aromatiques en produisent en quantité suffisante (Lardry & Haberkorn, 2007). Ces dernières fabriquent les huiles essentielles pour se protéger, se soigner, se réparer : elles leur servent à séduire les insectes pollinisateurs, se protéger des brûlures du soleil ou du froid, des prédateurs et des maladies, et enfin à guérir (blessures, maladies, attaques diverses, etc.) (Festy, 2011).

a. Définition des huiles essentielles

Il s'agit d'un extrait pur et naturel provenant des plantes aromatiques (Roulier, 1990 ; Wegrzyn & Lamendin, 2005). Cet extrait concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs (Lardry & Haberkorn, 2007). Il faut ainsi une très grande quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles (Nogaret-Ehrhart, 2008).

On ne peut définir une essence sans définir sa méthode d'extraction. Selon la pharmacopée européenne (AFSSAPS, 2008) : « Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement par la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » Selon AFNOR (Association Française de Normalisation), les huiles essentielles sont des produits généralement odorants, obtenus soit par entraînement à la vapeur d'eau, de végétaux ou de

parties de végétaux, soit par expression du péricarpe frais de certaines citrus. Cette définition excluant les essences obtenues par d'autres procédés d'extraction.

b. Répartition des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles (Mann, 1987) telles que les Conifères, les Rutacées, les Ombellifères, les Myrtacées, les Lamiacées, les Poacées. Elles sont présentes dans différents organes végétaux producteurs, variant en fonction de la zone productrice du végétal (Lamendin, 2004 ; Raf et al.,1995) : les sommités fleuries (lavande, menthe, etc.), dans les racines ou rhizomes (ex: vétiver, gingembre), dans les écorces (ex: cannelles), le bois (ex: camphrier), les fruits (ex: citron), les graines (ex: Muscade) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches (Lonic-Marinier & Lobstein, 2013). Les HE peuvent être accumulées dans tous les types d'organes végétaux par exemple des fleurs (oranger, rose, lavande) mais aussi des feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier noble) et bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, camphrier, santal), des racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits secs (anis, badiane, persil), des graines (muscade) (AFSSAPS, 2008) . La biosynthèse et l'accumulation des molécules aromatiques sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées. Ces structures, sont souvent situées sur, ou à proximité de la surface de la plante et elles varient selon les familles botaniques, poils sécréteurs externes dans le cas des Labiées et des Géraniacées, cellules sécrétrices dans le cas des Lauracées, des Magnoliacées et des Pipéracées, poches sécrétrices dans le cas des Myrtacées et des Aurantiacées et canaux sécréteurs pour les Ombellifères et les Conifères (Haddouchi & Benmansour, 2008).

c. Caractères physico-chimiques des HE

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaibles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (AFSSAPS, 2008). Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont pour la plupart colorées (rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal). Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation

de flacons en verre opaque est conseillée (Lonic-Marinier & Lobstein, 2013). Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (AFSSAPS, 2008).

d. Facteurs influençant la composition chimique des HE

La composition des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation (Merghache et al., 2009 ; Boukhatem et al., 2010 ; Sui et al., 2012; Karamanos & Sotiropoulou, 2013; Zaouali et al., 2013 ; Wu et al., 2013). L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par la spectrométrie de masse (SM). La résonance magnétique nucléaire (RMN) peut également être utilisée pour identifier les constituants des huiles essentielles (Boukhebt et al., 2011 ; Darriet-Giudicelli, 2011).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants aux concentrations différentes. Elles sont cependant caractérisées par 2 à 3 composés majoritaires présents relativement en forte concentration, de 20 à 70% par rapport aux autres constituants présents parfois sous forme de traces et qui confèrent aux HE leurs propriétés thérapeutiques (Bakkali et al., 2008). La plupart des composants des HE sont inclus dans deux groupes selon la voie métabolique empruntée: les composés terpéniques (hydrocarbures) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (composés oxygénés). Les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées: la voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique pour les terpènes et la voie de l'acide shikimique pour les dérivés du phénylpropane (Amlan, 2011 ; Djilani & Dicko, 2012). Les terpénoïdes représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15 000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène. Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en: monoterpénoïdes (C₁₀), sesquiterpénoïdes (C₁₅) et diterpénoïdes (C₂₀). Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes C₁₀ et les sesquiterpénoïdes C₁₅ forment la majeure partie qui peut être extraite par distillation. Les autres terpènes (diterpènes C₂₀ et triterpènes C₃₀) n'étant pas entraînés par la vapeur d'eau (Calsamiglia et al., 2007 ; Amlan, 2011 ; Couic-Marinier & Lobstein, 2013b).

Les composantes des huiles essentielles sont classés selon :

- Leurs fonctions : alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole)
- Leurs structures : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol).

Les phénylpropanoïdes sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine. Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (Calsamiglia et al., 2007 ; Bakkali et al., 2008).

e. Contrôle de la qualité des HE

Les huiles essentielles doivent répondre à des normes analytiques, établies par des commissions nationales et internationales d'experts et imposées par les pays importateurs ou exportateurs. Les points de contrôle à effectuer pour se prémunir de la falsification des huiles essentielles et éviter les confusions entre les différentes espèces concernent l'origine géographique, l'espèce botanique, l'organe producteur (feuilles, fleurs, fruits, écorces, etc.) et les caractéristiques physico-chimiques (couleur, odeur, densité et indice de réfraction). Tout ceci permettra d'utiliser une appellation présente dans la nomenclature botanique internationale (Bego, 2003).

L'Institut de Normalisation Scientifique d'Aromatologie INSA a retenu trois critères pour conférer aux huiles essentielles le label «HEBBD» : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie (Lamendin, 2004). Il s'agit de :

- L'espèce botanique
- L'organe producteur
- Le chémotype ou chimiotype de la plante retrouvé grâce à une analyse chromatographique et spectrométrique identifiant les molécules contenues dans l'huile essentielle.

f. Procédés d'extraction des HE

La quantité d'huile essentielle contenue dans les plantes est toujours faible, parfois très faible, voire infime. Il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle. L'extraction des HE est certainement la phase la plus délicate. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal. Il existe différents procédés

d'extraction, mais le choix de la méthode utilisée définit obligatoirement la nature de l'essence ainsi que son éventuelle utilisation.

L'entraînement par la vapeur ou l'hydro-distillation de la plante fraîche ou sèche reste la technique la plus utilisée. On distingue les procédés suivants :

- ✚ Extraction par expression à froid
- ✚ Extraction par distillation et entraînement à la vapeur d'eau
- ✚ Hydro-distillation ou distillation à l'eau
- ✚ Enfleurage
- ✚ Extraction par les solvants organiques
- ✚ Extraction par le CO₂.

g. Méthodes d'analyse des HE

Quel que soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste en des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (Joulain, 1994).

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et désorptions successives sur la phase fixe, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase (Schwedt, 1993). Plusieurs méthodes existent :

- Chromatographie sur couche mince (CCM)
- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)
- Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)
- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

h. Toxicité des HE

Bien que d'origine naturelle, les huiles essentielles peuvent se révéler dangereuses pour la santé. Il est ainsi important de connaître le produit, le choisir selon des critères qualitatifs rigoureux (produit de qualité non falsifié, non contaminé par des pesticides), de respecter

scrupuleusement les doses et de choisir le mode d'administration adéquat, et ce afin d'éviter la survenue d'effets indésirables, voire même des interactions avec d'autres médicaments. Ainsi, les huiles essentielles peuvent s'avérer allergisantes, photosensibilisantes, cytotoxiques, irritantes, néphrotoxiques, hépatotoxiques, neurotoxiques, etc. On distingue :

- la Toxicité par voie orale,
- la toxicité dermique
- la Cytotoxicité
- la Neurotoxicité.

i. Activité antimicrobienne des HE

Les propriétés médicinales des huiles essentielles sont nombreuses : antispasmodique, expectorant, rafraîchissant, diurétique, antiseptique. Cependant, dans ce travail, nous allons nous limiter à leurs propriétés antimicrobiennes qui constitueront l'essentiel de notre étude de recherche.

Les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles sont bien connues et bien documentées. En effet, de nombreux travaux de recherche ont mis en évidence leur puissante activité antiseptique agissant aussi bien sur les bactéries, les champignons pathogènes que sur les virus (Safaei-Ghomi & Ahd, 2010 ; Belletti et al., 2008) leur conférant ainsi diverses indications thérapeutiques.

j. Activité bactéricide et bactériostatique des HE

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été la plus étudiée. On distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur ces microorganismes :

- Effet bactéricide (bactéricidie) : exerçant une activité létale
- Effet bactériostatique (bactériostase) : entraînant une inhibition de la croissance.

Cependant, il a été démontré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides (Kunle et al., 2003). En effet, des dommages au niveau des cellules de différents microorganismes ont été rapportés et illustrés par microscopie électronique. Citons l'effet bactéricide des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols sur *Staphylococcus aureus* (Desjobert et al., 1997), ou encore celui de l'*Origanum compactum* sur *Escherichia coli* (Burt & Reinders, 2003).

Toutefois, cette action bactéricide des huiles essentielles sur la cellule bactérienne demeure encore insuffisamment élucidée (Lakhdar et al., 2012).

Plusieurs mécanismes seraient mis en jeu :

- Précipitation des protéines et des acides nucléiques (Rafi et al., 1994).
- Inhibition de la synthèse des macromolécules (AND, ARN, protéines et peptido-glycane) (Combe et al., 1988).
- Inhibition de la perméabilité membranaire sélective (Bouchikhi, 1994) et détérioration membranaire.
- Inhibition de la glycolyse et déplétion potassique (Cox et al., 1998).
- Modification de la morphologie de la cellule bactérienne (Pattnaik, 1995).
- Absorption et formation d'un film autour de la cellule bactérienne avec inhibition des processus de respiration, d'absorption et d'excrétion (Rafi et al., 1994).

k. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE

L'efficacité antimicrobienne des HE dépend de deux principaux paramètres : l'huile essentielle et sa composition chimique d'une part, et le microorganisme (type, structure, etc.) d'autre part (Kalemba & Kunicka, 2003).

l. Activité liée à la composition chimique

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique (Lahlou, 2004).

De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés isolément. Cependant, il existe des différences quantitatives. En effet, il a été prouvé que l'effet antimicrobien des HE est supérieur à celui des composés majoritaires de l'huile testés séparément (Didry et al., 1993 ; Lahlou, 2004). Selon l'étude de Lambert et al. (2001), les composés chimiques des HEs, connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre, sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures (Cosentino et al., 1999 ; Dorman & Deans, 2000).

Les phénols, dont le thymol et l'eugénol, sont responsables de l'activité bactéricide des HE (Cox et al., 2000 ; Lambert et al., 2001 ; Burt & Reinders, 2003). Ils produisent des dégâts irréversibles au niveau de la membrane (Pibiri, 2006). Cependant, il est à signaler que les phénols seuls ne sont pas responsables de l'intégralité de l'activité des HE; les autres composés chimiques doivent également être pris en compte (Cosentino et al., 1999). De leur part, les alcools sont généralement plus connus pour leur activité létale que bactériostatique

sur les cellules végétatives, en dénaturant les protéines (Dorman & Deans, 2000). Quant aux aldéhydes, fortement électronégatif à double liaison, deviennent de puissants agents antimicrobiens en réagissant avec les composés nitrés vitaux (protéines et acides nucléiques) des bactéries (Desjobert et al., 1997 ; Dorman & Deans, 2000).

m. Activité liée aux microorganismes

Une HE peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganismes (à Gram positif ou à Gram négatif), à sa forme planctonique ou en biofilm, à son métabolisme et à sa résistance.

En effet, les bactéries à Gram positif seraient plus résistantes aux HE que les bactéries à Gram négatif (Zaika 1988 ; Santos & Novales, 2012).

Par ailleurs, l'activité antimicrobienne des HE diffère selon que la bactérie croît en forme planctonique ou au sein d'un biofilm bactérien. La résistance bactérienne aux HE, comme pour tout agent antimicrobien, semble être liée à la formation du biofilm (Alviano & Alviano, 2009).

n. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne des HE *in vitro*

La détermination du pouvoir antimicrobien des HE fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Cependant, des difficultés pratiques liées à l'insolubilité des constituants des HE dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes, peuvent avoir une influence sur les résultats. Les différents protocoles peuvent ainsi être classés selon :

1. Le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'HE, soit liquide, solide ou gazeux,
2. La nature du contact de l'HE avec le germe : diffusion sur disque, en puits, en solution alcoolique ou dispersion dans un émulsifiant. Une première étape consiste à faire un «screening» ou une sélection des huiles ayant un effet antimicrobien potentiel. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative.

Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antimicrobienne des HE sélectionnées, et ce en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de ces huiles. La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après incubation, et la CMB comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui tue 99,9% des microorganismes après sous-culture sur milieu sans antibiotique (Andrews, 2001 ; Cosentino et al., 1999).

3 Techniques de screening des HE

a. Aromatogramme

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des HE (Girault et Bougeon, 1971). Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences préalablement sélectionnées et reconnues. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier (de cellulose) de 6 mm sur lequel on dépose une quantité donnée d'HE (10 µl) (Bound et al., 1993). Après ensemencement et incubation, on mesure le diamètre des zones d'inhibition.

b. Technique de diffusion en puits

Un puits d'environ 6mm est creusé au centre de la gélose dans lequel sera coulée une quantité d'HE pure ou diluée. Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenues (pour les huiles actives) et mesurées (Dorman et Deans, 2000).

Pour ces 2 techniques, la sensibilité du germe testé peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu. En effet, la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8mm. Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (Durafourd et al., 1990).

4 Techniques de détermination de la CMI des HE

a. Techniques de diffusion en milieu solide

L'HE est mélangée aux concentrations désirées avec le milieu gélosé liquéfié par simple agitation manuelle. Après refroidissement, on ensemence et on incube (Taudou, 1990). L'adjonction d'un émulsifiant (Tween 80), inerte, stable et dépourvu d'action synergique antibiotique, peut être réalisée pour améliorer la solubilité de l'HE et sa diffusion dans la gélose (Perruci et al., 1994). Ainsi, l'HE est préparée dans une solution de Tween 80 à la concentration désirée. Le mélange est agité manuellement pendant 10 minutes, puis ajouté au milieu gélosé liquéfié. L'ensemble est coulé en boîte de pétri. L'ensemencement est effectué après refroidissement de la gélose.

b. Techniques de diffusion en milieu liquide

- **Test de microdilution** (Carson et al., 1995).

L'incorporation de l'HE dans le milieu de culture liquide se fait en utilisant un émulsifiant (Tween 80) pour préparer les solutions de l'huile essentielle à la concentration désirée. La détermination de l'activité antimicrobienne de l'HE se fait au moyen d'une microplaque de 96 puits. La détermination de la CMI est réalisée en faisant appel à un indicateur de croissance en solution (Triphényl Tétrazolium Chloride) (TTC). La croissance bactérienne est indiquée par l'apparition d'une couleur rouge de la solution témoignant de la réduction ou la précipitation du TTC. La CMI est ainsi déterminée par le dernier puits de la microplaque, par ordre décroissant de concentration, qui ne montre aucun changement de couleur. La CMB est calculée en transportant 10 µl des puits ne montrant pas de croissance bactérienne sur un milieu solide.

- **Test de macrodilution** (Onawunmi, 1989).

Le principe est le même que celui du test de microdilution, sauf qu'il est effectué dans des tubes contenant l'HE, à différentes concentrations, incorporée dans un bouillon de culture liquide. La CMI est déterminée au niveau du dernier tube ne montrant aucune croissance microbienne visible.

c. Techniques de diffusion en phase vapeur

- **Méthode des micro-atmosphères** (Kellner et Kobert 1954).

Le disque imprégné d'essence est disposé au centre géométrique du couvercle de la boîte de pétri et non plus au contact avec la gélose. La boîte est hermétiquement fermée. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte. La lecture des résultats de ce test porte sur la croissance ou non de l'inoculum, se traduisant par un halo qui sera mesuré par un pied à coulisse. Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des HE, elle met en évidence seulement la sensibilité du microorganisme testé aux constituants volatils à la température d'incubation.

PARTIE I

ETUDE BACTERIOLOGIQUE

**ETUDE DE L'AGENT PATHOGENE - ISOLEMENT ET
IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE, BIOCHIMIQUE ET
ENZYMATIQUE DES BACTERIES**

1. Contexte
2. Introduction
3. Matériel et méthodes
 - 3.1. Site d'étude
 - 3.2. Espèce de poisson étudiée
 - 3.3. Evaluation et suivi saisonnier
 - 3.4. Caractérisation biochimique et enzymatique
 - 3.5. Antibiogramme
4. Résultats
5. Discussion
6. Conclusion.

I. Contexte

- Les Domaines Agricoles importent des œufs de chez Aqualande de France et réalisent la mi- incubation des œufs ouillées.

- Depuis 1998, des mortalités saisonnières massives ont été enregistrées chaque année dans la station de pisciculture Ain Aghbal.

Les examens effectués n'ont pas été suffisants pour confirmer et identifier la présence d'agent pathogène spécifique pour expliquer ces mortalités et lutter contre. Pour cela, le diagnostic réalisé par des experts en pisciculture et leur conclusion a rapporté que les alevins de la truite arc en ciel sont très sensibles aux manipulations d'élevage et sont porteurs d'un agent pathogène d'origine bactérienne.

- La bactérie du genre *Flavobacterium* a été isolée et identifiée en 2001 en grande partie sur les alevins du Domaine probablement introduite dans les œufs importés de France. Cette bactérie a actuellement touché toutes les stations piscicoles du monde. Plusieurs travaux ont été entrepris pour éradiquer cet agent pathogène ou diminuer son impact sur la production aquacole.

En raison du taux de mortalité élevé et les pertes économiques importantes touchant ce secteur par effet des flavobactériens, un protocole expérimental a été élaboré et suivi. Il s'est basé sur une inspection saisonnière pour :

- Déterminer leur origine ;
- Déterminer les conditions environnementales impliquées dans leur développement et leur pathogénicité ;
- Déterminer le degré de température où ces bactéries perdent leur pouvoir pathogène.

II. Introduction

Au Maroc, comme en Europe, la production de poisson a doublé en dix ans, atteignant dans certains cas le stade industriel. L'aquaculture marocaine en eau froide produit principalement de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'intensification de l'aquaculture s'est accompagnée du développement de diverses maladies non infectieuses liées aux conditions environnementales, nutritionnelles et génétiques du poisson, mais également des agents pathogènes infectieux. Différents bio-agresseurs, seuls ou combinés, peuvent infecter les poissons en élevage.

L'objectif de cette étude est d'isoler et caractériser la bactérie responsable des mortalités chez les alevins de truite arc en ciel élevée au sein de la station de pisciculture Ain Aghbal à Azrou (Maroc).

A l'échelle internationale, l'élevage des salmonidés souffrent des pathologies liées au genre *flavobacterium*, dont *Flavobacterium psychrophilum* et *Flavobacterium columnare*. *F. psychrophilum* est l'agent causal de deux maladies nommées : "Rainbow Trout Fry Syndrom" (RTFS) et "Bacterial Cold Water Disease" (BCWD). Cette bactérie affecte un large éventail d'espèces hôtes de poissons qui peuplent les eaux douces froides. Cette maladie se produit de façon prédominante en eau à une température inférieure à 16°C, et elle est plus répandue et sévère à une température inférieure ou égale à 10°C. Elle se produit dans des populations des espèces particulièrement vulnérables aux infections, telles que les jeunes truitelles et saumons élevés en écloserie ou en milieu naturel. La deuxième espèce *Flavobacterium columnare* est l'agent causal de la maladie dite Colmonaris ou maladie des branchies, ce pathogène opportuniste affecte de nombreuses espèces de poissons. Sa virulence est exprimée à un intervalle de température allant de 15 à 35°C, dans lequel il peut se développer activement. *F. psychrophilum* et *F. columnare* sont les agents étiologiques de ces maladies, responsables de mortalités et de pertes économiques importantes dans l'industrie d'élevage des salmonidés dans le monde entier.

Actuellement, aucun vaccin commercial efficace n'est disponible contre ces maladies. Le traitement se fait par l'administration orale d'une gamme de composés antimicrobiens dont certains se sont avérés inactifs, or les possibilités de développement de la résistance aux antibiotiques sont élevées.

Le besoin de détecter rapidement les bactéries du genre *Flavobacterium* s'avère primordial pour réduire le taux de mortalité de la truite dans l'industrie piscicole tout en améliorant les mesures de contrôle.

Le but de cette étude est de déterminer l'origine de cette bactérie et confirmer la présence de *Flavobacterium* au niveau des œufs, des poissons, de l'eau et du biofilm au sein de la station de pisciculture Ain Aghbal. Les données recueillies seront la base de l'élaboration d'une stratégie d'atténuation des mortalités et des importantes pertes économiques connues.

III. Matériel et méthodes

1. Site d'étude

Aujourd'hui, Les Domaines Agricoles amorcent un processus de développement très ambitieux, basé sur l'extension des activités et la consolidation de l'intégration verticale.

L'entreprise est née en 1960 pour objectif, dicit son management, «de mettre en valeur les potentiels agricoles des régions défendant la notion de produits du terroir et d'être un modèle

pour l'agriculture nationale en prenant une part active dans la recherche et la diffusion de techniques agricoles respectueuses de la santé des consommateurs et de l'environnement».

Le Domaine de Ain Aghbal qui relève des DOMAINES AGRICOLES, a été créé en 1989. Son principale activité est l'élevage des truites et leur transformation. Il est à 3 km à l'ouest de la ville d'Azrou, implanté sur les eaux pures et naturelles de la source Ain Aghbal.

Ce domaine comporte deux stations piscicoles, une à Azrou dédiée à la reproduction (de l'écloserie au pré-grossissement) et la transformation des truites et une station de grossissement à 70km de la ville d'Azrou près des sources Oum Er-Rbia, profitant de la bonne qualité des eaux et du débit important toute l'année.

2 Espèce de poisson étudiée

Les truites sont des poissons téléostéens. Elles sont représentées par un genre, en particulier salmo (du latin salire, sauter) et par un grand nombre d'espèces, de sous-espèces et de variétés. Les espèces concernées par l'élevage sont : la truite fario (*Salmo trutta fario*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) provenant de l'Amérique du Nord.

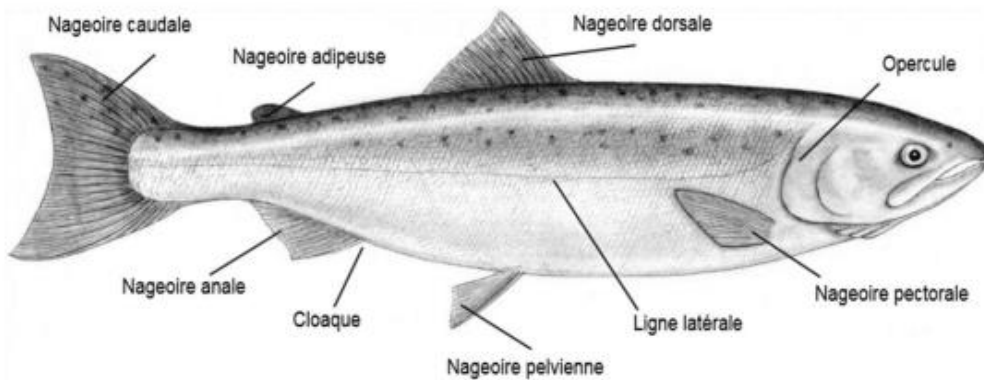


Figure 10 : Apparence générale de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum, 1792).

L'apparence générale de la truite arc-en-ciel est présentée dans la Figure 10. Les salmonidés ont un corps fusiforme, adapté à la nage en eau rapide. Cette famille se distingue également par la présence d'une nageoire adipeuse sans rayonnement osseux entre la nageoire dorsale et la nageoire caudale (Stewart et al., 2014) (Figure 11). Comme pour la plupart des autres salmonidés, la mâchoire inférieure de la truite mâle se courbe à la maturité sexuelle. Cette caractéristique permet au mâle de saisir la femelle lors de la fraie.

La taille maximale de la truite arc-en-ciel est entre 1,20 m et 1,50 m selon le sexe, pour un poids d'approximativement 23 kg (Rioux, 2000).

ANATOMIE EXTERNE



ANATOMIE INTERNE

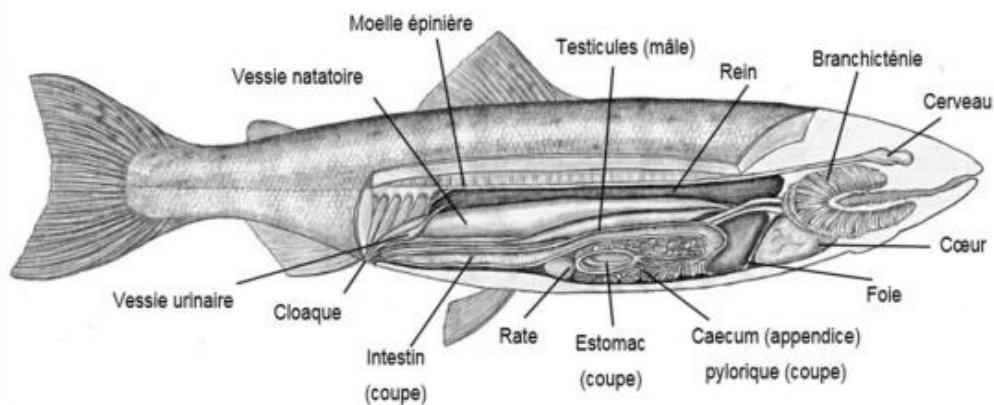


Figure 11 : Anatomie interne et externe d'un salmonidé.

La truite arc-en-ciel est sédentaire, elle vit dans les eaux froides et claires des fleuves et des lacs dans des zones à fort courant d'eau avec des rochers submergés et de la végétation aquatique (Courtemanche, 2003). On trouve également une variété dite «Truite à tête d'acier» vivant dans les estuaires, c'est la forme migratrice.

La truite, a été introduite dans toute l'Europe au XIX siècle, aujourd'hui elle est d'un intérêt économique très important puisqu'elle est présente dans de nombreuses fermes piscicoles où son élevage est bien maîtrisé.

a. Méthodologie et relation avec la phase d'élevage

La période de reproduction de la truite arc-en-ciel s'étale en hiver-printemps (Figure 12), Afin de réussir l'élevage des truites, des étapes préliminaires sont à suivre avec minutie : réception des œufs, incubation et éclosion, alevinage I et alevinage II. Elles constituent les étapes clefs qui garantissent le bien-être de l'animal tout au long du cycle d'élevage et assure le gain économique.

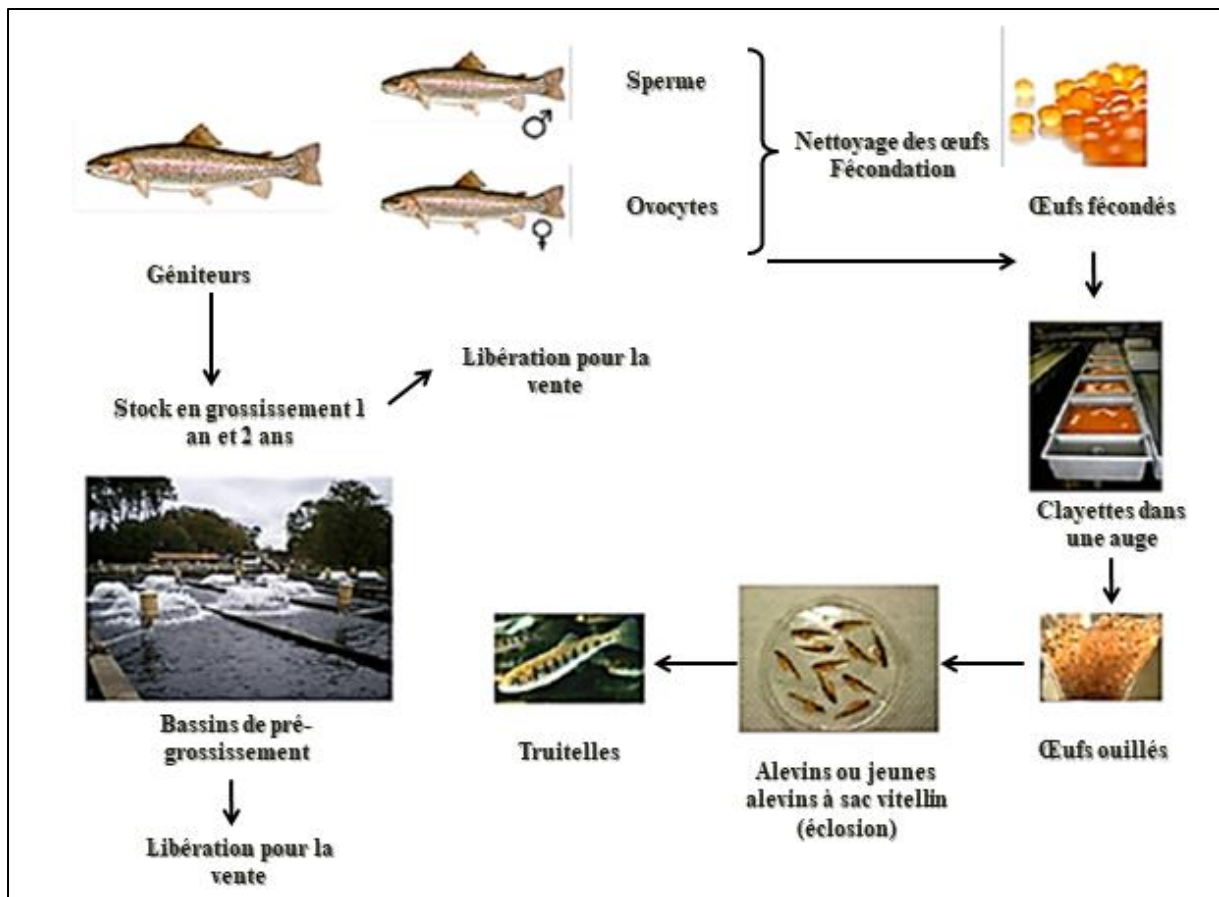


Figure 12 : Cycle d'élevage de la truite arc-en-ciel.

La truite arc en ciel ne peut pas vivre au-delà d'une certaine limite de tolérance physiologique conditionnée par les facteurs environnementaux tels que la température de l'eau, la salinité et l'apport en nourriture. Une température de l'eau supérieure à 20°C est reconnue pour être stressante chez la truite arc en ciel.

Les truites peuvent également être victimes de certaines maladies ainsi que des prédateurs et des parasites.

Les poissons sont des animaux poïkilothermes et sont donc dépendant de la température de l'eau. La truite arc-en-ciel peut vivre dans des eaux entre 0 et 25°C, avec une température optimale entre 10 et 20°C (Javaid et Anderson, 1967; Bidgood et Berst, 1969).

La taille des croquettes évolue au fil du développement (du stade alevin à l'abattage), et donc en fonction de la taille de la bouche des poissons. La nourriture se compose d'huile végétale mais aussi et encore d'huile et de farine de poisson.

La température la salinité de l'eau également vont notamment influencer la quantité d'oxygène dissous dans l'eau. Ainsi, plus l'eau est chaude, plus le taux d'oxygène dissous est bas.

b. Événements et facteurs inducteurs de maladies en élevage

Les maladies sont certainement les facteurs de stress les plus importants. Certains micro-organismes jouent un rôle considérable dans la pathologie des poissons, constituant parfois des fléaux majeurs. Elles peuvent être inféodées à une ou plusieurs espèces de poissons ; elles sont alors considérées comme de vrais pathogènes, capables d'infecter des animaux sains. La plupart ne sont cependant que des pathogènes opportunistes dont le pouvoir infectieux ne s'expriment qu'à la faveur d'un affaiblissement de ses défenses naturelles, liés aux perturbations de l'environnement ou aux pratiques d'élevage. Les élevages intensifs représentent ainsi le contexte le plus favorable au développement des pathologies bactériennes (Bernardet et al., 2006).

b.1. Transports et manipulations

Le transport des poissons entre unités d'élevage et de manière générale les manipulations des animaux sont des événements stressants. Ces manipulations peuvent être douloureuses pour l'animal et entraîner une perte de mucus et d'écailles (Ashley, 2007), et sont souvent associées à une mise hors de l'eau plus ou moins longue du poisson. Ces mises hors de l'eau entraînent une hypoxie plus ou moins importante en fonction de leur durée. Ainsi, l'étude de Vijayan et al. (1994) montre, par exemple, une augmentation du taux de cortisol chez la truite arc-en-ciel enfermée dans une épuisette pendant 3 minutes.

b.2. Densité et interactions

La densité d'élevage a également une influence sur le niveau de stress des salmonidés. La proximité entre les individus peut, en effet, augmenter les contacts entre les animaux et créer ainsi des lésions aux parties les plus proéminentes du corps, comme les nageoires. Turnbull et al. (2005) montrent que le bien-être des saumons Atlantique en cages marines, basé sur le taux de cortisol et les lésions des nageoires, est réduit à partir d'une densité d'élevage de 22 kg.m⁻³.

L'environnement aquatique est une source de contamination importante, les pathogènes peuvent y survivre et parfois s'y multiplier. Les poissons eux-mêmes sont évidemment une importante source de contamination, qu'ils soient malades ou demeurés porteurs à la suite d'une infection clinique ou inapparente.

Ce phénomène de portage, très répandu et parfois presque systématique, peut aussi être assuré par des espèces sauvages, sensibles ou non à la maladie. La transmission directe est le plus souvent horizontale mais il existe des cas de transmission verticale ; elle résulte généralement de la contamination superficielle des œufs mais la bactérie est parfois présente *in ovo* (*Renibacterium salmoninarum*, *F. psychrophilum*) (Bernardet et al., 2006).

b.3. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux (température, matières en suspension, pH, gaz toxiques dissous, parasites externes, etc.), connus pour favoriser la plupart des processus pathologiques, peuvent être déterminants dans le déclenchement de la maladie quand on a affaire à des agents de type opportuniste.

L'influence des facteurs abiotiques sur le niveau de stress des poissons est à noter par exemple, la teneur en oxygène dissous dans l'eau peut parfois être inférieure au besoin des salmonidés et engendrer ainsi un stress. La teneur en métaux lourds de l'eau d'élevage peut également engendrer un stress oxydatif chez les poissons. C'est le cas, par exemple, pour le mercure chez le saumon Atlantique (Berntssen et al., 2003).

b.4. Maladies et parasites

De nombreux virus, parasites et espèces bactériennes sont pathogènes pour les poissons, les infections les plus graves mettent en cause des agents microbiens spécifiques à des stades de croissance bien précis (Tableau 3).

Tableau 3 : Principales pathologies infectieuses rencontrées chez la truite arc-en-ciel en fonction du stade de l'élevage et des saisons (Ferra, 2008).

Stades	Mois	Parasitaires	Bactériennes	Virales
Alevins	Janvier	Saprolégnirose	Flavobactérioses	
	Février	(CuSO ₄ , H ₂ O ₂) Costiase	(Chloramine T-Florfenicol)	NPI SHV/NHI
	Mars	(Prophylaxie/Formol/H ₂ O ₂)		(Prophylaxie/Iode) (Prophylaxie - MRC)
	Avril		Yersiniose	
	Mai	Ichtyophthiriose (Points blancs)	(Prophylaxie/Iode/vaccins)	
	Juin	Gyrodactylose		
Pré-grossissement	Juillet	(Prophylaxie/Formol/sels)	Furonculose (Prophylaxie/Antibiotique/vaccins)	
	Août			Maladie du sommeil
	Septembre			(Prophylaxie)
	Octobre			
	Novembre			
Grossissement	Décembre			
	Janvier			
	Février		Corynébactériose (antibiothérapie)	Maladie du sommeil (Prophylaxie)
	Mars			
	Avril	Gyrodactylose		
	Mai	(Prophylaxie/Formol/sels)		
Maturation sexuelle	Juin			
	Juillet		Yersiniose (Prophylaxie/Iode/vaccins)	
	Août			
	Septembre		Furonculose (Prophylaxie/Antibiotique/vaccins)	
	Octobre			
	Novembre	Mycoses		
	Décembre			
	Janvier			
	Février			

MRC : maladies réputées contagieuses soumises à déclaration obligatoire (Décret n° 2008-1155 du 7 novembre 2008). En rouge, les approches mises en œuvre pour limiter l'impact des pathologies sur l'élevage

c. Intérêt

Cette étude a pour objectif spécifique de confirmer que les pathogènes du genre *Flavobacterium* sont effectivement les responsables des pertes hivernales au niveau de la production de la station aquacole Ain Aghbal au stade alevin. Cela doit être effectué à travers un diagnostic complet tout au long des étapes d'élevage:

La première étape : consiste à étudier les symptômes macroscopiques et faire un échantillonnage pour inspecter la présence et/ou l'absence de l'agent causal. Pour cela des prises d'échantillons ont été faites en tenant compte :

- Des stades d'élevage depuis l'œuf à la taille adulte,
- De la présence ou non des symptômes d'infection,
- De la saison. En effet, l'augmentation de la température de l'eau affecte le pouvoir pathogène de la bactérie.

L'isolement et les cultures bactériologiques spécifiques de *Flavobactérium spp.* ont été effectués au Laboratoire de Biologie et de Biotechnologie des Microorganismes à la Faculté de Sciences Semlalia Marrakech.

3 Evaluation et suivi saisonnier

a. Échantillonnage

Au niveau de la station Ain Aghbal, les échantillons ont été prélevés deux jours après l'arrivée du lot mensuel des œufs importés de la France en mois de Février, Avril, Aout et Novembre. Les alevins, les truitelles, l'eau et le biofilm sont prélevés des bassins d'élevage, en raison d'un échantillon par saison. Les échantillons ont été prélevés, transportés et manipulés dans les conditions d'asepsie.

Les paramètres physico-chimiques de l'eau ont été mesurés in situ à l'aide d'un oxymètre de l'eau.

Durant notre étude, l'identification des bactéries a respecté l'enchaînement classique : observation macroscopique et identification microscopique par la coloration de Gram.

Les analyses bactériologiques (isolement et identification) ; sont réalisées afin d'inspecter la présence des bactéries du genre *Flavobacterium*.

7 souches de *Flavobacterium psychrophilum* importées de France et de Suisse ont été utilisées comme référence.

4 Observation macroscopique

Nous avons utilisé deux milieux de culture spécifiques pour les espèces du genre *Flavobacterium* de type TYES et cytophaga, après incubation à 15°C pendant 7 à 10 jours, l'utilisation de ces milieux de culture est une sorte de pré-sélection phénotypique. L'observation microscopique des isolats s'est fait en utilisant un microscope électronique à fort grossissement (x1000).

Les compositions des milieux de culture utilisés sont :

1- la gélose Cytophaga modifiée. Sa composition est la suivante :

Trypton	5g
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	2g
Sodium acétate	0,4g
Agar	15g
H ₂ O	1L

Le pH est ajusté à 7,1+/- 0,2.

2- La gélose TYES :

Tryptone	5g
Extrait de levure	0,4g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,2g
Agar	15g
H ₂ O	1L

Le pH est ajusté à 7,1+/- 0,2.

Après refroidissement à 45°C, on ajoute 20 ml du lait écrémé stérile.

a. Observation macroscopique : Coloration de Gram

Avec les mêmes souches que nous avons purifiées et à partir d'une culture jeune une colonie s'est utilisée pour la réalisation de l'observation microscopique à l'aide de la technique de coloration de Gram.

a.1. Principe

La coloration de Gram a été mise au point par Hans Christian Gram en 1884. Cette coloration différentielle permet de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi

en : Bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Dennis, 2007). En effet, quand les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane puis soumises à l'action du Lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet toute la couche en peptidoglycane de la membrane des bactéries. Cependant, lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la Fushine. Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violet.

Les étapes de réalisation de la coloration de Gram sont les suivantes :

- ✓ Réaliser un frottis ou un étalement : A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on dépose une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- ✓ Prélever une colonie bien isolée avec la pipette Pasteur boutonnée et dissociée dans la goutte.
- ✓ Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- ✓ Recouvrir totalement la lame de violet de gentiane pendant 1 min.
- ✓ Rincer à l'eau en transvasant les lames.
- ✓ Recouvrir le frottis par le Lugol pendant 2 min.
- ✓ Laver à nouveau à l'eau.
- ✓ Ajouter l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette pendant une dizaine de secondes et laver rapidement à l'eau.
- ✓ Colorer à nouveau avec la solution de fuchsine diluée pendant 1 min.
- ✓ Laver à l'eau et sécher à l'air.
- ✓ Observer au microscope ordinaire à l'objectif x100 à l'huile d'immersion.

Pendant les quatre saisons de suivi, nous avons pu isoler des souches typiques à ceux des bactéries du genre *Flavobacterium* de point de vue morphologique et phénotypique. Les isolats ont été purifiés et repiqués pour subir une pré-sélection avec la coloration de Gram suivie par une caractérisation biochimique détaillée.

Les échantillons ont été manipulés le plus vite possible dans des conditions d'asepsie sous la hotte. Pour confirmer la présence de la bactérie à l'intérieur du matériel biologique, les œufs ont été écrasés dans une boîte de pétrie stérile puis le liquide obtenu estensemencé, dans des boîtes avec un milieu TYES, par la méthode d'écouvillon, pour investiguer la présence de la bactérie à la surface des coquilles des œufs.

Une autre méthode a été suivie : les œufs entiers ont été mis dans des tubes à essais contenant le bouillon TYES et mis en incubation à 15°C pendant 7 jours. Le contenu des tubes

présentant un développement bactérien a été ensemencé par technique d'étalement sur gélose TYES.

Pour les truitelles, l'isolement a été fait à partir depuis la partie extérieur, à travers des prélèvements de mucus, des nageoires saines et même des nageoires avec des ulcères. La rate, les reins et le foie sont les organes internes concernés par des ensemencements.

Pour les échantillons d'eau, nous avons utilisé une cellule de filtration et des filtres de porosité 45µm avec deux répétitions pour chaque échantillon (100ml x2), ensuite les filtres ont été déposés dans des boites de pétrie contenant la gélose TYES et mis en incubation.

Pour les échantillons de biofilm, l'isolement a été fait par écouvillon après homogénéisation de l'échantillon.

Suite aux conditions d'isolement et de culture bactériologique spécifique, l'isolement et la purification du genre *Flavobacterium spp.* a été effectué sur les mêmes milieux préalablement décrit.

5 Caractérisation biochimique et enzymatique

L'identification des bactéries se fait suivant une clé dichotomique qui va des caractères les plus vastes aux plus pointus pour aboutir à une espèce bactérienne donnée.

Chaque famille de bactéries a des caractères propres, on peut donc les rassembler facilement avec des caractéristiques de base comme l'utilisation du glucose avec ou sans oxygène, la réduction des nitrates, etc. à l'aide des galeries d'identifications biochimiques (Api 20E et Api 20NE). Les tests réalisés sont :

- a. Test de catalase : Il a été réalisé selon le protocole expérimental décrit par Prescott et al. (2003). Il consiste à mettre sur une lame de verre propre une goutte de H₂O₂ à 10V, puis la mettre en contact direct avec une colonie isolée prélevée directement du milieu solide à l'aide d'une anse en plastique d'usage unique afin d'éviter l'oxydation. La présence des bulles révèle un résultat positif.
- b. Test d'oxydase : L'activité oxydase a été déterminée par la méthode des bandelettes d'oxydases. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, on dépose une colonie sur la bandelette. La réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette.
- c. Test de Caséine : nous avons utilisé le cytophaga agar supplémenté avec 20% du lait écrémé, le résultat positif est indiqué par un éclaircissement du milieu de culture.

- d. Test de Gélatine : méthode Marchal et Bourdon (1973) : Dans ce cas, nous avons utilisé le cytophaga agar supplémenté avec 4% de gélatine. Après incubation, la lecture des résultats se fait après ajout du réactif de Frazier qui permet de mettre en évidence la dégradation de Gélatine par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.
- e. Test d'amylase : nous avons rajouté 1g d'amidon par 100ml de milieu de culture cytophaga agar. Après incubation, l'ajout du lugol sur les stries en gélose amidonnée change la couleur en bleu. La présence d'halo montre le résultat positif.
- f. Test chitinase : chitine-agar préconisée par Hsu et Lockwood (1975) : 4g de chitine est ajouté au milieu de culture puisensemencé et incubé 10 jours. L'apparition d'une zone claire autour des colonies révèle une activité positive.
- g. Test de croissance en milieu additionné avec 2% de NaCl : le milieu de culture TYES enrichi avec 2% de NaCl estensemencé avec les isolats et mis en incubation pendant 7 à 10 jours. La poussée des colonies indique un résultat positif.
- h. Test de croissance en milieu TSA : les isolats ont étéensemencés dans des boîtes de pétrie contenant le milieu de culture ordinaire (TSA) et mis en incubation pendant 7 à 10 jours. La poussée des colonies indique un résultat positif.
- i. Test de croissance à une température au-delà de 30°C : des boîtes de pétrie, contenant le milieu de culture TYES, ont étéensemencées avec les souches de bactéries testées et mis en incubation pendant 7 à 10 jours. La poussée des colonies indique un résultat positif.
- j. Test de dégradation et fermentation des sucres, test d'indole, test d'urée, etc. : nous avons utilisé les galeries Api 20E et Api 20NE.
- k. Test de flexirubin type pigmentation : une colonie bien isolée est couverte avec du KOH aqueux à 20%. Le changement de couleur jaune ou orange de la colonie en rouge, marron ou violet révèle un résultat positif.
- l. Test de "gliding motility"- mouvement par glissement : La préparation des gouttes suspendues est un type spécial de montage humide (dans lequel une goutte de milieu contenant les organismes est placée sur une lame de microscope), elle est souvent utilisée sous un éclairage sombre pour observer la motilité des bactéries. Dans cette méthode, une goutte de culture est placée sur une lamelle recouverte de vaseline (ou de tout autre matériau collant). La lamelle et la goutte sont ensuite inversées sur le

puits d'une glissière de dépression. La goutte est suspendue à la lamelle et la vaseline forme un sceau qui empêche l'évaporation. Cette préparation donne une bonne vision de la motilité microbienne.

m. Test d'absorption du Rouge Congo : ce test est réalisé selon la méthode décrite par Startner et George (1987). Les souches individuelles sont ensemencées en stries sur le milieu gélosé TYES contenant le rouge de Congo à une concentration finale de 50µg/ml, puis incubées à 15°C pendant 7 à 10 jours. La liaison au rouge de Congo est marquée par l'observation (obliquement sous une lumière réfléchiée et sur un fond noir) de colonies en rouge matte à brillant avec une filtration de la couleur à partir du milieu autour de l'inoculum. La réaction négative est marquée par une couleur orange claire avec absence de filtration.

6 Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques à concentrations connues. Dans notre étude, on a utilisé des disques d'antibiotiques à des concentrations différentes.

a. Principe

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisés par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard imprégnés d'antibiotiques à tester sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu de culture, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

b. Technique

Les antibiogrammes ont été effectués selon les recommandations indiquées dans le référentiel EUCAST (2012). Les colonies ont été suspendues dans de le bouillon TYES pour obtenir une culture bactérienne avec une turbidité de 0,5 McFarland. Nous n'avons pas utilisé la gélose Mueller-Hinton car les conditions expérimentales de cette étude sont exceptionnelles, vu que les souches de *Flavobacterium spp.* ne croissent pas sur la gélose Mueller-Hinton (Michel et al., 2005), ce qui ne permettait pas l'interprétation des antibiogrammes ; alors la suspension était ensuite étalée sur une gélose TYES, à l'aide d'un écouvillon stérile. Les disques d'antibiotiques étaient ensuite déposés sur la gélose.

Nous avons veillé à ne pas dépasser un délai de 15 minutes entre la préparation de la suspension, l'étape d'ensemencement, le dépôt des disques et l'incubation des boîtes (pour que la densité de la suspension bactérienne ne change pas) (SMAMM, 2016). Après

l'incubation à 15°C pendant 7 jours, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une règle, puis de comparer les valeurs trouvées aux valeurs critiques.

La mesure de ces diamètres permet de classer la bactérie en 3 catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I) et Résistante (R).

IV. Résultats

1. Qualité de l'eau et échantillonnage

Les paramètres physico-chimiques de l'eau alimentant la station de pisciculture Ain Aghbal rapportent que l'eau a un pH légèrement alcalin de 7,2 à 8,1.

Concernant la température, des degrés élevés ont été marqués durant l'été (17,9 °C) avec une corrélation opposé par rapport au taux d'oxygène, dont les taux minimal ont été notés durant cette saison. Vue que l'espèce de poisson en question devient stresser parce qu'elle est sensible aux fluctuations des concentrations d'oxygène, des aérateurs sont utilisés pour augmenter les concentrations de l'oxygène durant les périodes estivales.

Toutefois, une température très faible de 8.5°C et une saturation en oxygène dissous de 93 % ont été notés pendant l'hiver.

Tableau 4 : Paramètres physiques de l'eau d'élevage.

Saisons	pH	T°C	%O₂
Hiver	8.1	8.5	93
Printemps	7.6	15.5	87
Été	7.2	17.9	79
Automne	7.4	12.4	99

2 Caractérisations phénotypiques, macroscopiques

La culture des bactéries a été réalisée sur gélose TYES (Figure 13), après incubation à 15°C pendant 7 à 10 jours, l'observation des boîtes de pétrie a révélé la présence des colonies pigmentées de couleurs variant du jaune pâle au orange vif, convexes ou peu convexes, lisses, brillantes à bordure entière ou bien rugueuses et adhérentes à la gélose (Tableau 5).

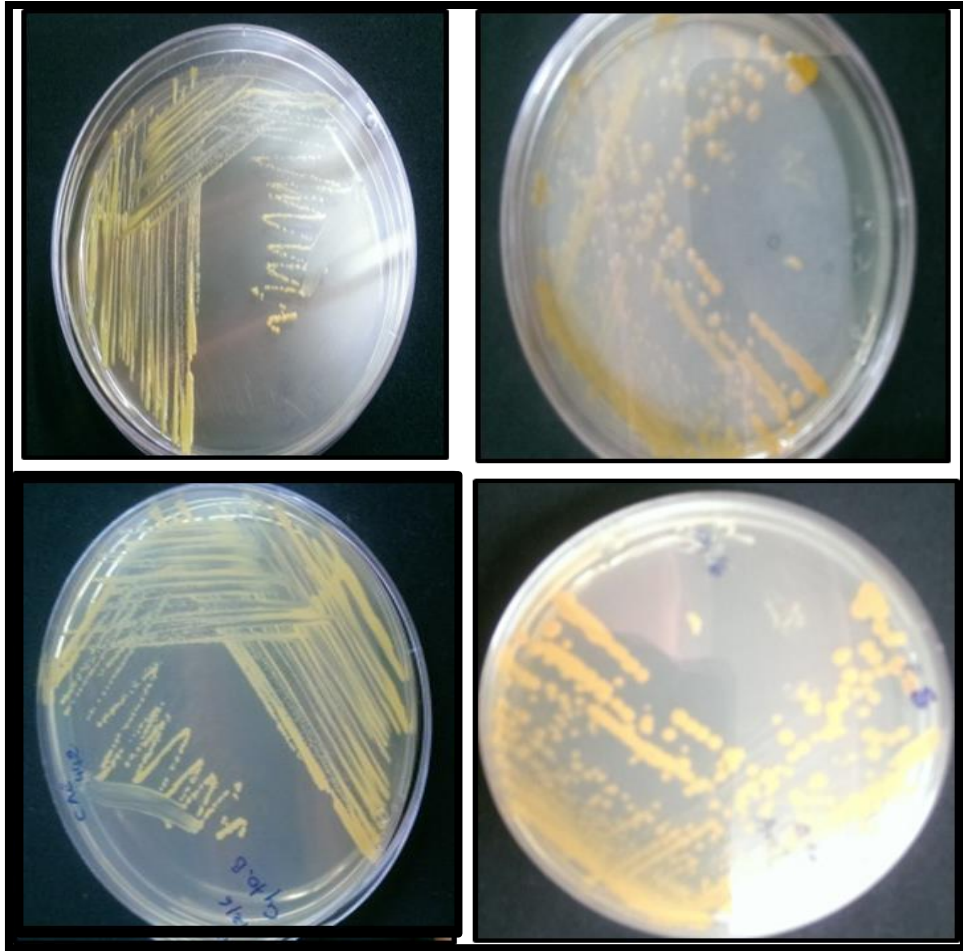


Figure 13 : Culture de *Flavobacterium spp.* sur gélose TYES.

3 Caractérisations phénotypiques, microscopiques

Nos isolats sont tous des bactéries Gram négatif en forme de bâtonnet (Figure 14), adoptent un mouvement par glissement selon la méthode de la goutte suspendue, avec catalase et oxydase positif, se développent à des températures ne dépassant pas 20°C à une période d'incubation allant de 7 à 10 jours, avec un maximum de 1% de NaCl toléré et ils ne poussent pas dans le milieu de culture ordinaire TSA.

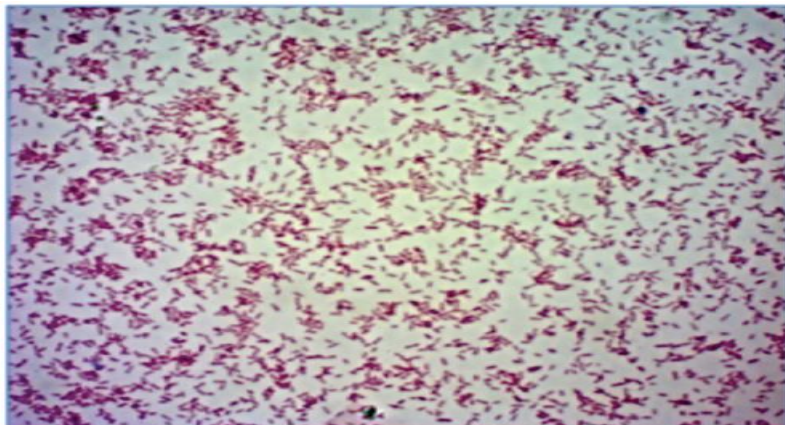


Figure 14 : Observation microscopique en coloration de Gram de *Flavobacterium spp.*

Tableau 5 : Résultats des caractérisations macroscopique et microscopique.

	Code	Caractère phénotypique	Type des colonies	Adhésion à la gélose	Gram	M.G
Isolats de l'Hiver	201	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	202	orange	lisse brillante	Non	BG -	P
	203	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	204	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
	205	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
Isolats du Printemps	401	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
	402	orange brique	lisse brillante	Non	BG -	P
	403	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	404	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	405	orange fluorescent	lisse brillante	Non	BG -	P
	406	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	407	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
	408	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	409	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
Isolats de l'Eté	901	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	902	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	903	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	904	orange fluorescent	lisse brillante	Non	BG -	P
	905	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	906	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	907	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	908	jaune vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	909	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	910	orange brique	lisse brillante	Non	BG -	P
	911	orange fluorescent	lisse brillante	Non	BG -	P
	912	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	913	jaune vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	914	jaune vif	lisse brillante	Non	BG -	P
Isolats de l'Automne	111	orange vif fluorescent	lisse brillante	Non	BG -	P
	112	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
	113	jaune vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	114	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P

	115	jaune vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	116	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
	117	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	118	orange vif	lisse brillante	Non	BG -	P
Souches de référence	442	jaune vif	lisse brillante	Non	BG -	P
	445	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	817	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	733	orange Claire	lisse brillante	Non	BG -	P
	738	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
	607	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P
	760	jaune pale	rugueuse	Oui	BG -	P

BG- : Bacille à Gram négatif / M.G : Mouvement par glissement

4 Caractérisations biochimique et enzymatique

Quant aux caractères biochimiques, les isolats de la station Ain Aghbal, ainsi que les souches de référence ont montré une diversification importante. Cependant, elles sont incapables de fermenter les glucides (Tableau 6).

La caractérisation enzymatique des isolats a montré qu'elles sont capables de dégrader la caséine, la gélatine mais elles ne peuvent pas dégrader la chitine (Tableau 7).



Photo 1 : Résultats d'identification de quelques isolats (a : galerie Api 20E / b : galerie Api 20NE).

Les résultats des analyses phénotypiques et biochimiques des isolats d'hiver ont montré une hétérogénéité importante (Tableaux 5 et 6). Ces variations se retrouvent, d'une part, au niveau de la morphologie des colonies avec des formes lisses et rugueuses et de couleurs variant entre jaune pâle et orange vif, et d'autre part, des différences sont aussi trouvées au niveau des réactions biochimiques et dans les résultats de la production des enzymes.

Pour le second échantillonnage effectué au printemps, nous avons pu isoler le pathogène à partir de l'eau et du biofilm formé au niveau des bassins d'élevage, en plus des échantillons des œufs et des poissons avec ou sans signes cliniques. Les résultats viennent confirmer ce que nous avons trouvé après analyses des souches isolées lors du premier échantillonnage avec la même hétérogénéité phénotypique, biochimique et enzymatique.

Les résultats de l'analyse de l'échantillonnage de l'été montrent une similarité au niveau des tests biochimiques et enzymatique de l'ensemble des isolats à l'exception de deux souches, où la variation phénotypique est toujours là.

Quant à la dernière saison, la totalité des isolats sont de profil enzymatique homogène, les différences observées sont au niveau des profils phénotypiques et biochimiques des isolats.

En ce qui concerne les souches de référence importées de France et de Suisse, elles présentent aussi des profils phénotypique, biochimique et enzymatique différents.

5 Test de sensibilité aux antibiotiques

Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques par la méthode d'antibiogramme en milieu gélosé sont illustrés dans le tableau (8). Les profils de résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques utilisés indiquent qu'elles ne sont pas des souches sauvages ce qui signifie qu'elles ont déjà acquis des résistances au fil du temps.

Tableau 6: Caractérisation biochimique des isolats et des souches de référence.

	Code	% NaCl toléré	Rouge de congo	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	IND	SUCRES	F.P.T
Isolats de l'Hiver	201	1	P	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N
	202	1	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	203	1	P	P	N	N	N	P	N	P	N	N	N
	204	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P
	205	0.5	P	N	P	P	P	P	N	N	N	N	N
Isolats du Printemps	401	0.5	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	402	1	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N
	403	1	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N
	404	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P
	405	1	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	406	1	P	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N
	407	1	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	P
	408	1	P	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N
	409	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
Isolats de l'Eté	901	1	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N
	902	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	903	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P
	904	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	905	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	906	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	907	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N

	908	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	909	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	910	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	911	1	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N
	912	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	913	0.5	P	N	P	N	P	P	N	N	N	N	N
	914	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
Isolats de l'Automne	111	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	112	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P
	113	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	114	1	P	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N
	115	0.5	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N
	116	0.5	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	117	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P
	118	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P
Souches de référence	442	1	P	N	N	N	N	P	N	P	N	N	N
	445	1	P	P	N	P	N	P	N	P	N	N	N
	817	1	P	P	P	P	P	P	N	P	N	N	N
	733	1	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N
	738	1	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N
	607	1	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P
	760	1	P	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N

P : résultat positif / N : résultat négatif

Tableau 7 : Caractérisation enzymatiques des isolats et des souches de référence.

	Code	Catalase	Oxydase	Caséinase	Gélatinase	Chitinase
Isolats de l'Hiver	201	p++	p	p	p	N -
	202	p++	p	p	p	N -
	203	p++	p	p	p	N -
	204	p++	p	p	p	N -
	205	p++	p	p	p	N -
Isolats du Printemps	401	p++	p	p	p	N -
	402	p++	p	p	p	N -
	403	p++	p	p	p	N -
	404	p++	p	p	p	N -
	405	p++	p	p	p	N -
	406	p++	p	p	p	N -
	407	p++	p	p	p	N -
	408	p++	p	p	p	N -
	409	p++	p	p	p	N -
Isolats d'Eté	901	p++	p	p	p	N -
	902	p++	p	p	p	N -
	903	p++	p	p	p	N -
	904	p++	p	p	p	N -
	905	p++	p	p	p	N -
	906	p++	p	p	p	N -
	907	p++	p	p	p	N -
	908	p++	p	p	p	N -
	909	p++	p	p	p	N -
	910	p++	p	p	p	N -
	911	p++	p	p	p	N -
	912	p++	p	p	p	N -
	913	p++	p	p	p	N -
	914	p++	p	p	p	N -
Isolats de l'Automne	111	p++	p	p	p	N -
	112	p++	p	p	p	N -
	113	p++	p	p	p	N -
	114	p++	p	p	p	N -
	115	p++	p	p	p	N -
	116	p++	p	p	p	N -
	117	p++	p	p	p	N -
	118	p++	p	p	p	N -
Souches de référence	442	p++	p	p	p	N -
	445	p++	p	p	p	N -
	817	p++	p	p	p	N -
	733	p++	p	p	p	N -
	738	p++	p	p	p	N -
	607	p++	p	p	p	N -
	760	p++	p	p	p	N -

P++ : Catalase positif fort / P : Oxydase positif

Tableau 8 : Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques.

	Les souches	Antibiotiques					Pourcentage (%) de résistance
		Chloramphénicol (30µg)	Oxytétracycline	Néomycine (30µg)	Amoxiciline (10µg)	Ampiciline (10µg)	
Isolats de l'Hiver	201	S	S	R	R	R	60
	202	R	R	R	R	R	100
	203	R	R	R	R	R	100
	204	S	R	R	R	R	80
	205	S	R	R	R	R	80
Isolats du Printemps	401	S	R	R	R	R	80
	402	S	R	R	R	R	80
	403	S	R	R	R	R	80
	404	R	R	R	R	R	100
	405	S	S	R	R	R	60
	406	R	R	R	R	R	100
	407	S	R	R	R	R	80
	408	R	R	R	R	R	100
	409	R	R	R	R	R	100
Isolats de l'Été	901	R	R	R	R	R	100
	902	R	R	R	R	R	100
	903	R	R	R	R	R	100
	904	S	R	R	R	R	80
	905	S	R	R	R	R	80
	906	S	R	R	R	R	80

	907	S	R	R	R	R	80
	908	S	R	R	R	R	80
	909	R	R	R	R	R	100
	910	S	R	R	R	R	80
	911	S	R	R	R	R	80
	912	R	R	R	R	R	100
	913	S	R	R	R	R	80
	914	S	S	R	R	R	60
Isolats de l'Automne	111	S	S	R	R	R	60
	112	S	R	R	R	R	80
	113	S	R	R	R	R	80
	114	R	R	R	R	R	100
	115	S	R	R	R	R	80
	116	S	R	R	R	R	80
	117	S	S	R	R	R	60
	118	R	R	R	R	R	100
Souches de référence	442	R	R	R	R	R	100
	445	R	R	R	R	R	100
	817	S	S	R	R	R	60
	733	S	S	R	R	R	60
	738	R	R	R	R	R	100
	607	R	R	R	R	R	100
	760	R	R	R	R	R	100

S : sensible / R : résistante

Les résultats des antibiogrammes ont été analysés pour définir la sensibilité des bactéries. Les référentiels du CLSI et l'EUCAST ont défini des critères d'interprétation pour des quantités données d'antibiotiques dans les disques qui sont différents entre eux. Dans les conditions choisies dans cette étude, certains critères d'interprétation n'ont pas été utilisés car les charges de disques utilisées ne sont pas disponibles dans l'un ou l'autre des référentiels et aussi à cause de l'utilisation d'un milieu de culture autre que Mueller Hinton. Les souches ayant acquis des résistances à 3 classes d'antibiotiques et plus, les bactéries sont dites multi-résistantes (Magiorakos et al., 2012) (Figure 15).

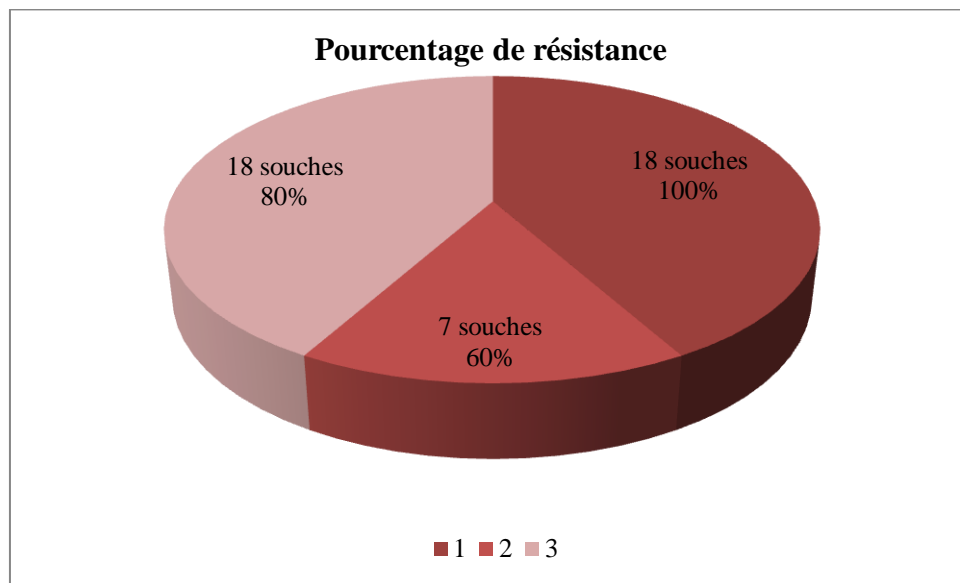


Figure 15 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des bactéries.

Les diamètres d'inhibitions classent les bactéries en sensibles, intermédiaires et résistantes. Or CLSI (2015, 2016b) et EUCAST (2018) ont considéré que les bactéries classées intermédiaires ou résistantes possèdent un mécanisme de résistance ; donc, elles ont été toutes considérées comme résistantes.

Lorsqu'une souche est résistante à une molécule testée *in vitro*, elle est alors considérée comme résistante à la classe d'antibiotique correspondante, CASFM (2018).

Nous avons trouvé que 93 % de nos isolats sont résistantes à plusieurs antibiotiques.

V. Discussion

La recherche sur les flavobactéries est essentielle en raison de leur rôle en tant qu'agents étiologiques importants de la maladie et de leur importance dans l'écologie microbienne.

Afin d'identifier la cause bactérienne de la mortalité parfois massive de la truite arc-en-ciel au niveau de la station de pisciculture Ain Aghbal, soupçonnée due à un ou plusieurs pathogènes

du genre *Flavobacterium*, nous avons procédé à des prélèvements saisonniers avec des analyses macroscopiques et microscopiques, des tests biochimiques et enzymatiques en comparant les résultats obtenus à ceux des souches de référence de l'espèce *Flavobacterium psychrophilum* importées de France et de la suisse. Au fil des années de nombreux chercheurs ont observé des épidémies similaires chez les poissons d'élevage et ils ont pu isoler des bactéries pigmentées jaunes chez des poissons atteints (Rucker et al., 1949 ; Rucker et al., 1952 ; Bullock, 1972). Wakabayashi (1980) a réussi à récupérer une bactérie à pigmentation jaune chez des salmonidés d'élevage en éclosérie originaires du Japon et de l'Oregon qui était différente de celles utilisées dans les études susmentionnées de Rucker et de Bullock. La littérature sur la santé des poissons regorge des rapports sur les maladies des poissons associées à des bactéries à pigmentation jaune non identifiées ou partiellement caractérisées, appelées *Cytophaga spp.* et des bactéries apparentées à *Flexibacter spp.*, des espèces apparentées à *Flavobacterium* et "myxobacteria" (Austin et Austin, 2007 ; Wood, 1968 ; Bullock et McLaughlin, 1970 ; Lien, 1988 ; Kent et al., 1988 ; Pepin et al., 1993 ; Frelier et al., 1994 ; Starliper, 1992), beaucoup d'entre elles appartiennent maintenant à la famille des flavobactéries.

Cependant, les chercheurs travaillant sur ces organismes sont confrontés à des défis importants. Nombreuses flavobactéries, en particulier celles qui sont pathogènes pour les poissons, sont fastidieuses et ne se développent que sur un milieu pauvre en éléments nutritifs (Bernardet et Bowman, 2006) qui, dans de nombreuses conditions, doit être complété par une variété d'antibiotiques pour empêcher la prolifération d'autres bactéries moins fastidieuses. Le rapport et la marque des ingrédients incorporés dans ces milieux, ainsi que les conditions osmotiques, peuvent affecter la capacité à cultiver certaines flavobactéries (Lorenzen 1993; Cipriano et Teska, 1994 ; Michel et al., 1999). Pourtant, sous les conditions de culture, certaines flavobactéries trouvent des difficultés à se développer même en utilisant un milieu de culture idéal. Les principaux agents pathogènes des poissons du genre *Flavobacterium* qui sont connus pour affecter les alevins de la truite arc en ciel sont *F. columnare* et *F. psychrophilum* (Bernardet et al., 2007).

Nos colonies contiennent des pigments de type flexirubine et/ou caroténoïdes non diffusibles. Ainsi, nos colonies présentent une coloration jaune pâle à jaune vif ou même orange. La croissance de nos bactéries est entre 14 à 18°C pour la plupart des isolats, bien que la croissance soit optimale à 15°C.

La température de l'eau est un facteur qui influence la viscosité, la densité, la solubilité des gaz dont, entre autres, l'oxygène nécessaire à l'équilibre de la vie aquatique. Elle agit également, sur les réactions chimiques et biochimiques ainsi que sur les activités métaboliques des organismes aquatiques, d'où son influence sur la diversité génétique et fonctionnelle de la microflore (Chaouay et al., 2016). Les températures enregistrées dans les bassins d'élevage de la station varient en fonction des périodes de prélèvements, elles sont de 8.5°C, 15.5°C, 18°C et 12.4°C respectivement en Hiver, Printemps, Eté et en Automne. La température de l'eau de source varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment les conditions météorologiques, les eaux pluviales ainsi que les éventuelles conséquences du changement climatique. Les valeurs de températures enregistrées au cours de cette étude montrent l'influence directe de l'effet saison sur la température de l'eau, et la zone étudiée est caractérisée par une saison très froide et une saison chaude. Cette même constatation a été évoquée par Ashrafi et al. (2017). Les valeurs basses de température augmentent la solubilité de l'oxygène dans l'eau, ce qui explique la haute virulence de nos bactéries durant les périodes froides. Renault et al. (2001) ont montré que ce paramètre, non seulement, affecte la diversité génétique des agents pathogènes mais aussi augmente leur virulence.

Selon Bernardet & Bowman (2006), les températures d'incubation optimales varient considérablement et dépendent des espèces, mais la plupart des espèces pathogènes pour les poissons ont une température comprise entre 15 et 25°C. Ces résultats sont en concordance avec les valeurs de température optimales de développement de nos isolats.

Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques de nos isolats permettent de différencier *Flavobacterium* des autres genres de la famille des Flavobacteriaceae. Ces caractéristiques ont été élucidés de manière approfondie par Austin et Austin, (2007) et Bernardet (2011).

Des revues approfondies ont mis en évidence l'impact que peut avoir *Flavobacterium spp.* sur les stocks de poissons (Shotts et Starliper, 1999 ; Bernardet et Bowman, 2006 ; Austin et Austin, 2007). De la même manière, les interactions complexes entre l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement ont une influence sur la virulence des pathogènes opportunistes dont les *Flavobacterium* (Renault et al. 2001 ; Moine et al., 2003 ; Ashrafi et al., 2018).

Généralement, les micro-organismes sont présents sur toutes les surfaces externes des truites et ainsi que dans les intestins du poisson vivant ou fraîchement capturé (Shewan, 1961 ; Liston, 1980). De la même façon nous avons pu isoler des bactéries durant cette étude des

différentes parties de nos poissons. La grande variabilité microbienne donne une idée sur l'état sanitaire des bassins élevage (Huss et Eskildsen, 1974 ; Shewan, 1977 ; Liston, 1980 ; Adolphe, 2006 ; Nguyen, 2008). Ces mêmes auteurs ont confirmé la pathogénicité par immersion, par voie intrapéritonéale et par voie intramusculaire chez la truite arc-en-ciel. D'ailleurs, Bowman et Nowak (2004) ont détecté *Flavobacterium spp.* dans les branchies de Saumon atlantique en filet en Tasmanie, souffrant simultanément de maladies bactériennes.

Les souches bactériennes isolées de la station Ain Aghbal sont des bactéries Gram négatif en forme de bâtonnet filamenteux, aérobies et ne possèdent qu'un métabolisme de type respiratoire (ne fermentent pas les sucres).

Les isolats sont capables de croître à des températures se situant entre 5 et 20°C. La croissance sur milieu solide est typiquement pigmentée (jaune à orange). Les colonies sont translucides (parfois opaques), circulaires (diamètre de 1-2 mm), convexes ou peu convexes, lisses, brillantes à bordure entière ou bien rugueuses, Selon Bernardet et al. (2011), les bactéries du genre *Flavobacterium* sont des bâtonnets Gram négative dont le diamètre varie entre 0,3 et 0,5 µm et de 1 à 40 µm de longueur et les colonies contiennent des pigments de type flexirubine et/ou caroténoïdes non diffusibles, non fluorescents, leur donnant une apparence jaune pâle à jaune vif.

Nos isolats sont catalase, oxydase et phosphatase positives. La cellulose, l'agar et autres hydrates de carbone à poids moléculaire élevé ne sont pas attaqués (dégradés et utilisés comme sources de carbone pour leur croissance). La majorité des souches sont protéolytiques, hydrolysant la caséine et la gélatine. La croissance optimale se produit entre 20 et 30°C pour la plupart des espèces, bien que la croissance soit meilleure entre 15 et 20°C pour les espèces les plus psychrophiles.

Les souches isolées de la station Ain Aghbal ne peuvent pas croître sur (TSA) et elles poussent seulement sur TYES agar et Cytophaga agar modifiée, avec une croissance meilleur observé dans le milieu TYES. Au niveau de la littérature, il est mentionné que la majorité des *Flavobacterium spp.* se développent sur des géloses nutritives et trypticase de soja (TSA) sans avoir besoin de facteurs de croissance, bien que les espèces pathogènes dominantes des poissons (*F. psychrophilum*, *F. columnare* et *F. branchiophilum*) ne soient pas capables de croître sur TSA. *Flavobacterium spp.* est fastidieuse et nécessite des milieux de culture spécialisés, tels que le cytophaga agar (Anacker et Ordal, 1955), le milieu de Shieh (Shieh, 1980), le milieu Hsu-Shotts (Shotts et al., 1985), le milieu à base de sels d'extrait de levure tryptone (TYES) ; (Holt, 1987), et le milieu n°2 (Starliper et al., 1992).

Certaines espèces sont capables d'oxyder les glucides, mais une forte activité protéolytique est presque universellement présente (Bernardet et al., 2011).

Les résultats du test de la production de H₂S, l'oxydation du gluconate, l'utilisation du malonate, la désamination de la phénylalanine, la production d'une arginine dihydrolase (ADH) et d'une ornithine et la lysine décarboxylase (ODC et LDC) sont variablement négatifs. Ces résultats corroborent avec les caractéristiques du genre *Flavobacterium* décrites par Gibson (1977), Holmes (1984, 1992) et Euzéby (2003).

Biert (2018) a indiqué que selon les résultats aux tests de résistance aux antibiotiques, les bactéries du genre *Flavobacterium* possèdent une pigmentation jaune ou non, produisent de l'indole, oxydent les hydrates de carbone et possèdent une activité protéolytique et finalement, survivent de façon intracellulaire ou libre («free-living») peuvent survivre à l'extérieur de l'hôte, les espèces du genre *Flavobacterium* se divisent en sous-groupes. Les études de Holmes (1984) ; Gibson (1977) et Euzéby (2003) ont démontré que cette bactérie fait partie de la flore bactérienne de la peau du poisson et de l'environnement aquatique ce qui explique l'hétérogénéité des profils biochimiques et enzymatiques trouvés.

Dans les flavobactérioses aiguës, une mortalité cumulative de 70% peut survenir parmi les stocks de poissons affectés, tandis que les survivants peuvent connaître une croissance médiocre et des anomalies de la colonne vertébrale (Austin et Austin, 2007). Dans les infections subaiguës et chroniques, la flavobactériose provoque des mortalités persistantes pouvant conduire à des pertes économiques continues (Center for Epidemiology and Animal Health, 2003).

La résistance de nos souches aux antibiotiques testés : Oxytétracycline (OTC), Néomycine (NEO), Amoxiciline (AMX) et Ampiciline (AMP) indique que ces antibiotiques ont une activité réduite contre nos isolats. Ce qui confirme les résultats trouvés par Brunn et al. (1999), vis-à-vis l'efficacité de l'utilisation de l'AMX, OXA et l'OTC contre des souches de *F. psychrophilum*. Cela signifie qu'elles avaient acquis un mécanisme de résistance aux antibiotiques, à l'exception du chloramphénicol, vis-à-vis duquel certaines souches se révèlent être sensibles. Ce résultat s'accorde fortement avec les résultats de sensibilité vis-à-vis de chloramphénicol enregistrés chez *Aeromonas salmonicida*.

L'utilisation excessive d'antibiotiques dans le contrôle des infections bactériennes au cours des années précédentes a entraîné le développement des résistances des souches d'*Aeromonas salmonicida* vis-à-vis ces antibiotiques, ce qui peut expliquer la résistance notée chez nos

isolats contre l'AMX, l'AMP et l'OTC. Plusieurs études ont démontré que les plasmides contenant des déterminants de la résistance sont souvent transférables des pathogènes des poissons. Ce transfert peut avoir lieu vers les bactéries aquatiques, et d'autres bactéries de genres différents, telle que *E. coli* (Sørum, 2006).

Furushita et al. (2003) ont noté que les gènes codant pour la résistance à la tétracycline chez les bactéries et les isolats cliniques des poissons d'une ferme Au Japon, ont montré une grande similarité suggérant qu'ils pourraient être dérivés de la même source. Ce constat peut être projeté sur nos résultats concernant la résistance des isolats aux autres antibiotiques testés.

VI. Conclusion

Les résultats trouvés confirment que *Flavobacterium* est bien le genre bactérien dominant présent dans les différents échantillons prélevés de la station Ain Aghbal (eau, organites de la truite, biofilm).

Ces bactéries du genre *Flavobacterium* sont isolées pour la première fois dans un pays semi-aride, en Afrique du Nord, le Maroc. Nous supposons qu'elles sont importées dans les œufs, à cause de leurs profils multi-résistants vis-à-vis des agents antimicrobiens ; nous les avons isolées, identifiées d'une manière biochimique et enzymatique et nous allons poursuivre avec des analyses plus profondes pour déterminer s'il s'agit du même génotype dans le but de mieux comprendre leurs mécanismes de virulence ainsi que les paramètres et facteurs influençant leur pouvoir adhésif.

En outre, il est essentiel de détecter les poissons porteurs sans signes de maladie à cause des pratiques aquacoles qui incluent de nombreux mouvements de stocks de poissons de la reproduction d'œufs fécondés (nursérie) et des alevins (écloserie) à l'adulte. Ces mouvements favorisent la propagation des maladies dites flavobactériennes provenant de poissons phénotypiquement en bonne santé (porteurs sains).

PARTIE II

ETUDE DU POUVOIR ANTIBACTERIEN DES HUILES ESSENTIELLES DES PLANTES

ET DETERMINATION DES CMI ET CMB IN-VITRO.

CHAPITRE 1

Choix et collecte des plantes - Extraction et composition chimique des Huiles Essentielles.

1. Contexte
2. Introduction
3. Matériel et Méthodes
 - 3.1. Choix des plantes
 - 3.2. Caractérisation phylogéniques des plantes choisies
 - a. Romarin
 - b. Thym
 - c. Cèdre
 - d. Lavande vraie
 - e. Sauge
 - f. Camomille sauvage
 - g. Clou de girofle
 - h. Géranium rosat
 - i. Eucalyptus
 - j. Origan
 - 3.3. Méthodes d'extraction et d'analyses
 - 3.4. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles
4. Résultats
 - 3.1 Caractéristiques physiques des HE
 - 3.2 Composition des Huiles Essentielles par CPG-SM
4. Discussion
5. Conclusion

I. Contexte

Les huiles essentielles sont des substances naturelles complexes, possédant des caractéristiques physico-chimiques bien définies, et répondant à des critères de qualité qu'il faut connaître pour éviter tout risque de toxicité qui peut se révéler dangereux pour la santé animale. Par ailleurs, ces produits présentent une grande variabilité de leurs constituants chimiques, leur attribuant de nombreuses propriétés médicinales et biologiques qu'il convient de connaître et valoriser.

II. Introduction

Dans les pays développés et les pays en voie de développement, les applications médicales de produits à base de plantes sont fréquentes utilisées dans les communautés pauvres depuis l'Antiquité (Yadaiah et al., 2011). En Afrique, Environ 60 à 80 % de la population a eu recours aux remèdes traditionnels pour se soigner contre diverses maladies (Gericke et al., 1999 ; OMS, 2002). Une revue publiée en 2018 a estimé que 58,2% de la population en Afrique subsaharienne utilisait des médicaments traditionnels et complémentaires (James, 2018), alors qu'en Afrique du Sud, le pourcentage de la population qui utilise ces remèdes pour traiter leurs animaux contre diverses maladies est plus important (McGaw et Eloff, 2008). Ce recours à la médecine par les plantes peut s'expliquer par la disponibilité des plantes et par le fait qu'elle est abordable dans les pays en voie de développement (OMS, 2002). Dans l'Europe et l'Amérique du Nord, plus de 50% de la population a eu recours au moins une fois à la médecine complémentaire (OMS, 2002). De plus, les effets secondaires causés par les plantes sont minimes voire absents par rapport aux médicaments chimiques synthétiques (Cowan, 1999).

Le marché mondial des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) est estimé à 19,4 milliards de dollars (Hmammouchi, 2005). Au Maroc, la flore est riche avec environ 4200 plantes dont 800 sont exploitées dans des conditions souvent artisanales ignorant les modalités modernes de production, de commercialisation et de valorisation (Neffati et Sghaier, 2014). Pourtant, ce secteur pourrait contribuer de façon appréciable au développement socio-économique du pays. Les valeurs des exportations des aromates et produits d'herboristerie ont varié entre 40 et 60 millions de DH/an de 1995 à 2003. Les plantes produisent une énorme variété de métabolites secondaires, et il est communément admis qu'une partie importante de cette diversité chimique sert à protéger les plantes contre

les microbes pathogènes (Dixon, 2001; Gibbons, 2008). Ces substances végétales sont classées comme phytoanticipines, des composés qui sont présents de manière constitutive, ou phytoalexines, dont les niveaux augmentent fortement en réponse à l'invasion microbienne. On distingue plusieurs groupes chimiques qui entrent dans la composition des huiles essentielles, les phénols (simples phénols, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et les coumarines), les alcaloïdes, les terpénoïdes, les lectines et polypeptides. Cowan (1999) a mis en exergue leur activité biologique surtout l'activité antimicrobienne. Leur mécanisme d'action passe par la désorganisation de la membrane plasmique, la formation des complexes avec la paroi, l'inhibition des enzymes et l'interaction avec l'ADN.

Ainsi les propriétés antimicrobiennes des PAM sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Yano et al., 2006). Depuis, une attention particulière s'est portée sur les composés phytochimiques naturels et potentiels qui ont montré une appréciable activité antimicrobienne (Helander et al., 1998 ; Bozin et al., 2006 ; Matasyoh et al., 2009). Ces produits naturels sont disponibles et peu coûteux. Leur utilisation doit être rationnelle pour atténuer la toxicité. Au cours des deux dernières décennies, plus de 25% des médicaments sont utilisés en médecine traditionnelle directement dérivés des plantes, tandis que 25% ont été modifiés chimiquement à partir de produits naturels (Vuorelaa et al., 2004).

III. Matériel et méthodes

1. Choix des plantes

Le choix des plantes a été fait sur la base d'une étude bibliographique concentrée sur des plantes connues pour leur activité antibactérienne, leurs innombrables vertus thérapeutiques et dont l'usage traditionnel n'a jamais cessé d'augmenter et dont certaines sont endémiques au Maroc. L'étape préliminaire dans ce travail consistait à choisir et à collecter les plantes (Tableau 9).

Tableau 9 : Plantes aromatiques médicinales choisies pour notre étude.

Nom d'espèce	Nom commun
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin
<i>Thymus maroccanus</i>	Thym
<i>Thymus broussonetii</i>	Thym
<i>Cedrus atlantica</i>	Cèdre
<i>Lavandula officinalis</i>	Lavande
<i>Salvia officinalis</i>	Sauge
<i>Cladanthus mixtus</i>	Camomille
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clou de Girofle
<i>Pelargonium graveolens</i>	Géranium
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus
<i>Origanum compactum</i>	Origan

2 Caractérisation phylogéniques des plantes étudiées

a. Romarin

- **Embranchement** : Magnoliophyta ou Spermaphytes Angiospermes
Classe : Magnoliopsida ou Dicotylédones
Ordre : Lamiales (Labiales)
Famille : Lamiaceae ou Labiaceae (Labieae)
Genre : *Rosmarinus*
Espèce : *officinalis*



Nom commun : Romarin

Habitat : Moyen Atlas Oriental, Rif

Description : Le romarin peut atteindre jusqu'à 1,50 m de hauteur, voire jusqu'à 2 m en culture. Il est reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces, beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. Leur odeur, très camphrée, évoque aussi l'encens d'où il doit son nom provençal «encensier».

La floraison commence dès le mois de février, parfois en janvier, et se poursuit jusqu'en avril-mai. Certaines variétés peuvent fleurir une deuxième fois en début d'automne (McVicar, 2006). La couleur des fleurs, qui se présentent en grappes assez semblables à des épis, varie du bleu pâle au violet. On trouve également, mais plus rarement, la variété à fleurs blanches *R. officinalis albiflorus*. Leur calice est velu, à

dents bordées de blanc. Elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base. La lèvre inférieure de la corolle est profondément divisée, faisant penser au labelle de certaines orchidées. Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tétrakène de couleur brune.

Dans cette présente étude, l'échantillon de *R. officinalis* a été collecté en été dans la région d'Al Hoceima.

Rendement et composition chimique: Le rendement de *R. officinalis* en huile essentielle (HE) varie de 2,45% à 2,53%. Cette huile présente un chémotype à 1,8 cinéol à 41,25% avant la floraison et un autre à 38% après floraison (Casanova, 2018).

b. Thym

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : lamiales (labiales)

Famille : lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèces : *maroccanus* & *broussontii*

Nom commun : Le thym

Habitat : *Thymus maroccanus* et *Thymus*

broussonetii sont deux espèces endémiques au Maroc. Elles poussent dans des sols caillouteux, pierreux plutôt secs de manière sauvage dans diverses zones du sud et du sud-ouest marocain notamment dans les zones d'Essaouira et de Marrakech, *T. maroccanus* et *T. broussonetti* sont très demandées (Milhau et al., 1997).

Description : Ces deux espèces sont caractérisées par leurs Feuilles opposées, linéaires, enroulées sur les bords, grisâtres sur le dessus, tomenteuses sur le dessous, fleurs groupées en glomérules ovoïdes et à corolle bilabée rosée.

Ces deux espèces ont été récoltées pendant leur floraison dans la région de Marrakech et Essaouira respectivement.

Rendement et composition chimique : Le rendement en HE varie de 2,94% à 3,86%. Les composantes majoritaires sont le carvacrol (39,05% et 50,44%) et le thymol (20,57% et 45,7%) (Jaafari et al., 2007).



c. Cèdre

- **Embranchement** : Equisetophyta

Classe : Equisetopsida

Ordre : Pinales

Famille : Pinaceae

Genre : *Cedrus*

Espèce : *atlantica*

Nom commun : Cèdre



Habitat : Le moyen Atlas et du Haut Atlas Oriental.

Description : Aussi appelé cèdre bleu ou cèdre argenté, le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica*) est un arbre d'allure majestueuse et imposante pouvant atteindre une hauteur de 30 à 40 mètres ; son port, bien que présentant souvent une cime tabulaire à l'âge adulte, est plus longiligne que celui de *Cedrus libani* ; sa longévité est importante. Il se distingue des autres espèces de cèdres par ses rameaux dressés, ses aiguilles courtes (de 2 ou 2,5 cm de longueur en général 2), peu pointues et persistantes (Aafi et al., 2011).

Rendement et composition chimique: Le cèdre de Wiwane et de Sidi Youssef (région de Tounfit) présente un rendement en HE qui diminue avec la durée de stockage. La distillation fractionnée de la sciure donne quatre fractions (F1, F2, F3 et F4). La première et la deuxième sont riches en terpénols (respectivement 26,40% et 27,67%) et en cétones (32,74% et 34,10%) et possèdent la plus grande activité contre les germes. La troisième et la quatrième fraction sont dominées par les cétones (respectivement 42,16% et 44,38%) et elles peuvent être exploitées comme agent insecticide grâce à leur richesse en α -atlantone. Le cèdre d'Ajdir, de Ras El Ma, de Wiwane, de Sidi Mguild, d'Adrej, de Tamjilt et de Sidi Youssef présente un rendement en HE qui varie entre 1,7 et 6,1%. Le cèdre de Wiwane présente un rendement en HE qui varie de 0,7 % à la première heure d'extraction à 2,4 % après 8 heures dans le cas de l'entraînement à la vapeur d'eau et de 0,45 % à 2,68 % respectivement dans le cas de l'hydrodistillation. Les huiles essentielles des sciures du cèdre d'Ajdir ont des compositions chimiques sensiblement identiques et ne possèdent aucun pouvoir bactériostatique ou fongistatique. Les huiles essentielles de la sciure de cèdre infectée par *Ungulina officinalis*, possèdent une activité bactéricide à partir d'une concentration de 2 μ l/ml et ont un faible pouvoir antifongique (Aafi et al., 2011).

Notre échantillon de cèdre est issu de la région d'Azrou.

d. Lavande vraie

- **Embranchement** : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Lavandula*

Espèce : *officinalis*

Nom commun : la lavande vraie

Habitat : La lavande vraie (*Lavandula officinalis*) croît en Europe méditerranéenne sur des terrains calcaires, de 700 m jusqu'à 1 800 m d'altitude, au Maroc, dans la région de «Tidass». L'aire de répartition et de distribution des lavandes comprend les zones montagneuses du Rif, le moyen Atlas et le haut Atlas.

La lavande étudiée dans notre expérience est cultivée dans la région d'Oulmes et récoltée en période de floraison.

Description : Ses feuilles sont longues, étroites et blanchâtres, toute la plante a une odeur aromatique très agréable.

Rendement et composition chimique : Le rendement en HE est de 0.5%. Les Principaux composants biochimiques sont : acétate de linalyle (38%), linalol (25%), lavandulol (0.80%).

Les principales propriétés en aromathérapie sont : anti-bactérien, anti-spasme, anti-fongique, anti-inflammatoire et anti-viral. (Chahboun et al., 2005).



e. Sauge

- **Embranchement** : *Plantae* – *Tracheobionta-Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida-Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Salvia*

Espèce : *officinalis*

Nom commun : La sauge



Habitat : la sauge est originaire de la région méditerranéenne. Elle pousse dans les clairières des forêts, broussailles, pâturages, steppes des plaines, des hauts plateaux et des montagnes jusque vers 2 500 m. Au Maroc, elle pousse dans plusieurs régions y inclut le Rif occidental et elle est cultivée à Marrakech et Agadir (Zidane et al., 2016). Cette espèce a été récoltée pendant la période de la floraison dans la région de Taounate.

Description : C'est une plante très ramifiée, aux tiges de section carrée, à la base lignifiée. Les feuilles pétiolées sont vert pâles, veloutées, oblongues. Les fleurs, sur des hampes florales érigées, sont regroupées en petits glomérules.

Rendement et composition chimique : la sauge officinale était considérée chez tous les peuples de l'Antiquité, comme la plante salvatrice par excellence, tellement merveilleuse qu'ils la jugeaient tous capable de guérir toutes les maladies. Le rendement en HE est de 1 à 2%. La sauge officinale, à la différence de la sauge sclarée, fournit une huile essentielle composée à 50 % de thuyone, laquelle est neurotoxique (Lamendin et al., 2004).

f. Camomille sauvage

- **Embranchement** : Tracheophytes

Classe : Asterides

Ordre : Astérales

Famille : Astéracée

Genre : *Cladanthus*

Espèce : *Mixtus*

Nom commun : Chamomille sauvage



Habitat : Cette espèce abonde dans les vides des bioclimats semi-aride et subhumide sur les sols sableux de l'étage thermoméditerranéen. Au Maroc, elle se rencontre dans deux zones disjointes, la première entre Tanger, Ouezzane, Souk Larbaa, Moulay Bouselham et Azilah, et la seconde entre Kénitra, Sidi Slimane, Khémisset et Rabat (Aafi et al., 2005).

L'échantillon pris pour notre étude provient d'Ouezzane et il est récolté pendant la période de la floraison.

Description : La Chamomille sauvage (*Cladanthus mixtus*) appelée aussi commercialement Chamomille du Maroc (Aafi et al., 2005), est une Astéracée chaméphyte bisannuelle à nombreuses tiges dressées, terminées par des capitules à

ligules blanches, ornées de jaune à leur base. Cette espèce est caractérisée par une odeur fraîche balsamique. Elle donne une huile essentielle d'odeur camphrée recherchée en cosmétique, parfumerie et médecine (Haddad et al., 2003).

Rendement et composition chimique : Le rendement en HE varie entre 0.3% et 0.5%. La Camomille sauvage est conseillée comme anxiolytique et ré-équilibrante du système nerveux central, d'une grande valeur dans les dépressions nerveuses, et pour les insuffisances hépatiques et gastriques légères et les colites colibacillaires (Haddad et al., 2003).

Satrani et al. (2007) ont identifié 36 composés par CPG représentant 91,9% de l'essence totale. L'alcool de santoline (37,7 %), l' α -pinène (4,8 %), la camphénilone (4,8 %), l'alcool de yomogi (4,5 %), le germacrène (3,3 %), le 1,8-cinéole (3,2 %) et le cubénoïl (3,2 %) sont les principaux constituants.

g. Clou de girofle

- **Embranchement** : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Syzygium*

Espèce : *aromaticum*

Nom Commun : Le clou de girofle

Habitat : Le girofle ou gérofle ou clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) est un arbre originaire d'Indonésie, premier producteur et utilisateur mondial. Ce pays consomme 90% et produit 75% de l'offre mondiale (Ruf, 2000). Il est le bouton floral d'un arbre giroflier (*Eugenia caryophyllata*, ou *caryophyllus*, Myrtacées).

Description : L'arbre a une forme conique d'une hauteur moyenne de 12 à 15 m et peut atteindre 20 m de haut. Ses feuilles persistantes sont ovales et coriaces. Les fleurs à quatre pétales blancs rosés sont caractérisées par leurs sépales rouges persistants. Avant l'épanouissement, les boutons floraux sont nommés «clous de girofle». C'est à cette époque qu'on les récolte avant de les laisser sécher au soleil jusqu'à ce qu'ils prennent une teinte brun foncé.

Rendement et composition chimique : L'huile essentielle extraite des boutons floraux contient 70 à 80 % d'eugénol. Son rendement en HE varie de 3.5% à 6%. Elle a des propriétés anesthésiantes et cautérisante pulpaire, anti-infectieuse et antibactérienne à



large spectre d'action, anti-virale et anti-fongique. (Kim et al., 1998 ; Ghedira et al., 2010).

h. Géranium rosat

- **Embranchement** : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Geraniales

Famille : Geraniaceae

Genre : *Pelargonium*

Espèce : *graveolens*

Nom Commun : Le géranium rosat



Habitat : La plante est cultivée dans de nombreuses régions méditerranéennes et subtropicales. Au Maroc, l'industrie du géranium est relativement récente (Demarne, 1985).

Le géranium utilisé dans cette étude est récolté en période de floraison dans la région de Taza.

Description : Le géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) est une plante vivace à feuillage odorant. Les feuilles persistantes sont lobées et opposées, couvertes de poils glanduleux microscopiques qui libèrent leurs parfums au toucher ou à la chaleur (Demarne, 1985).

Rendement et composition chimique : Le rendement en HE est de 0.1% et un hectare fournit 18 kg d'essence par an. (Soundouss, 1998). Les résultats de l'analyse par Chromatographie en phase gazeuse révèlent la présence de nombreux constituants. 48 composés ont été identifiés par CPG correspondant à 95,6 % de l'ensemble des constituants isolés (Soundouss, 1998). Le citronellol apparaît comme le constituant majoritaire de l'HE (33%), suivi du formate de citronellyle (10,56%), du guai-6,9-diene (9,25%), du géraniol (5,42%) et de l'isomenthone. Le Rhodinol, fraction constituée par le citronellol, géraniol et linalool, constitue un taux de 41% (Soundouss, 1998).

i. Eucalyptus

- **Embranchement** : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : Eucalyptus

Espèce : globulus

Nom Commun : Eucalyptus

Habitat : L'eucalyptus est originaire d'Australie et Tasmanie.

Description : L'écorce du cèdre (gommier bleu) pèle en larges bandes. Les feuilles des arbres juvéniles apparaissent par paires sur des tiges carrées. Elles mesurent de 6 à 15 cm de long et sont couvertes d'une pruine cireuse bleu-gris, qui est à l'origine du nom de «gommier bleu». Les feuilles des arbres matures sont alternes, étroites, en forme de faux et d'un vert foncé luisant. Elles poussent sur des tiges cylindriques et mesurent de 15 à 35 cm de long. Les boutons floraux en forme de toupie sont côtelés et recouverts d'un opercule aplati portant un bouton central. Les fleurs de couleur crème sont solitaires à l'aisselle des feuilles et produisent un abondant nectar que les abeilles transforment en un miel à saveur prononcée. Les fruits ligneux de 1,5 à 2,5 cm de diamètre ont une capsule très dure. De nombreuses petites graines s'échappent par des valves qui s'ouvrent sur le dessus du fruit.

De la région de Khemisset vient notre échantillon d'eucalyptus.

Rendement et composition chimique : L'huile d'eucalyptus est obtenue à partir des feuilles. Elle contient plus de 80% de cinéol, avec d'autres constituants comme p-cymène, alpha-pinène, limonène, géraniol et camphène. Cette Huile essentielle est largement utilisée pour guérir les maux de tête, les douleurs corporelles, la fièvre, l'intestin chronique plaintes et dysenterie (Juergens et al., 2003 ; Sefidkon et al., 2007). Elle est très appréciée pour ses propriétés antiseptiques et désinfectantes (Rasooli et al., 2006 ; Sefidkon et Jamzad, 2000). In vitro, il est montré que l'huile essentielle d'eucalyptus a un effet antibactérien (Osawa et al., 1996).



j. Origan

- **Embranchement** : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Origanum*

Espèce : *compactum*

Nom Commun : L'Origan



Habitat : L'origan à fleurs compactes (*Origanum compactum*) est une espèce endémique du Maroc et de l'Espagne méridionale (Jahandiez et Maire, 1932 ; Benabid, 2000). C'est une espèce largement répandue dans les forêts claires à base de tétraclinaies, subéraies et illiçaies, dans les matorrals et pâturages rocaillieux des plaines et des basses montagnes et sur sols bien drainés (Atbib, 1985). Sur le plan biogéographique, l'*Origanum compactum* pousse dans le Rif, le Tangérois, le Maroc centro-septentrional, le nord du Maroc occidental, l'ouest du Maroc méridional, le Haouz, le Haut atlas et le sud de la péninsule ibérique (Jahandiez et Maire, 1932). Le genre *Origanum* a été particulièrement étudié par Ietswaart (1980).

C'est une espèce appartenant aux étages de végétation Thermo-méditerranéen et Méso-méditerranéen à bioclimat semi-aride et sub-humide.

Description : Plante vivace à tiges pubescentes couvertes de poils longs ; feuilles caulinaires ovales, ovoïdes, velues ; inflorescences en épis denses et courts, très pourprés ; bractées florales ovales- lancéolées, rigides, coriaces ; fleurs grandes ; calice à 5 dents et marges ciliées.

Dans cette étude, nous avons travaillé avec 5 échantillons d'Origan de différentes régions : Taounate, Al hoceima, Agadir et El Haouz.

Rendement et composition chimique : Le thymol et le cavacrol sont les acides phénoliques qui caractérisent la composition chimique des différentes espèces appartenant à ce genre (Benjilali, 1996). Quant aux caractères organoleptiques, l'huile essentielle d'*Origanum compactum* passe par un large spectre de couleurs passant du jaune pâle au brun voir même noir. L'odeur reste, toutefois, très piquante, épicée et plus agressive que les autres huiles (Belkamel et al., 2013). Le rendement en huile essentielle peut atteindre 3%.

3 Extraction des huiles essentielles et rendement

Les huiles essentielles, également appelées huiles volatiles ou étherées sont des liquides aromatiques huileux obtenus à partir de différentes parties des plantes, et sont largement utilisés comme arômes alimentaires (Burt, 2004 ; Bakkali et al., 2008). Leur activité antimicrobienne est principalement attribuable à leurs composés majoritaires, bien que l'effet synergique ou antagoniste des composés minoritaires doit être également considéré (Ultee et al., 2002 ; Burt, 2004).

L'extraction de l'huile essentielle des plantes récoltées a été effectuée par *entraînement à la vapeur d'eau à l'aide d'un montage pilote* au sein du Domaine Arome et Spécialités-Domains Agricoles à Tiddas (Maroc) (Figure 16). Le principe de cette technique est basé sur un entraînement des constituants volatils de la matière végétale sèche par la vapeur d'eau. Cette dernière chargée de principes volatils est condensée dans un réfrigérant pour donner, après décantation, l'huile essentielle. L'extraction dure environ 4h (jusqu'à ce que la quantité d'huile présente dans l'extracteur demeure constante). Enfin, l'huile essentielle est séparée (par gravimétrie) de l'eau et récupérée dans des bouteilles spéciales qui maintiennent la qualité de l'HE. Le rendement en HE a été déterminé par rapport à la matière sèche (Chahboun et al., 2015). Les échantillons des huiles essentielles ont été stockés à 4°C à l'obscurité jusqu'à utilisation.

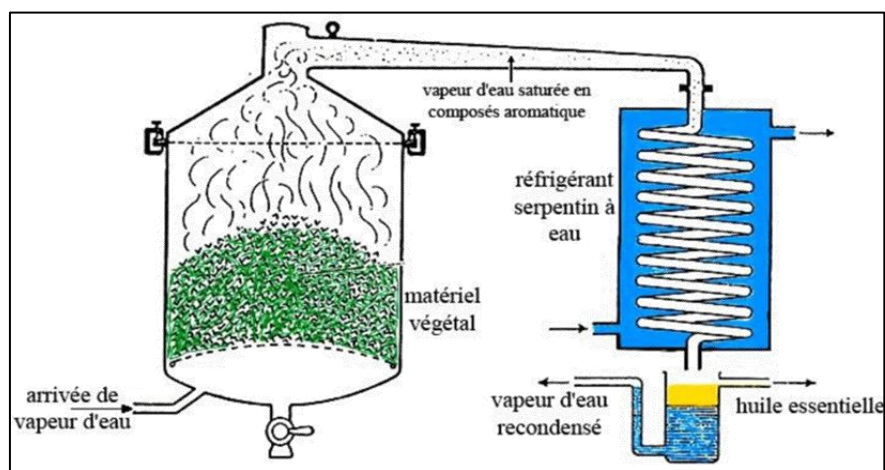


Figure 16 : Schéma du montage pilote utilisé pour extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau.

4 Analyse de la composition chimique des HE

La séparation des constituants de l'HE est réalisée en utilisant la CPG couplée à la SM (l'appareil utilisé est "Agilent Technologies, J & W Scientific Products, Palo Alto, CA,

USA"). L'appareil est équipé d'un Agilent Technologies capillaire DB-5ms (30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre; épaisseur de film 0,25mm), et couplé à un détecteur sélectif de masse (MSD5975B, l'ionisation de tension 70 eV; tous Agilent, Santa Clara, CA). Le gaz porteur est le Helium (He), a été utilisé avec un débit de 1 ml.min⁻¹. Le programme de température du four était 1 minute à 100°C. Le chromatographe est équipé d'un injecteur split / splitless utilisé dans le mode split. Le rapport de division est 1:100.

L'identification des composés a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux des produits standards et confirmée en comparant leurs spectres de masse avec les données de la bibliothèque Wiley et NIST.

IV. Résultats

1. Caractéristiques physiques des HE

Les huiles essentielles ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau. La couleur, ainsi que la masse volumique à température ambiante de l'huile essentielle de chaque espèce ont été enregistrées (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractéristiques physiques des huiles essentielles étudiées.

Espèce	Couleur	Densité
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Incolore	0.804
<i>Thymus. Maroccanus</i>	Jaune-orange	0.919
<i>Thymus broussonetii</i>	Jaune	0.900
<i>Cedrus atlantica</i>	Jaune pâle-incolore	0.968
<i>Lavandula angustifolia</i>	Jaune claire	0.933
<i>Salvia officinalis</i>	Jaune-orange	0.779
<i>Cladanthus mixtus</i>	Jaune claire	0.952
<i>Syzygium aromaticum</i>	Jaune claire	1.040
<i>Pelargonium graveolens</i>	Jaune claire	0.873
<i>Eucalyptus globulus</i>	Incolore	0.781
<i>Origanum compactum 1</i>	Jaune claire	0.900
<i>Origanum compactum 2</i>	Jaune claire	0.905
<i>Origanum compactum 3</i>	Jaune-orange	0.910
<i>Origanum compactum 4</i>	Jaune	0.880
<i>Origanum compactum 5</i>	Vert -brune	0.893

La densité nous renseigne sur la composition chimique, ainsi une densité inférieure à 0,9 indique la présence de composés terpéniques et aliphatiques à des taux élevés, alors qu'une densité supérieure à 1 indique une composition très variée en composés terpéniques polycycliques (Garnero, 1996).

2 Résultats de la séparation des constituants de l'HE par CPG/SM

a. Romarin

Le chromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* révèle la présence de 19 éléments avec un pourcentage total de 94,77% ; dont cinéol 1-8 est le composé majoritaire (46,12%) suivi par alpha pinène (11,95%) et le linalol (8,75%) (Tableau 11).

Tableau 91 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
pinène (alpha)	2.46	11,95
Camphene	2.96	3,25
pinène (béta)	3.47	6,63
Sabinène	3.56	0,09
Myrcène	4.10	1,63
terpinène (alpha)	4.35	0,8
Limonene	4.94	2,15
cinéol 1-8	4.91	46,12
terpinène (gamma)	5.18	1,3
Paracymène	5.49	0,89
Terpinolène	5.98	0,41
linalol oxyde (cis)	6.27	0,15
Linalool	8.68	8,75
linalyl acétate	8.75	0,87
bornyl acétate	8.81	0,22
téropénin-4-ol	9.03	2,18
caryophyllène (béta)	9.35	2,34
Bornéol	10.31	2,88
Verbénone	10.44	2,15
total		94,77%

Le temps de rétention est le temps nécessaire pour l'apparition du pic au niveau du chromatographe qui signifie la détection d'un composé chimique, il est un critère d'identification car il est propre à chaque composé.

b. Thym

L'analyse par GC/MS des deux huiles essentielles des 2 *Thymus* étudiées, a révélé des profils chromatographiques très hétérogènes (Tableau 12). Chez *Thymus maroccanus*, 7 composés ont été identifiés représentant 93,19% de l'huile essentielle. Le carvacrol (74,60%) étant le constituant majeur, suivi du thymol (14,38%) à côté d'autres constituants avec des concentrations relativement faibles, le paracymène (1,95%) et le terpinène gamma (1,61%).

L'huile essentielle de *Thymus broussonetii* s'est montrée plus riche avec 11 composés identifiés représentant 87,84% de la totalité de l'huile essentielle (Tableau 12). Les produits identifiés sont majoritairement représentés par le carvacrol (54,52%), le thymol (11,92%), le paracymène (8,10%) et le terpinène gamma (7,80%).

Tableau 102 : Composition chimique de l'huile essentielle de deux espèces de Thym.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentages	
		<i>T. maroccanus</i>	<i>T. broussonetii</i>
pinène alpha	2.45	0.18	0.48
thujène alpha	2.95	-	0.15
pinène bêta	3.45	-	0.03
myrcène	4.11	0.23	0.89
terpinène alpha	4.36	0.24	1.08
terpinène gamma	5.24	1.61	7.80
paracymène	5.66	1.95	8.10
linalol	8.61	-	1.14
terpinène- γ -ol + caryophyllène bêta	9.30	-	1.73
thumol	14.38	14.38	11.92
carvacrol	14.65	74.60	54.52
total		93.19%	87.84%

c. Cèdre

L'analyse de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* a permis d'identifier 13 composés représentant 82,61% des constituants totaux (Tableau 13). Le himachalène bêta, himachalène alpha, himachalène gamma sont les composés majoritaires avec respectivement 44.84%, 15.62%, 10.33%, L'atlantone trans alpha et l'atlantone bêta représentent des faibles pourcentages mais relativement plus importants (3.58 % et 2.29%) que les autres constituants.

Tableau 113 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
cédrène alpha	9.03	0.31
cédrène bêta	9.35	0.41
himachalène alpha	9.87	15.62
himachalène gamma	10.34	10.33
himachalène bêta	10.59	44.84
cadinène delta	10.76	0.26
himachalène ar	11.83	0.87
calacorène alpha	12.18	0.83
atlantone bêta	14.62	2.29
atlantone cis gamma	14.75	0.86
atlantone trans gamma	14.78	0.87
atlantone cis alpha	14.96	1.54
atlantone trans alpha	15.63	3.58
total		82.61%

d. Lavande

Quant aux l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*, les résultats montrent qu'elle renferme 13 composés avec un pourcentage total de 87,84% (Tableau 14). Le cinéol 1-8 (38,22%) est le constituant majoritaire, en plus du linalol (15,93%), du Camphre (8,58%), de l'acétate de linalyle (6,53%) et du bornéol (3,59%).

Tableau 14: Composition chimique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
pinène alpha	2.46	1.00
camphène	2.96	0.38
pinène bêta	3.47	1.70
limonène	4.64	1.26
cinéol 1-8	4.91	38.22
ocimène cis bêta	5.03	0.43
ocimène trans bêta	5.24	0.07
Camphre	8.51	8.58
linalol	8.68	15.93
linalyl acetate	8.81	6.53
lavandulol	9.97	0.95
bornéol	10.32	3.59
verbénone	10.44	0.18
total		87.84%

e. Saugé

L'analyse chimique des composantes de l'huile essentielle *Salvia officinalis* a montré que thujone (bêta) 25,5%, limonène + cinéol 1-8 (19,83%), camphre (10,66%) et pinène (alpha) (7,61%) constituent la totalité de l'huile essentielle (82,53%) à côté d'autres composantes mineurs (Tableau 15).

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
pinène (alpha)	2.45	7,61
camphène	2.96	4,89
pinène (bêta)	3.47	4,06
myrcène	4.10	2,58
limonène + cinéol 1-8	4.95	19,83
thujone (alpha)	6.87	2,75
thujone (bêta)	7.43	25,51
camphre	8.51	10,66
bornyl acétate	8.81	0,37
humulène (alpha)	10.78	4,26
total		82,53%

f. Camomille

Le tableau 10 montre que l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus* se compose essentiellement de 18 éléments avec un pourcentage de 64,31% (Tableau 16). Pinène (alpha) (15,91%), limonène (8,1%), santolina alcool (7,56%), Gérmacrène D (7,22%) et farnésène (béta) (5,87%) constituent les principaux constituants.

Tableau 126 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
pinène (alpha)	2.46	15,91
Sabinène	3.56	0,17
pinène (béta)	3.74	3,88
myrcène	4.10	0,53
limonène	4.64	8,1
cinéol 1-8	4.91	4,77
santolina alcool	5.04	7,56
terpinène (gamma)	5.18	0,2
artémisia alcool	6.04	0,41
pinocarvéol (trans)	6.89	2,31
pinocarvone	7.39	1,75
bornéol	10.31	0,23
bornyl acétate	10.81	0,34
élémente (delta)	10.98	3,05
caryophyllène (béta)	11.35	1,07
farnésène (béta)	11.97	5,87
gérmacrène D	12.63	7,22
nérolidol (trans)	13.02	0,94
total		64,31%

g. Clou de girofle

Quant à l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*, seulement deux composés ont été identifiés représentant 95,36% de l'huile essentielle. L'eugénol (85,42%) et le caryophyllène béta (9,94%) (Tableau 17).

Tableau 137 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
Caryophyllène béta	9.35	9.94%
Eugénol	14.41	85.42%
total		95.36%

h. Géranium

A la lumière du tableau 18, nous notons que 19 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*. Elle est principalement composée du citronellol (19,69%), du géraniol (14,45%), du 10-epi-gamma-Eudesmol (9,46%), du linalol (8,83%), du citronellyl (5,77%), d'isomenthone (5,55%) et de geranyl (5,23%).

Tableau 18 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
pinène (alpha)	2.46	0,3
pinène (béta)	3.74	0,11
myrcène	4.10	0,17
limonène	4.94	0,17
ocimène (cis béta)	5.6	0,11
ocimène (trans béta)	5.78	0,18
rose oxyde cis	8.20	0,51
rose oxyde trans	8.41	0,17
isomenthone	8.54	5,55
Linalool	8.68	8,83
Citronellyl formate	9.65	5,77
Menthol	10.04	0,62
humulène (alpha)	10.78	0,49
Geranyl formate	16.09	5,23
Citronellol	17.88	19,69
Geranyl propionate	18.83	0,75
géraniol	19.53	14,45
Geranyl butyrate	20.71	2,39
10-epi-gamma-Eudesmol	25.12	9,46
total		74.95 %

i. Eucalyptus

Concernant l'HE extraite de l'*Eucalyptus globulus*, les résultats du chromatogramme montrent la présence de 7 constituants majoritaires avec un total de 88,85% dont le cinéol 1-8 (51,36%), le pinène (alpha) (17,85%) et l'aromadendrane (8,74%) (Tableau 19).

Tableau 149 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentage
pinène (alpha)	2.46	17.85
paracymène	4.24	2.19
limonène	4.49	3.37
cinéol 1-8	4.58	51.36
trans pinocarviol	6.59	3.27
aromadendrène	15.12	8.74
globulol	18.81	2.07
total		88.85%

j. Origan

L'analyse des cinq échantillons de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*, révèle que le carvacrol, le thymol, le terpinène gamma et le paracymène sont les composantes majoritaires avec des concentrations différentes (Tableau 20), lorsque la concentration du carvacrol et du thymol augmente celle du terpinène gamma diminue et vice versa. La variation détectée dans la composition chimique des huiles essentielles du thym est liée à plusieurs paramètres tels que le facteur environnemental, les conditions climatiques et géographiques variant d'une région à une autre et les conditions de cueillette et séchage (Cosentino et al., 1999 ; Fellah et al., 2006). En effet, le carvacrol varie de 25.70% à 43.06%, le thymol de 3.61% à 15.59%, le terpinène gamma de 16.11% à 33.68% et le paracymène de 9.23% à 11.62%.

Tableau 150 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Origanum compactum*.

Composés	Temps de rétention (min)	Pourcentages				
		<i>O. compactum1</i>	<i>O. compactum2</i>	<i>O. compactum3</i>	<i>O. compactum4</i>	<i>O. compactum5</i>
pinène alpha	2.45	0.73	0.71	0.74	0.53	0.56
thujène alpha	2.49	0.41	1.00	1.07	0.97	3.57
camphène	2.95	0.12	0.11	0.12	0.10	0.14
pinène bêta	3.45	0.11	0.14	0.15	0.15	0.32
Myrcène	4.12	1.65	1.72	1.82	2.20	5.44
terpinène alpha	4.37	1.94	1.85	1.94	3.15	4.29
Limonène	4.73	0.16	0.21	0.22	0.18	0.47
γ -terpinène	5.28	16.11	16.40	17.15	29.79	33.68
paracymène	5.56	10.46	10.41	10.90	9.23	11.62
Linalol	8.62	1.47	1.40	1.45	1.56	1.77
terpinène- γ -ol	9.29	0.85	0.78	0.79	1.55	1.10
Caryophyllène- β	9.31	1.19	1.28	1.33	-	2.36
Thymol	14.40	15.59	14.99	15.52	7.86	3.61
Carvacrol	14.68	42.83	41.88	43.06	38.98	25.70
total		93.62%	92.88%	96.26%	96.25%	94.63%

V. Discussion

Les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques et médicinales PAM, sont utilisées en thérapie pour leur pouvoir antibactérien important grâce à leur composition très diversifiée en métabolites secondaires (Bakkali et al., 2008). De ce fait, l'objectif de cette partie du travail était de choisir les huiles essentielles ayant des composants connus pour leur activité antibactérienne. Ces plantes ont été choisies à la lumière de la littérature et l'extraction a été faite par entraînement à la vapeur d'eau.

L'extraction des huiles essentielles a montré une variabilité du rendement selon l'espèce végétale. Chez une même espèce, le volume d'huile essentielle récupéré dépend de plusieurs paramètres tels que le climat, le génotype, le lieu de croissance, et le régime de récolte de la plante (Salgueiro et al., 1997). A cela s'ajoute la saison (Gonny et al., 2004), le stade végétatif de la plante (Sefidkon et al., 2007), la méthode de séchage (Rahimmalek et Goli, 2013), la méthode de distillation (Sefidkon et al., 2007) et le temps de distillation (Cannon, et al., 2013). La composition des huiles essentielles varie aussi en fonction des organes prélevés. Elle peut aussi être modifiée au cours de l'extraction ou durant la conservation de l'huile (Merghache et al., 2009 ; Boukhatem et al., 2010 ; Sui et al., 2012 ; Karamanos et Sotiropoulou, 2013; Zaouali et al., 2013 ; Wu et al., 2013).

L'analyse de la composition chimique de nos huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM), a révélé une grande diversification ainsi que des compositions très riches.

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est principalement composée du 1,8-cinéole (46,12%), du camphre (3,25%), du pinène-alpha (11,95%), du β -pinène (6,63%), du caryophyllène (2,34%) et du bornéol (2,88%). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Ait-Ouazzou, et al. (2011) qui ont montré que le 1,8-cinéole (43,99%) est le composé majoritaire de cette huile essentielle. Néanmoins, la comparaison de la composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* de différentes régions du Maroc (Rabat, Taforalt et Elateuf) a révélé trois chémotypes distincts : le chémotype de l' α -pinène (37-40% de l'huile), le chémotype du camphre (41-53% de l'huile) et le chémotype du 1,8 -cinéole (58-63% de l'huile) (Elamrani, et al., 2000). Selon nombreuses études antérieures, l'extrait de romarin contient principalement des composés aromatiques tels que le bornéol, le camphène, le camphre et le cinéol, des flavonoïdes comme l'apigénine et la diosmine, tanins, l'acide rosmarinique, diterpènes et la rosmarinine (Akbari, 2015 ; Tak, 2016 ; Mekonnen, 2016).

L'analyse de la composition phytochimique de *Salvia officinalis* à montrer que les composés majoritaires sont : β -thujone (25,51%), 1,8 cinéole et limonene (19,83%), camphre (10,66%), α pinène (7,61%), β pinène (4,06%), α -thujone (2,75%), et le borneol (0,37%). Or, Fellah et al. (2006) ont trouvé, en analysant un chémotype en α -thujone, que les composantes majoritaires sont α -thujone (26,49%- 10,58%), β -thujone (13,09%-3,09%), 1,8-cinéole (31,89%-8,58%) et camphre (40,14%-2,10%).

Quant à l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*, pinène (alpha) (15,91%), limonène (8,10%), l'alcool de santoline (7,56%), Gérmacrène D (7,22%), farnésène (béta) (5,87%), cinéole 1-8 (4,77%), pinène (béta) (3,88%), élémène (delta) (3,05%), pinocarvéol (trans) (2,31%) et pinocarvone (1,75%) sont les composantes majoritaires trouvées après analyse. Il a été également rapporté que les éléments dominants identifiés sont les monoterpènes qui prédominent (69,4 %) avec l'alcool de santoline (37,7 %) et constituent les composés majoritaires. Suivent l' α -pinène et la camphénilone (4,8%), l'alcool de yomogi (4,5 %), le 1,8-cinéole (3,2 %) et le thymol (2,12 %). D'autres études ont rapporté que les principaux sesquiterpènes sont le germacrène D (3,3 %), le cubénol (3,21 %), l'acétate de caryophyllène (2,4 %) et le (E)- β -farnésène (2,26 %) (Satrani et al., 2007). Ces composantes ne se sont pas révélées à l'issue de nos extractions. Cela peut être dû à l'influence de divers facteurs y compris les conditions de récolte et la région géographique.

L'analyse de l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* nous a permis d'identifier deux composants l'eugénol (85,42%) et le β -caryophyllène (9,94%). Ce qui s'accorde avec les résultats trouvés par Prashar et al. (2006) qui a révélé la présence d'une teneur élevée en eugénol et en β -caryophyllène, respectivement de 78% et de 13% dans l'huile essentielle de clou de girofle, alors que les huiles essentielles étudiées par Pawar et Thaker (2006) présentent une faible teneur en eugénol (47,64%) avec une concentration en benzyl alcool de 34%. Par ailleurs, les huiles essentielles de clou de girofle analysées par Chaieb et al. (2007) et Fu et al. (2007) diffèrent énormément. Les huiles analysées par Fu et al. sont caractérisées par l'eugénol (68,52%), le β -caryophyllène (19%), acétate d'eugényle (10,15%) et α -caryophyllène (1,85%) et celles de Chaieb et al. par l'eugénol (88,58 %), l'acétate d'eugényle (5,62 %), le β -caryophyllène (1,39%) et d'autres constituants mineurs (0,1 à 0,9%). Selon Leung et al. (1980), le clou de girofle contient des glucosides de chromosomes, des glucosides de stérol (sitostérol, stigmastérol et campestérol), de l'acide oléanolique et du camphol.

L'huile essentielle contient, selon une étude récente de Fayemiwo et al. (2014) 28 composés, l'eugénol comme principal composé (80,95%), l'acétate d'eugényle (5,01%), le β -

caryophyllène (3,14%), le myrcène (1,84%) et l' α -terpinène (1,65%) comme principaux constituants. Le clou de girofle contient également des molécules phénoliques telles que l'acide gallique, les flavonols glucosidiques, les tanins, l'eugeniin, dehydrodieugenol, O, O'-dimethyl-dihydroeugenol.

L'analyse de l'huile essentielle de *Cedrus atlantica* a montré que le β -himachalène, l' α -himachalène, γ -himachalène, l'atlantone trans alpha et l'atlantone bêta représentant respectivement, 44.84 %, 15.62 %, 10.33 %, 3.58 % et 2.29%, sont les composés majoritaires. Les mêmes résultats ont été trouvés par Ainan et al. (2019) qui ont identifié 60 composants, dont le β -himachalène est le constituant majeur avec une teneur d'environ 31,24%, suivi par l' α -himachalène (15,63%) et le γ -himachalène (14,46%). Les autres constituants sont détectés en pourcentage moyen. Les résultats de Satrani et al. (2007) indiquent que l'(E)-alpha-atlantone (28,75%) et le β -himachalène (14,62%) sont les principaux constituants de cette huile essentielle. Derwich et al. (2010) ont rapporté que l'(E)-alpha-atlantone est absent dans l'huile essentielle des feuilles de cette plante, l' α pinène à 14,85% présente l'un de ses principaux constituants, suivi de l' α -himachalène à (10,14%), du β -himachalène à (9,89%) et de γ -himachalène à (7,62%).

On peut donc conclure que la composition chimique ou le pourcentage des constituants des huiles essentielles diffère selon la partie de la plante soumise à l'extraction. Ce qui confirme les constatations de Kherchouche et al. (2013), Boudarene (2004) et Aberchane (2004) qui ont montré que la composition chimique des huiles essentielles de *Cedrus atlantica* varie considérablement selon les zones géographiques, la période de récolte et l'âge de la plante.

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* révèle qu'elle se compose majoritairement du cinéol 1-8 (51,36%), du pinène (alpha) (17,85%) et d'aromadendrène (8,74%). Or Ghalem (2008) et Batish (2008) ont indiqué que le 1,8-cinéole (l'eucalyptol) est le constituant majeur (70-80%) alors que les autres constituants sont majoritairement terpéniques, quant au reste des constituants, il est souvent inférieur à 1%. Ces mêmes auteurs ont indiqué que la feuille contient également une douzaine d'hétérocycles oxygénés avec une structure acylphoroglucinol-mono- ou sesquiterpène, les euglobales, ainsi que des composés phénoliques, des acides phénoliques et des flavonoïdes.

Ainsi Ainan et al. (2019) ont trouvé que la composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est la suivante : Estragole (28,14%), terpinolène (7,12%), 1,4-hexadiène-méthyl-3- (1- méthyléthylidène) (7,01%), le linalol (5,54%) et le furfural (4,66%). Selon Tyagi (2011), la teneur en huile essentielle est comprise entre 0,5 et 3,5%.

Le chromatogramme de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a montré que Citronellol (19,69%), géraniol (14,45%), 10-epi-gamma-Eudesmol (9,46%), linalool (8,83%), isomenthone (5,55%), formate de citronellyle (5,77%) et formate de Geranyle (5,23%) sont ses composantes majoritaires. D'après Boukhatem et al. (2010), le citronellol apparaît comme le constituant majoritaire de l'HE (33,0%) suivi du formate de citronellyle (10,56%), du guai-6,9-diene (9,25%), du géraniol (5,42%) et de l'isomenthone.

Les constituants majoritaires de notre échantillon de *Lavandula officinalis* sont le cinéol 1-8 (38,22%) le linalol (15,93%), le Camphre (8,58%), l'acétate de linalyle (6,53%) et le bornéol (3,59%). Ces résultats ne s'accordent pas avec ceux de Laib et Barbat (2011) qui ont montré que la composition chimique de la même espèce étudiée dans la région de Constantine en Algérie a donné : l'acétate de linalyle (15,26%), linalol (10,68%), 1,8- cinéole (10,25 %), γ -terpinène (11,2%) et Camphre (11,25%).

Kulevanova et al. (2000) ont analysé la composition chimique de l'huile essentielle des fleurs de *Lavandula officinalis* collectées en Macédoine et ont trouvé 32 constituants avec une dominance des composants monoterpéniques, linalol (25,7%), l'acétate de linalyle (23,2%) et l'acétate de lavandulyle (12,4 %) et la présence des hydrocarbures sesquiterpéniques et ses dérivés oxygénés. Verma et al. (2009) ont étudié la composition de l'huile essentielle des fleurs de *L. officinalis* cultivées à Uttarakand (Inde) et ont identifié 37 composés monoterpéniques avec l'acétate de linalyle (47,56%), le linalol (28,06 %), l'acétate de lavandulyle (4,34%) et α -terpinéol (3,7%) comme composés majeurs. De leur part, Sun Kim et Sun Lee (2002) ont comparé la composition chimique des huiles essentielles de *L. officinalis* obtenues par différentes méthodes d'extraction et ont apporté que l'acétate de linalyle (35,44%) et le linalol (18,70%) sont prédominants dans les huiles essentielles obtenues par distillation à la vapeur.

D'après ces résultats, on remarque que la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Lavandula officinalis* cultivée au Maroc est différente de celles obtenues dans de nombreux travaux. Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température, la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction (Svoboda et Hampson, 1999).

Les résultats de l'investigation phytochimique des espèces du *Thym* étudiées ont montré que les huiles essentielles mettent en exergue des différences remarquables de la composition chimique, aussi bien qualitative que quantitative. Le carvacrol s'est montré le composé

majoritaire qui caractérise les chémotypes de l'huile essentielle de *T. marrocanus* (74,59%) et de *T. broussonetii* (54,52%). Les mêmes espèces récoltées dans les mêmes régions en 2008 ont montré une composition légèrement différente, le carvacrol était également le principal composé dans l'huile essentielle de *T. marrocanus* (89,15%), tandis que le thymol (39,64%), le carvacrol (21,31%) et le bornéol (20,13%) étaient les plus abondants dans l'huile essentielle de *T. broussonetii* (Saad et al., 2010). Des résultats similaires ont été observés par Jaafari et al. (2007) qui ont rapporté que chez ces mêmes espèces, les éléments dominants identifiés sont le p-cymène (21,0%), le bornéol (16,5%), l' α -pinène (11,8%) et le thymol (11,3%) pour *T. broussonetii* et le carvacrol (33,0%), le p-cymène (25,3%) et l' α -pinène (11,6%) pour *T. marrocanus* (Belaqziz et al., 2010).

Dans tous les cas, la composition chimique des huiles essentielles du *Thym* est connue pour être riche et diversifiée non seulement au Maroc (Tahiri, 1996 ; Ismaili, 2004), mais aussi dans d'autres régions du monde (Stahl-Biskup et Saez, 2002).

Le carvacrol, le thymol et le bornéol sont les composés les plus rencontrés dans différentes huiles essentielles de *Thym* marocain (Tahiri, 1996 ; Belaqziz et al., 2010 ; Saad et al., 2010 ; Ichrak et al., 2011 ; El Bouzidi et al., 2013).

L'analyse des différents échantillons des huiles essentielles d'origan à fleurs compactes *Origanum compactum* nous a permis de révéler que les phénols sont les principaux composés puis le carvacrol suivi par le thymol. A ces derniers, s'ajoutent quelques monoterpènes cycliques, monoterpènes acycliques et sesquiterpènes, ainsi que d'autres molécules non terpéniques comme les alcools et les oxydes.

Les différents échantillons analysés au cours de cette étude montrent bien une dominance de 4 composés caractéristiques : le γ -terpinène, le paracymène, le thymol et le carvacrol. Les résultats trouvés par Belkamel et al. (2013) s'accordent avec ce constat. La variation des teneurs des principaux composants est fonction du cycle de développement, de la partie de la plante analysée, de la région de récolte ainsi que d'autres facteurs (climatiques, édaphiques, génétiques, etc.). En effet, les 5 échantillons étudiés prélevés à différentes régions du Maroc ont montré une variabilité notable dans les teneurs du carvacrol qui oscillent entre 25,7 et 43%, du thymol qui varient entre 3,6 et 15,59%, du paracymène (9,23 à 11,62%), du γ -terpinène (16,11 à 33,68%). Ces résultats corroborent ceux apportés par Van Den Broucke et Lemeli (1980) qui ont indiqué que le thymol (de 0 à 43,4%), le carvacrol (de 3,8 à 71%) et le paracymène (de 0 à 25,4%) sont les trois composants principaux à teneurs variables d'un échantillon à l'autre, après avoir analysé des huiles essentielles de cette espèce de diverses

provenances du Maroc. Herouart (1987) a indiqué que cette même espèce d'origan, originaire du Maroc, contient 28.5 % de carvacrol, contre 19% environ pour le thymol. Bellakhdar et Il Idrissi (1990), ont trouvé après analyse que l'huile essentielle d'*O. compactum* de la région de Rabat (obtenue avec un rendement de 1,6%), contient 53% de thymol, 5,3% de carvacrol, 18% de paracymène, 12% γ -terpinène et 2,2% d' α -cardinol. Plus récemment, Chebli et al. (2003) ont trouvé dans l'huile essentielle d'*O. compactum* les proportions suivantes : carvacrol (58,1%), thymol (9%), paracymène (11,4%) et γ -terpinène (7,1%).

D'après les résultats obtenus, on remarque que pour les deux terpènes phénoliques, le carvacrol et son isomère le thymol ; le carvacrol présente le pourcentage le plus élevé avec un taux moyen de 31% environ, suivi du thymol avec 22.5% environ. Bellakhdar et Il Idrissi (1990) ont signalé plutôt un taux en thymol plus élevé que celui du carvacrol dans l'huile essentielle de l'*Origanum compactum* d'origine marocaine, ces taux sont de 53% pour le thymol contre 5.3% pour le carvacrol. Par contre, les résultats obtenus par Chebli et al. (2003), 58,1% de carvacrol et 9% de thymol concordent avec les nôtres. Ces fluctuations des taux de thymol et de carvacrol sont probablement liées à la période de récolte et au lieu géographique précis de la plante ainsi qu'à l'altitude.

Il est important de noter que les huiles essentielles à chémotypes différents présentent non seulement des activités biologiques différentes mais également des toxicités très variables. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la pluviométrie et les conditions édaphiques sont également des facteurs potentiels des variations de la composition chimique des huiles essentielles des plantes médicinales et aromatiques (Sokmen et al., 2004 ; Loziene et Venskutonis, 2005).

Les études portant sur la composition chimiques des huiles essentielles en fonction du cycle circadien et des saisons sont nombreuses (Sivropoulou, et al., 1997 ; Hudaib, et al., 2002 ; Lahlou, 2004). L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment de l'année sont des facteurs importants. Naghdi et al. (2004) ont montré que la formation des principes actifs se fait spécialement pendant la période de floraison et de fructification.

Ainsi, les chromatogrammes des différentes huiles essentielles ont montré que la composition chimique varie d'une espèce à l'autre, mais peut varier également au sein de la même espèce en fonction de la localisation géographique (Jaafari, et al., 2007). D'autres facteurs peuvent être responsables de cette variabilité, les plus importants sont le climat, le sol, la période de

récolte (Sivropoulou et al., 1997), et la méthode de conservation et d'extraction (Bakkali et al., 2008).

Les facteurs génétiques (Echeverrigaray et al., 2001) et le cycle végétatif (Hudaib et al., 2002) peuvent aussi influencer cette variabilité.

Certaines études ont démontré que plus la teneur en composés phénoliques est élevée, plus l'huile essentielle est efficace (McGimpsey et al., 1994, Cosentino et al., 1999). De plus l'activité antimicrobienne de ces huiles est principalement attribuable à ses composés majoritaires, sans oublier l'effet synergique ou antagoniste des composés minoritaires qui doit être considéré (Ultee et al., 2002 ; Burt, 2004).

VI. Conclusion

L'étude des huiles essentielles extraites par entraînement à la vapeur d'eau a montré des variabilités au niveau du rendement en huile essentielle et de la couleur de ces huiles d'une même espèce récolté pendant le stade de floraison, des zones géographiques différentes.

Les résultats de l'investigation phytochimique ont montré que les huiles essentielles des espèces étudiées mettent en exergue des différences remarquables de la composition chimique, aussi bien qualitatives que quantitatives.

Ainsi, les chromatogrammes des différentes huiles essentielles ont montré que la composition Chimique varie d'une espèce à l'autre mais peut varier également au sein de la même espèce en fonction de la localisation géographique. C'est le cas des huiles essentielles de l'origan utilisées dans cette étude. D'autres facteurs peuvent être responsables de cette variabilité, les plus importants sont le climat, le sol, la période de récolte et la méthode de conservation et d'extraction. Les facteurs génétiques et le cycle végétatif peuvent aussi influencer cette variabilité.

La prochaine partie du travail portera sur la détermination du pouvoir antibactérien des huiles essentielles extraites contre les isolats et bactéries du genre *Flavobacterium in-vitro*.

CHAPITRE 2

Confrontation Huiles Essentielles - Bactéries *IN VITRO*,

Détermination des CMI et CMB

1. Introduction
2. Matériel et méthodes
 - 2.1. Présentation du matériel biologique
 - a. Souches bactérienne
 - b. Huiles essentielles choisies
 - c. Mesure de l'activité antibactérienne des huiles essentielles
 - 2.2. Méthode de diffusion en gélose
 - 2.3. Méthode de dilution en milieu liquide
 - a. Macro-dilution
 - b. Micro-dilution
3. Résultats
4. Discussion
5. Conclusion

I. Contexte

Les huiles essentielles sont des substances naturelles complexes, possédant des caractéristiques physico-chimiques bien définies et répondant à des critères de qualité qu'il faut connaître pour éviter tout risque de toxicité qui peut se révéler dangereux pour la santé. Par ailleurs, ces produits présentent une grande variabilité de leurs constituants chimiques, leur attribuant de nombreuses propriétés médicinales et biologiques qu'il convient de connaître et de valoriser. Leur activité antimicrobienne, constituant une de leurs grandes vertus, fait l'objet aujourd'hui de nombreux travaux de recherche, en testant ces huiles sur différents microorganismes (bactéries, champignons, virus, etc.), faisant ainsi de ces extraits naturels des agents antimicrobiens potentiels.

Dans notre présent travail, nous allons mis en évidence le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles Marocaines sélectionnées sur *Flavobacterium spp.* Ce pathogène est complexe avec des particularités génétiques, culturelles et pathogéniques. Ainsi, il s'avère important de déterminer les facteurs de virulence de ce pathogène. Ces données seront détaillées dans la partie qui suit.

II. Introduction

L'utilisation des antibiotiques est intensément compromise par le développement de la résistance bactérienne aux médicaments les plus couramment prescrits (Goossens, 2009), ce qui augmente les coûts de santé, la morbidité et la mortalité, et menace d'un retour à l'ère pré-antibiotique (WHO, 2012). En outre, le développement de nouveaux antibiotiques représente actuellement un vrai défi avec beaucoup de complications et contraintes (Carlet et al., 2011 ; Cars et al., 2011 ; Grundmann et al., 2011 ; Wright et Poinar, 2012). La solution à ce problème s'avère ainsi cruciale et nécessite la recherche de nouvelles voies alternatives.

Les plantes médicinales constituent un réservoir de molécules potentialisatrices à large spectre d'action (Hemaiswarya et al., 2008 ; Langeveld et al., 2013). Les plantes synthétisent, de manière constitutive ou induite, une multitude de molécules antimicrobiennes (Jones et Dangl, 2006 ; Gibbons, 2008). L'originalité de ce système de défense réside dans l'exceptionnelle variabilité chimique des molécules produites (Cowan, 1999 ; Gibbons, 2008). Ces dernières constituent, de par la diversité des groupements structuraux et fonctionnels qu'elles arborent, un vaste réservoir de substances actives.

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibactérienne (Gibbons, 2008).

Dans cette optique, plusieurs travaux ont été conduits dans le but d'étudier les différentes propriétés des huiles essentielles, composante importante des plantes médicinales, et qui est reconnue par sa grande richesse en substances bioactives (Pinto et al., 2006 ; Karioti et al., 2006 ; Basem, 2007 ; Marzouk et al., 2009 ; Imelouane et al., 2009 ; Sokovic et al., 2009 ; Amarti et al., 2010 ; Fadli et al., 2011 ; Kazemi et al., 2012).

Le but escompté de cette étude est de tester l'activité antibactérienne d'une gamme d'huiles essentielles sur nos isolats du genre *Flavobacterium* ainsi que quelques souches de l'espèce *Flavobacterium psychrophilum*. Nous avons utilisé la méthode des disques et la méthode des dilutions pour mettre en évidence cette activité.

III. Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique

A partir des souches isolées au niveau du laboratoire de Biologie et Biotechnologies des microorganismes (LBBM) de l'Université Cadi Ayyad – Marrakech, et les souches de références de l'espèce *Flavobacterium psychrophilum* importées de la France et de la Suisse, nous avons établi une collection bactérienne sur lesquelles l'effet inhibiteur des huiles essentielles sera testé.

2 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour les tests antibactériens est le "TYES Agar" et le bouillon TYES. Les souches ont été mises en suspension dans le bouillon. La turbidité de l'inoculum correspondait à environ 10^6 UFC/ml.

3 Etude microbiologique

a. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque

C'est une méthode qualitative qui permet de tester sur milieu de culture l'action d'un agent antibactérien et de donner des indications sur son efficacité in vitro.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été déterminée séparément, en utilisant la méthode de diffusion par disque. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible,

elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs.

La technique utilisée est une modification de la méthode de Rota et al. (2008). Cette méthode consiste à ensemercer par inondation des boîtes de Pétri, contenant 20 ml de la gélose, avec une culture bactérienne jeune. La suspension bactérienne est de densité équivalente au standard 0,5 de MacFarland (10^8 Unité Formant Colonie (UFC)/ml). Ensuite des disques de papier filtre stérile (Whatman n° 1, à 6 mm de diamètre) sont imbibés avec 10 μ L de chaque huile essentielle appliquée séparément et placée à la surface du milieu ensemercé. La zone où les bactéries n'ont pas pu se développer présente le diamètre d'inhibition, traduisant l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, est ainsi déterminé (figure 17).

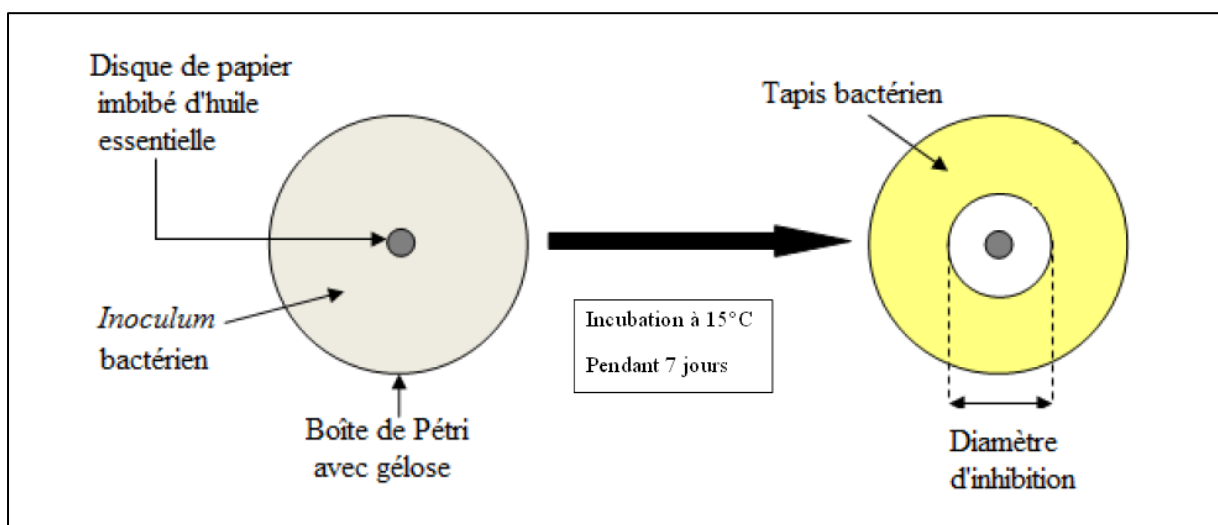


Figure 167 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

20 ml de milieu gélosé TYES sont coulés par boîte de Pétri. 2 ml d'inoculum sont inoculés sur chaque boîte. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration.

A la surface de chaque boîte, quatre disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (bioMérieux) sont déposés.

✚ Essai réalisé

Un disque imbibé avec 10 μ L de chaque huile essentielle, en plus d'un témoin négatif contenant 10 μ L d'eau distillée stérile avec 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO) sont déposés sur l'inoculum déjà inoculés. Les boîtes sont laissées 4 heures à 4°C, pour assurer la diffusion des huiles essentielles sur gélose puis retournées et incubées à 15°C pendant 7 jours. Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres, disque inclus. Chaque test a été répété trois fois.

b. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Méthode de dilution en milieu liquide (Figure 18)

La CMI a été déterminée en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide (Ahmad et Aqil, 2007) avec quelques modifications. Brièvement, trois à quatre colonies de la culture bactérienne fraîchement cultivées de chaque souche d'essai ont été inoculées dans 9 ml de bouillon TYES et incubées à 15°C. La culture bactérienne est ajustée de façon appropriée dans le bouillon TYES pour obtenir une suspension bactérienne d'environ 10^8 UFC/ml. Une série de concentrations des huiles essentielles dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) 10% a été réalisée, variant selon une progression géométrique de base de 2.

Dans chaque tube à hémolyse contenant 4250 μ L de bouillon TYES, on ajoute 500 μ L de la dilution de l'huile et 250 μ L de la suspension bactérienne. Ensuite, le mélange est soigneusement mélangé, et les tubes inoculés ont été incubés à 15°C pendant 7 jours. Des témoins négatifs et un blanc du DMSO ont été également testés. La CMI a été définie comme la plus faible concentration de l'huile essentielle qui inhibe la croissance visible de la souche testée.

La concentration minimale bactéricide (CMB) a été déterminée en répartissant 0,1 ml des tubes limpides, qui n'ont montré aucune croissance visible après incubation pendant le test de la CMI, sur des boîtes de gélose TYES. La CMB a été définie comme la plus faible concentration bactéricide.

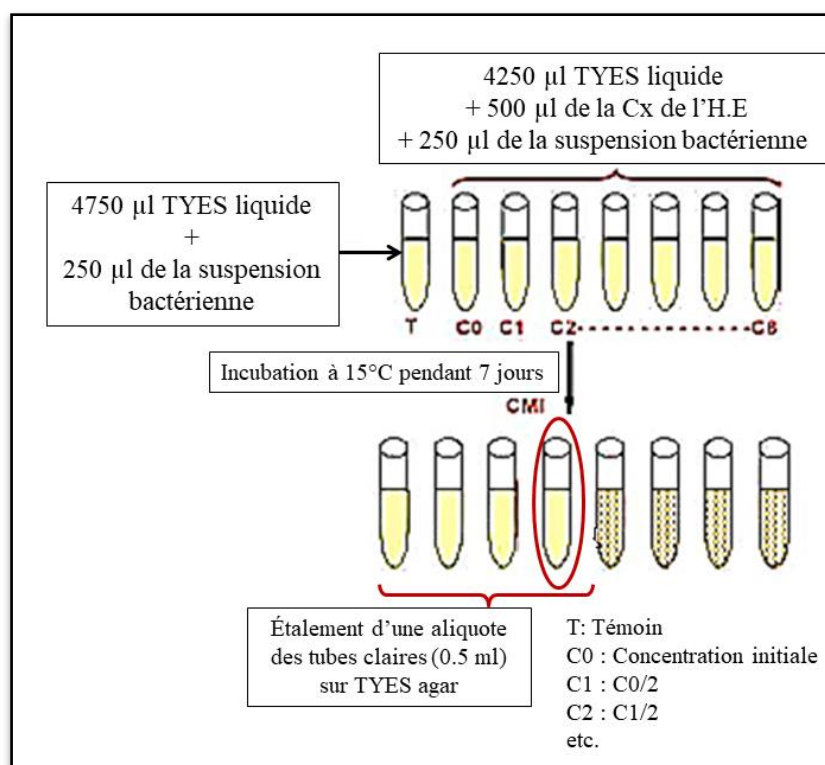


Figure 178 : Méthode de dilution en milieu liquide pour la détermination de la CMI.

✚ *Technique de microdilution en milieu liquide* (Carson et al., 1995)

L'huile essentielle à tester est dissoute dans des tubes à hémolyse stériles. Une série de concentrations des huiles essentielles dans le DMSO 10% a été réalisée, variant selon une progression géométrique de base de 2, allant de 0,035 à 11,24 µg/mL de manière à générer une gamme de dilution de base 2. La gamme de concentration est alors reproduite dans une microplaque à 96 puits. 100 µL de chaque dilution sont transférés dans les puits de la microplaque, qui contiennent chacun 850 µL de milieu TYES inoculé avec un volume de 50 µl de suspension bactérienne à 10^6 UFC.mL⁻¹. Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif.

Après 7 jours d'incubation à 15°C, la CMI de l'huile essentielle est déduite à partir du premier puits de la gamme dépourvu de croissance bactérienne. La lecture est effectuée après l'ajout de 50 µL de chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT, Sigma-Aldrich). La présence de bactéries vivantes est détectée par la coloration en rose de l'INT (figure 19). Chaque test est réalisé en triplicata.

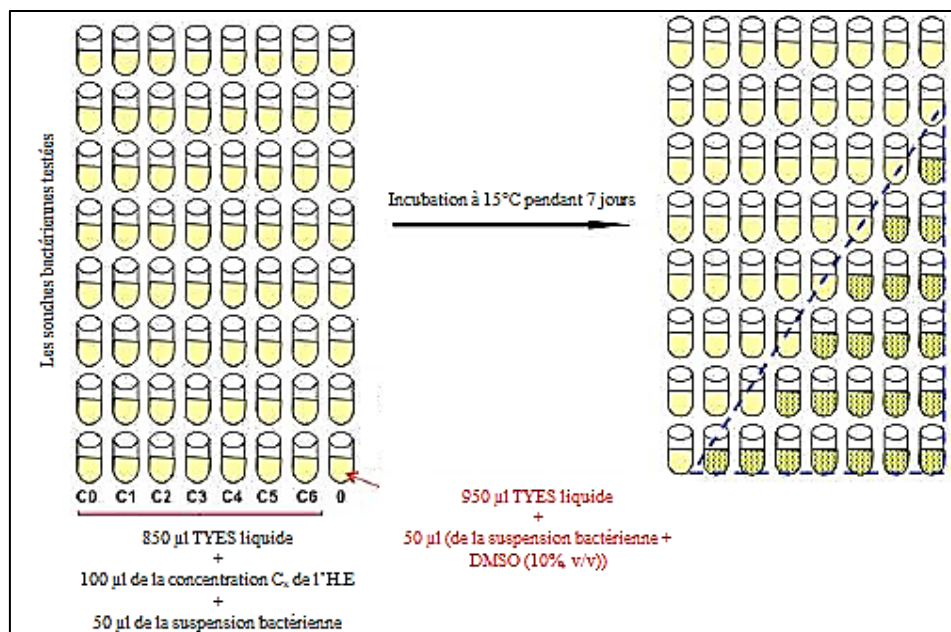


Figure 189 : Technique de microdilution en milieu liquide.

c. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle. La même gamme de concentration, réalisée par la technique de microdilution, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle à tester (figure 20). Des prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien puis déposés «en strie» sur gélose TYES. Les boîtes ensemencées sont incubées 7 jours à 15°C.

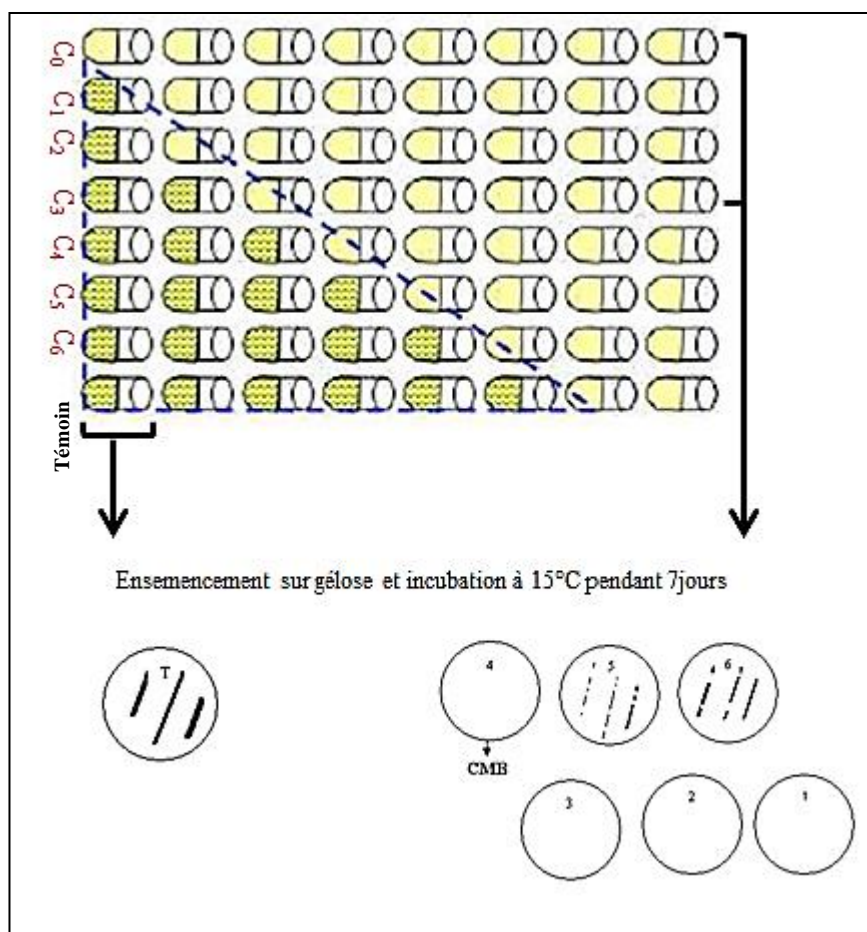


Figure 19 : Détermination de la CMB en milieu solide.

La CMB de l'huile essentielle est déduite à partir de la première boîte dépourvue de bactérie. Chaque expérience est réalisée trois fois.

IV. Résultats

1. Criblage de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur *Flavobacterium spp.*

L'activité anti-flavobactérienne des différentes huiles essentielles étudiées (*Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Cladanthus mixtus*, *Lavandula officinalis*, *Cedrus atlantica*, *Eucalyptus globulus*, *Pelargonium graveolens*, *Thymus Maroccanus*, *Thymus broussonetii*, *Syzygium aromaticum* et *Origanum compactum*) a été évaluée par la méthode de diffusion par disque. Les résultats du criblage sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 161 : Valeurs moyennes des zones d'inhibition (cm) - Tests de confrontation par méthode de diffusion en milieu gélosé.

Isolats	Zones d'inhibition des huiles essentielles en (cm)													
	<i>R. officinalis</i> (10µl)*	<i>S. officinalis</i> (10µl)	<i>C. mixtus</i> (10µl)	<i>L. officinalis</i> (10µl)	<i>C. atlantica</i> (10µl)	<i>E. globulus</i> (10µl)	<i>P. graveolens</i> (10µl)	<i>T. Marocanus</i> (10µl)	<i>T. broussonetii</i> (10µl)	<i>S. aromatica</i> (10µl)	<i>O. compactum</i> 1,2,3 (10µl)	<i>O. compactum</i> 4 (10µl)	<i>O. compactum</i> 5 (10µl)	
Isolats de l'Hiver	201	-	-	1.0	-	0.8	1.8	2.0	4.0	3.8	1.4	4.0	-	-
	202	-	-	-	-	-	1.4	1.8	4.5	4.0	1.6	4.2	1.0	0.8
	203	-	-	-	3.6	2.0	3.0	4.2	4.6	4.0	1.8	4.6	-	-
	204	-	-	-	-	-	2.5	2.8	5.0	4.1	2.0	4.8	1.0	0.8
	205	-	-	-	-	-	2.0	2.1	4.8	3.9	2.2	5.0	-	-
Isolats du Printemps	401	-	-	-	3.6	-	1.5	1.0	4.0	3.2	1.5	4.0	1.0	0.8
	402	-	-	-	1.0	-	2.1	2.0	4.6	3.0	2.4	4.2	-	-
	403	-	-	-	1.3	-	1.6	1.6	4.2	3.0	1.8	4.0	-	-
	404	0.8	0.8	0.8	-	2.0	2.8	2.0	4.0	2.9	1.2	4.0	1.0	0.8
	405	-	-	-	3.0	1.7	0.8	-	3.8	3.0	1.8	3.8	-	-
	406	-	-	0.8	3.2	-	-	1.3	5.0	3.8	-	5.0	1.0	0.8
	407	-	-	-	2.4	-	1.2	1.6	5.4	4.0	1.4	4.2	-	-
	408	-	-	1.9	2.8	1.4	0.8	1.9	4.5	4.0	2.1	4.2	1.2	1.0
	409	-	-	-	-	-	1.0	1.0	5.0	4.2	1.0	4.8	-	-
Isolats de L'Eté	901	-	-	-	1.0	-	1.5	-	4.0	3.8	1.8	3.8	1.0	1.0
	902	-	-	-	-	-	-	2.4	4.8	3.7	1.6	4.2	-	-
	903	0.8	-	1.0	-	1.8	2.8	3.0	5.4	4.6	0.8	5.0	1.0	1.0
	904	-	-	-	-	-	-	1.0	4.0	3.2	2.1	4.8	-	-
	905	-	-	-	3.6	1.2	-	1.8	5.0	3.8	1.6	4.8	-	-
	906	-	-	0.8	3.4	2.6	0.8	1.5	5.6	4.0	1.4	4.8	0.8	0.8

	907	-	-	-	-	-	-	1.0	6.0	4.4	-	5.0	-	-
	908	-	-	0.8	3.1	2.4	2.0	1.5	5.4	4.6	2.2	4.0	1.1	0.8
	909	-	-	-	2.0	1.4	-	-	4.4	3.9	-	4.0	-	-
	910	-	-	-	-	-	-	-	4.0	3.6	-	4.2	-	-
	911	-	-	-	1.1	-	1.4	-	4.5	3.2	-	4.5	-	-
	912	-	-	1.0	1.2	1.2	0.8	1.2	5.4	4.2	1.4	6.0	1.0	1.0
	913	-	-	1.6	2.4	2.0	-	-	5.8	4.6	1.8	5.6	0.8	1.1
	914	-	-	-	3.4	1.2	-	-	5.6	4.8	0.8	5.0	-	-
Isolats de l'Automne	111	-	-	-	-	-	-	-	4.2	3.8	-	4.0	1.0	0.8
	112	-	-	-	-	-	-	-	4.6	3.6	-	4.8	-	-
	113	-	-	1.7	3.2	1.9	-	-	5.6	4.2	1.9	5.4	0.8	1.2
	114	-	-	-	2.8	1.2	-	1.2	4.6	3.4	2.0	4.0	-	-
	115	-	-	2.0	-	-	2.4	3.4	5.6	4.2	1.0	4.8	1.0	1.2
	116	-	-	-	-	-	1.6	-	5.0	4.2	-	4.2	-	-
	117	0.8	0.8	1.0	3.4	1.6	3.5	3.0	5.4	4.6	0.8	5.4	1.0	1.0
	118	0.8	0.8	1.0	3.4	1.6	3.5	3.0	5.4	4.2	1.4	5.4	1.0	1.0
Souches de référence	442	-	-	-	3.0	1.4	-	-	5.4	4.0	1.8	5.0	-	-
	445	-	-	1.1	2.6	-	-	-	4.6	4.0	1.6	4.0	-	-
	817	-	-	-	1.5	-	-	-	3.8	3.0	-	4.2	-	-
	733	-	-	1.0	1.6	-	-	-	4.0	3.2	-	4.6	-	-
	738	-	-	-	3.2	-	-	-	5.0	4.2	-	4.2	-	-
	607	-	-	0.8	3.0	-	-	-	4.2	3.4	-	4.2	-	-
	760	-	-	-	2.4	-	-	-	4.0	3.6	-	4.0	-	-

Le diamètre de la zone d'inhibition inclut le diamètre du disque (6mm)

* : charge du disque

- : pas d'inhibition

Mutai et al. (2009) ont proposé une échelle pour l'estimation de l'activité antimicrobienne. Ainsi, les diamètres d'inhibition générés sont classés en cinq catégories :

- Très fortement inhibitrice : $D \geq 30$ mm
- Fortement inhibitrice : $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm
- Modérément inhibitrice : $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm
- Légèrement inhibitrice : $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm
- Non inhibitrice : $D < 10$ mm.

Les huiles essentielles testées ont démontré un large spectre antibactérien (Tableau 23). Respectivement, les huiles essentielles de *T. maroccanus* et d'*O. compactum* (échantillons 1, 2 & 3) sont très actives sur les souches testées, en produisant des diamètres d'inhibition variant entre 38 et 60mm. Suivi par de *T. broussonetii* avec une activité aussi forte mais moins importante avec des diamètres d'inhibition allant de 30 à 48mm. Le *P. graveolens* et la *L. officinalis* viennent en troisième position avec une activité plus faible et des diamètres d'inhibition variant entre 6 et 42mm et 6 et 36mm respectivement. Quant à *E. globulus* et *S. aromaticum*, leurs huiles essentielles présentent une activité moins importante et des diamètres d'inhibition variant entre 6 et 30,5mm et 6 et 20,4mm respectivement. Les huiles essentielles de *C. atlantica* et *C. mixtus* présentent une faible activité avec des diamètres d'inhibition oscillant entre 6 et 26mm et 6 et 19mm respectivement.

Avec des diamètres d'inhibition ne dépassant pas 8mm, les huiles essentielles de *R. officinalis* et *S. officinalis* ne présentent pas d'activité anti-flavobactérienne.

Le choix des huiles essentielles utilisées pour la réalisation de cette étude, a été orienté à l'issue des résultats du test préliminaire visant à sélectionner les huiles les plus actives contre *Flavobacterium spp.* Basé sur la méthode de diffusion par disque, ce test permet d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles à partir des diamètres d'inhibition qu'elles génèrent sur un *inoculum* bactérien standardisé. Parmi les huiles essentielles criblées, celles présentant la plus haute activité ont été sélectionnées en vue d'étudier leur mode d'action sur *Flavobacterium spp.*

Les huiles *T. maroccanus*, *O. compactum*, *P. graveolens*, *L. officinalis*, *E. globulus* et *S. aromaticum*, ont montré la plus haute activité anti-flavobactérienne. Sur la base de cette activité, ces huiles essentielles ont été sélectionnées.

2 Caractérisation du mode d'action des huiles essentielles sur *Flavobacterium spp.*

Des tests de détermination de CMI et de la CMB ont été réalisés afin de préciser le caractère bactériostatique ou bactéricide des huiles essentielles sélectionnées.

➤ Détermination des CMI et de la CMB des huiles essentielles

Une analyse quantitative de l'activité des huiles essentielles via la détermination de la CMI et la CMB a donné les résultats présentés dans le tableau 22.

Avec une CMI égale à 0,140mg/ml, l'huile essentielle d'*O. compactum* a inhibé la totalité des souches bactériennes testées, sauf la souche codée « 111 », qui n'a été inhibée que par une concentration égale à 0,562mg/ml.

Les huiles essentielles de *T. maroccanus* et *T. broussonetii* inhibent la croissance des bactéries à des concentrations minimales allant de 0,148 à 0,595 mg/ml et 0,145 à 0,583 mg/ml respectivement.

L'activité de l'huile essentielle d'*E. globulus* s'est montrée moyenne, comme l'ont démontré les résultats de l'activité antibactérienne, avec des CMI variant entre 0,506 et plus de 4,053 mg/ml. Les CMI de *P. graveolens* vis-à-vis des bactéries testées varient de 0,565 à 4,52 mg/ml selon les souches. Pour l'huile essentielle de *L. officinalis*, elle inhibe les bactéries à des concentrations minimales allant de 0,605 à plus de 4,836 mg/ml.

Quant à l'huile essentielle de *S. aromaticum* dont l'activité s'est avérée faible comparativement aux autres huiles essentielles, elle est active contre les souches testées à des CMI variant entre 1,347 et plus de 5,390 mg/ml.

Il est également important de mentionner que la CMI est souvent équivalente à la CMB chez *O. compactum*, *T. maroccanus* et *T. broussonetii*, ce qui indique une action bactéricide de ces trois huiles essentielles.

Le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle est défini par le rapport CMB/CMI. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide (Guinoiseau, 2010) (Tableau 23).

Tableau 172 : Tests de détermination de la CMI et de la CMB des huiles essentielles sur *Flavobacterium spp.*

	Code S Souc hes	CMI et CMB (mg/ml) des Huiles essentielles contre les souches testées													
		<i>L. officinalis</i>		<i>E. globulus</i>		<i>P. graveolens</i>		<i>T. maroccanus</i>		<i>T. brousontii</i>		<i>S. aromaticum</i>		<i>O. compactum 1, 2, 3</i>	
		CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
Isolats de l'Hiver	201	0.605	-	0.506	-	4.52	-	0.148	0.595	0.145	0.583	1.347	-	0.140	0.140
	202	0.605	-	1.013	-	0.565	-	0.148	0.595	0.145	0.583	1.347	-	0.140	0.140
	203	0.605	-	2.026	-	1.130	-	0.148	0.148	0.145	0.145	1.347	-	0.140	0.140
	204	4.836	-	1.013	-	1.130	-	0.595	2.38	0.145	2.332	5.390	-	0.140	0.140
	205	2.418	-	1.013	-	2.260	-	0.297	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
Isolats du Printemps	401	4.836	-	4.053	-	4.52	-	0.148	4.76	0.145	4.665	5.390	-	0.140	0.140
	402	0.605	-	1.013	-	4.52	-	0.148	0.595	0.145	0.583	1.347	-	0.140	0.140
	403	4.836	-	0.506	-	4.52	-	0.595	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	404	4.836	-	0.506	-	4.52	-	0.297	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	405	0.605	-	2.026	-	0.565	-	0.148	0.148	0.145	0.145	1.347	-	0.140	0.281
	406	1.210	-	2.026	-	1.130	-	0.148	0.148	0.145	0.145	2.695	-	0.140	0.562
	407	0.605	-	1.013	-	0.565	-	0.297	1.19	0.145	1.166	1.347	-	0.140	0.140
	408	2.418	-	1.013	-	4.52	-	0.595	1.19	0.145	1.166	2.695	-	0.140	0.140
	409	1.210	-	1.013	-	2.260	-	0.297	1.19	0.145	1.166	2.695	-	0.140	0.140
Isolats de l'Eté	901	1.210	-	2.026	-	0.565	-	0.148	0.148	0.145	0.145	2.695	-	0.140	0.140
	902	1.210	-	1.013	-	1.130	-	0.148	0.148	0.145	0.145	1.347	-	0.140	0.562
	903	0.605	-	1.013	-	0.565	-	0.148	0.595	0.145	0.583	2.695	-	0.140	0.140
	904	4.836	-	1.013	-	4.52	-	0.297	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	905	4.836	-	0.506	-	4.52	-	0.595	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	906	2.418	-	1.013	-	4.52	-	0.297	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	907	1.210	-	> 4.053	-	> 4.52	-	0.148	0.595	0.145	2.332	2.695	-	0.140	0.140
	908	4.836	-	1.013	-	1.130	-	0.595	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140

	909	4.836	-	0.506	-	1.130	-	0.297	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	910	> 4.836	-	1.013	-	4.52	-	0.148	0.595	0.145	0.583	5.390	-	0.140	0.140
	911	1.210	-	2.026	-	0.565	-	0.297	1.19	0.145	1.166	2.695	-	0.140	0.140
	912	1.210	-	2.026	-	1.130	-	0.595	1.19	0.145	1.166	2.695	-	0.140	0.140
	913	4.836	-	2.026	-	0.565	-	0.595	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	914	0.605	-	0.506	-	0.565	-	0.148	0.595	0.145	0.583	2.695	-	0.140	0.140
Isolats de l'Automne	111	> 4.836	-	> 4.053	-	> 4.52	-	0.595	2.38	0.583	4.665	5.390	-	0.562	1.125
	112	0.605	-	2.026	-	> 4.52	-	0.297	1.19	0.145	1.166	2.695	-	0.140	0.140
	113	0.605	-	2.026	-	1.130	-	0.148	0.148	0.145	0.145	1.347	-	0.140	0.140
	114	4.836	-	0.506	-	1.130	-	0.595	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	115	1.210	-	1.013	-	4.52	-	0.297	1.19	0.145	1.166	2.695	-	0.140	0.140
	116	2.418	-	1.013	-	4.52	-	0.595	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
	117	0.605	-	0.506	-	2.260	-	0.148	0.595	0.145	0.583	2.695	-	0.140	0.140
	118	4.836	-	1.013	-	0.565	-	0.297	1.19	0.145	1.166	5.390	-	0.140	0.140
Souches de référence	442	> 4.836	-	2.026	-	> 4.52	-	0.148	0.595	0.145	0.583	5.390	-	0.140	0.140
	445	0.605	-	1.013	-	0.565	-	0.595	1.19	0.145	1.166	2.695	-	0.140	0.140
	817	0.605	-	1.013	-	1.130	-	0.148	0.148	0.145	0.145	1.347	-	0.140	0.140
	733	1.210	-	2.026	-	1.130	-	0.148	0.148	0.145	0.145	2.695	-	0.140	0.140
	738	> 4.836	-	4.053	-	> 4.52	-	0.148	0.595	0.145	0.583	5.390	-	0.140	0.140
	607	> 4.836	-	4.053	-	> 4.52	-	0.595	1.19	0.145	1.166	> 5.390	-	0.140	0.140
	760	> 4.836	-	4.053	-	4.52	-	0.297	1.19	0.145	1.166	> 5.390	-	0.140	0.140

Tableau 183 : Concentration minimale inhibitrice CMI et bactéricide CMB des huiles essentielles à pouvoir bactéricide et le rapport CMI/CMB.

Souches	Les huiles essentielles									
	<i>T. maroccanus</i>			<i>T. broussontii</i>			<i>O. compactum 1,2,3</i>			
	CMI	CMB	CMB/ CMI	CMI	CMB	CMB/ CMI	CMI	CMB	CMB/ CMI	
Isolats de l'Hiver	201	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	202	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	203	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.140	1
	204	0.595	2.38	4	0.145	2.332	16.08	0.140	0.140	1
	205	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
Isolats du Printemps	401	1.19	4.76	4	0.145	4.665	32.17	0.140	0.140	1
	402	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	403	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	404	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	405	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.281	2
	406	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.562	4
	407	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	408	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	409	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
Isolats de l'Eté	901	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.140	1
	902	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.562	4
	903	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	904	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	905	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	906	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	907	0.148	0.595	4.25	0.145	2.332	16.08	0.140	0.140	1
	908	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	909	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1

	910	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	911	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	912	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	913	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	914	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
Isolats de l'Automne	111	0.595	2.38	4.75	0.583	4.665	32.17	0.562	1.125	2
	112	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	113	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.140	1
	114	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	115	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	116	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	117	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	118	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
Souches de référence	442	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	445	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	817	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.140	1
	733	0.148	0.148	1	0.145	0.145	1	0.140	0.140	1
	738	0.148	0.595	4.25	0.145	0.583	4.02	0.140	0.140	1
	607	0.595	1.19	2	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1
	760	0.297	1.19	4	0.145	1.166	8.04	0.140	0.140	1

Les rapports CMB/CMI de l'huile d'*O. compactum* sont égaux à 1 chez 97,5% des souches testées et inférieurs ou égal à 4 pour le reste. Cette huile essentielle exerce donc une action bactéricide contre les souches de *Flavobacterium spp.*

Pour l'huile essentielle de *T. maroccanus*, les rapports CMB/CMI sont inférieurs ou égal à 4 pour 74,41% des souches testées sur lesquelles, elle exerce un pouvoir bactéricide. Pour le reste des bactéries (25,59%), le pouvoir antibactérien de cette huile essentielle est bactériostatique, vu que les rapports CMB/CMI sont supérieurs à 4.

Quant à l'huile essentielle de *T. broussonetii*, l'analyse des rapports CMB/CMI montre qu'ils sont supérieurs à 4 pour 81,40% des souches testées ce qui permet de déduire que son pouvoir est bactériostatique.

V. Discussion

Ces expériences in vitro ont démontré une efficacité antimicrobienne effective des huiles essentielles de *T. maroccanus*, et des trois échantillons (1,2 & 3) d'*O. compactum*. Elles sont très actives sur les souches testées. Ces huiles sont suivies par celle de *T. broussonetii* avec une activité aussi forte mais moins importante. Les huiles essentielles du *P. graveolens*, *L. officinalis*, *E. globulus* et *S. aromaticum* présentent une activité antibactérienne variant entre forte et moyenne. En effet, elles se sont montrées plus actives comparativement à celles de *C. atlantica*, *C. mixtus* et *S. officinalis* excepté pour l'huile essentielle de *R. officinalis* qui semble être inefficace sur *Flavobacterium spp.* Ce qui concorde avec les résultats de Pintore et al. (2002) qui ont rapporté que l'huile essentielle de *R. officinalis* de Sardaigne présente une activité antibactérienne modérée.

Ces résultats nous ont poussé à éliminer les quatre huiles essentielles (*C. atlantica*, *C. mixtus*, *S. officinalis* et *R. officinalis*) en raison de leur faible activité inhibitrice contre les souches étudiées. Des données plus précises sur les propriétés antimicrobiennes ont été obtenues par la détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI) et bactéricides (CMB).

Les plantes, appartenant aux genres *Origanum* et *Thymus*, sont très répandues sur les pourtours du bassin méditerranéen. L'Origan (genre *Origanum*) a été classé par Ietswaart (1980) en 74 espèces, sous-espèces, variétés ou hybrides. L'huile essentielle d'origan est connue par son pouvoir antimicrobien important. Sa composition très riche et diversifiée vient de sa composition chimique riche en phénols.

A travers l'évaluation in-vitro par diffusion en milieu solide du pouvoir anti-bactérien des échantillons de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* aussi bien sur des souches de

références de *Flavobacterium psychrophilum* que sur des souches *Flavobacterium spp.* isolées à la station piscicole Ain Aghbal, il paraît évident que toutes les souches bactériennes testées ont présenté une sensibilité vis-à-vis de cette huile essentielle avec des degrés de sensibilité similaire. Ces résultats ont été encore confirmés par les valeurs des CMI et CMB trouvées.

Le genre *Thymus* comprend plus de 350 espèces (Dob et al., 2006). L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives. Ces huiles sont composées de nombreuses molécules présentant une grande diversité de structure. Cette variabilité chimique confère aux huiles essentielles des bioactivités diversifiées (Arras et Grella., 1992 ; Cosentino et al., 1999 ; Juliano et al., 2000).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de notre échantillon de l'huile essentielle de *Thymus maroccanus* a montré qu'elle est dotée d'un pouvoir antibactérien important que celui obtenu avec *T. broussonetii*. Avec des concentrations minimales bactéricides proches des concentrations minimales inhibitrices, l'huile essentielle de *T. maroccanus* inhibe la croissance de plus que 70% des souches de *Flavobacterium spp.* étudiées par une action de type bactéricide, contre seulement 18% pour l'huile essentielle de *T. broussonetii*. Nos résultats concordent, en partie, avec ceux rapportés par Jaafari et al. (2007) qui ont démontré que les huiles essentielles de *T. maroccanus* et *T. broussonetii* présentent un fort pouvoir antimicrobien. Ce qui montre que quelle que soit la composition chimique de ces deux espèces de thym, leur pouvoir antimicrobien reste le même. Plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles des thym à thymol ou à carvacrol comme *T. spathulifolius* (Sokmen et al., 2004), *T. vulgaris* (Giordani et al., 2006a ; Viuda-Martos et al., 2007) et *T. pulegioides* (Pinto et al., 2006) exercent une forte activité antimicrobienne.

La présente étude a permis de mettre en évidence une activité anti-bactérienne remarquable des huiles essentielles d'origan (*Origanum compactum*) et du thym (*Thymus maroccanus*) vis-à-vis de la bactérie *Flavobacterium spp.*. Cette efficacité observée contre les souches de *Flavobacterium spp.* a été également citée par de nombreux travaux, notamment ceux réalisés avec des huiles essentielles contre *Escherichia coli O157:H7*, qui ont montré des propriétés bactéricides intéressantes de l'HE d'origan et de Thym sur cette espèce (Burt, 2004). L'importante bio-activité de ces HE est en relation avec leurs teneurs en carvacrol et thymol. En effet, Sivropoulou et al. (1996), Satrani et al. (2007) et Trombetta et al. (2005) ont montré que les huiles essentielles riches en dérivés phénoliques (Carvacrol et Thymol) possèdent une forte activité anti-microbienne. Dorman et Deans (2000), Aligiannis et al. (2001), Friedman et al. (2002) et Zohary et al. (2004) ont rapporté également que l'activité anti-bactérienne de ces huiles essentielles est en grande partie attribuée à ces deux composants.

Le carvacrol est considéré comme biocide, avec son précurseur le p-cymène, doué d'un pouvoir anti-bactérien faible, mais agissant probablement en synergie, par l'expansion de la membrane, ce qui entraîne sa déstabilisation (Ultee et al., 2002 ; Cristiani et al., 2007 ; Jamali et al., 2013). Pour son large spectre d'action anti-microbienne, le carvacrol a fait l'objet de plusieurs études (Baydara et al., 2004 ; Bouhdid et al., 2005 ; Chami et al., 2005 ; Ben Arfa et al., 2006 ; Veldhuizen et al., 2006) et il est également efficace contre des bactéries, des levures, des champignons, des insectes et des acariens (Dorman et Deans, 2000 ; Chami et al., 2005 ; Ben Arfa et al., 2006 ; Jeong et al., 2008). Son activité anti-bactérienne a été attribuée à son caractère hydrophobe et la présence d'un groupe hydroxyle libre. Le carvacrol agit sur la membrane cytoplasmique, avec des effets considérables sur les propriétés structurales et fonctionnelles de la membrane elle-même, qui devient de plus en plus perméable aux protons et aux ions et perd son intégrité (Lambert et al., 2001; Ben Arfa et al., 2006). Gill et Holley (2006) ont montré que le carvacrol est capable d'inhiber l'adénosine-triphosphatase (ATPase). Selon Pozzati et al. (2010), le principal mécanisme de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est associé à leur caractère lipophile, et par conséquent à l'interaction avec la membrane de la cellule microbienne. Ces interactions peuvent entraîner des changements et des pertes dans les composants enzymatiques et structuraux des cellules bactériennes, telles que l'ATPase, le 1,3- β -D-glucane synthase, la chitine, et les mannanes. L'inhibition de la chaîne respiratoire est considérée également comme le résultat des interactions entre les huiles essentielles et la membrane mitochondriale. Tout ceci peut conduire à la réduction de la production de l'énergie et par conséquent une réduction de la croissance cellulaire (Khrich et al., 2017 ; Burt, 2004).

Sikkema et al. (1994), Cox et al. (2000), Ultee et al. (2002) Carson et al. (2002) ont indiqué qu'en général, le premier site d'action des huiles essentielles sur les cellules microbiennes est la membrane plasmique. Ceci est directement lié à l'hydrophobicité des molécules qui entrent dans la composition des huiles essentielles. Cette propriété facilite leur insertion entre les phospholipides membranaires et assure leur solubilisation dans la bicouche lipidique. Il s'ensuit une déstabilisation de la structure de la membrane plasmique et une modification de sa perméabilité aux ions, protons et autres constituants cellulaires. En plus des altérations membranaires provoquées, ces molécules peuvent franchir la bicouche lipidique, pénétrer à l'intérieur des cellules et interagir avec des cibles intra-cytoplasmiques (Cristiani et al., 2007). Compte tenu de la diversité chimique des huiles essentielles, il semble plus probable que leurs activités antimicrobiennes résultent de l'association de plusieurs mécanismes, qui s'exercent

sur différentes cibles cellulaires (Burt, 2004). Tous les résultats rapportés par ces différents auteurs plaident en faveur d'une altération de la membrane plasmique des cellules bactériennes ou fongiques.

Il ressort également dans nos résultats concernant la comparaison entre les valeurs de CMI et CMB obtenues pour chaque souche, qu'il n'existe aucune différence (dans la majorité des résultats, la CMI égale à la CMB) entre les souches de référence et nos isolats.

Il importe de souligner que la résistance antimicrobienne souvent décrite pour les souches isolées cliniquement est principalement liée aux antibiotiques et jusqu'aujourd'hui aucune résistance bactérienne aux huiles essentielles n'a été rapportée ou démontrée (Bakkali et al., 2008). Ceci serait probablement dû au mode d'action de ces huiles affectant simultanément différentes structures de la cellule bactérienne (Bakkali et al., 2008).

VI. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles de 16 espèces des plantes aromatiques et médicinales. En effet, les huiles essentielles d'*Origanum compactum* et de *Thymus maroccanus* sont dotées d'un pouvoir antibactérien de nature bactéricide beaucoup plus important que les autres huiles essentielles testées. Ainsi, toutes nos souches bactériennes n'ont présentées aucune tolérance en faveur de ces deux huiles essentielles.

Cette différence est liée directement à la structure chimique des molécules qui entrent dans la composition de l'huile essentielle elle-même et des plantes dont elle est extraite.

Toutes ces informations témoignent du potentiel que présentent les huiles essentielles pour la recherche de molécules antibactériennes innovantes dans leur mode d'action.

Au terme de cette étude, nous pouvons conclure d'un côté que les espèces de thym et d'origan peuvent présenter un caractère préventif et curatif intéressant du fait de leur composition chimique aussi variée et diversifiée. La richesse de ces espèces en différentes classes de métabolites secondaires justifie leur grande efficacité en usage thérapeutique traditionnel. D'un autre côté, les huiles essentielles des espèces caractérisées sont riches en molécules à haute valeur ajoutée telles que le thymol, le carvacrol qui sont des molécules très recherchées. Ceci traduit l'intérêt économique que peut représenter l'huile essentielle de ces espèces comme source potentielle de molécules à vertus multiples.

Dans la partie du travail qui suit, nous allons essayer ces deux principes actifs séparément *in-vivo*, comme traitements alternatifs contre la maladie d'eau froide causée par *Flavobacterium* dans l'élevage.

PARTIE III

PHYTOTHERAPIE : DE LA TOXICITE A LA DOSE – DETERMINATION DU POUVOIR GUERISON DES PRINCIPES ACTIFS

1. Introduction
2. Matériel et méthodes
 - 2.1. Test de toxicité
 - 2.2. Test *in-vivo*
3. Résultats
 - 3.1. Test de toxicité
 - 3.2. Test *in-vivo*
4. Discussion
5. Conclusion

I. Introduction

L'intensification et l'industrialisation des systèmes d'élevage piscicole ont causé de nombreux problèmes sanitaires et environnementaux : De grandes quantités de poissons sauvages sont utilisées comme farine pour nourrir les poissons d'élevage, des pollutions liées aux traitements de certaines maladies de poissons par des antibiotiques, des risques de propagation de maladies des poissons d'élevage dans les circuits fermés et en élevage extensif. Une autre dérive de l'aquaculture réside dans les organismes génétiquement modifiés, l'utilisation des hormones de croissance, des hormones d'inversion sexuelle, l'utilisation des antiparasites et les traitements chimiques préventifs.

Dans l'objectif de préparer une certification de production biologique (Label BIO) de la station de pisciculture d'Ain Aghbal, nous avons testé et évalué l'effet anti-flavobactérien des huiles essentielles à travers une série des tests de confrontation *in-vivo* afin d'éliminer tout recours aux antibiotiques.

Suite au travail préliminaire effectué au laboratoire *in-vitro*, Les huiles essentielles retenues grâce à leur effet bactéricide contre la bactérie en question, sont l'Origan (*Origanum compactum*) et le Thym (*Thymus maroccanus*) Mais à cause de la composition chimique très diversifiée de ces deux huiles essentielles et la présence de plusieurs chémotypes d'une même huile essentielle, nous avons décidé de travailler avec leurs composants majoritaires phénoliques (principes actifs) : le carvacrol et le thymol.

L'importance de pousser scientifiquement les investigations sur les huiles essentielles des plantes aromatiques, sources potentielles de nouveaux composés bioactifs, vient de l'émergence des résistances bactériennes acquises vis-à-vis des antibiotiques. La contrainte majeure liée à l'utilisation des huiles essentielles ou des molécules actives issues des produits naturels est le problème de toxicité lié à l'utilisation non contrôlée et abusive de ces produits. Leur utilisation nécessite une recherche plus approfondie pour déterminer les posologies et les risques inhérents.

L'étude de la toxicité des huiles essentielles *in vivo*, demeure une étape clé pour savoir les seuils néfastes pour les organes et pour bien maîtriser les doses thérapeutiques administrées.

De ce fait, nous avons procédé à la réalisation d'un test de toxicité des deux principes actifs (Carvacrol et Thymol), sur les alevins pour définir la réponse de leurs corps et organes ; cela va servir pour la précision des doses thérapeutiques curatives pour les sujets malades et les doses thérapeutiques préventives pour les alevins après sevrage.

II. Matériel et méthodes

1 Test de toxicité

A partir d'une concentration seuil, certains éléments contenus dans l'eau deviennent toxiques vis-à-vis des êtres vivants dans le milieu. La quantification de la dose est fondamentale, car la plupart des éléments sont toxiques à partir de certaines doses vis-à-vis de certains organismes (y compris le sel, l'oxygène, etc.). Au contraire, l'ensemble des éléments dits toxiques ne le sont pas en deçà d'une certaine quantité, et peuvent même être utiles à faible dose, comme l'indique la courbe de Mitscherlich (Libes, 2013).

a. Tests létaux

Les mesures de toxicité aiguë sont les plus courantes. En toxicologie, on utilise la notion de dose toxique. On calcule en particulier la DL50 (dose létale qui tue 50 % de la population). Dans les milieux aquatiques, cette notion n'est pas utilisable et on préfère celle de concentration toxique (CL50). Il faut alors tenir compte de la relation entre la concentration et le temps de contact. On citera dans cette catégorie les tests poissons, portant sur la mortalité de jeunes poissons (3 à 6 cm) exposés pendant 24 à 96 h. On utilise en principe dix poissons par concentration testée et on détermine la CL50. Parmi les espèces les plus utilisées la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (norme NF T 90 305).

b. Tests sublétaux

Dans les tests de toxicité en milieu aquatique, on recherche parfois une inhibition de la mobilité et non un effet léthal difficile à mesurer. Le test daphnies, très pratiqué mesure par exemple la concentration immobilisant 50 % de la population de ces petites truites tests en 24h (CI 50-24h).

b.1. Protocole Expérimental

Notre première expérimentation a pour but de tester l'effet toxique des deux principes actifs «Thymol et Carvacrol» sur les alevins de la truite arc en ciel afin de déterminer la CL50 (Concentration létale 50 : concentration qui inhibe la mobilité de 50% de la population). Cette CL50 nous servira de base pour la détermination des doses thérapeutiques pour la suite de nos expérimentations.

Pour la réalisation de cette expérimentation, nous avons choisi quatre doses de substances actives calculées en fonction du poids corporel des alevins. Le choix de ces doses est basé sur

les travaux de Vinegar et al. (1973) et Jaafari (2007) effectués avec les mêmes principes actifs sur les rats.

Cette expérimentation a eu lieu au niveau de l'écloserie de la station Ain Aghbal dans des 10 bacs de 124,5L de volume (volume calculé à partir de la hauteur d'eau, la longueur et la largeur du bac).

Chaque bac contient 2 clayettes chacune contenant 20 alevins. Les alevins sujets à cette étude ont un poids moyen de 0,72g et une taille moyenne de 3,9 cm.

Deux répétitions ont été effectuées pour chaque concentration en principes actifs. Les deux bacs restants sont utilisés, l'un comme témoin positif et l'autre, témoin négatif.

Dans le témoin négatif, les alevins ne reçoivent que l'aliment naturel, quant au témoin positif, les alevins reçoivent l'aliment enrobé avec de l'huile végétale.

Un tri des alevins sains a eu lieu avant le début de l'expérimentation. 1ml d'eugénol concentré à 20% dilué dans 10 L d'eau a servi pour anesthésier les alevins (ces concentrations sont celles utilisées communément dans la station Ain Aghbal). A l'aide d'une règle graduée en centimètres, nous avons mesuré la taille des alevins, ensuite nous avons déterminé leur poids moyen de chaque clayette afin d'avoir une population homogène.

Ces alevins ont reçu un repas chaque matin pendant 6 jours. Avant sa distribution, l'aliment est enrobé par une concentration donnée du principe actif.

Pour fixer la ration journalière, nous avons essayé de limiter le risque de perte d'une partie du produit actif (celui qui possède le pouvoir antibactérien), par dissolution au moment de la distribution. Pour cela, la ration doit être instantanément consommée par les poissons. C'est pourquoi les alevins ont été maintenus à jeun pendant 2 jours avant le début de l'expérimentation et l'aliment contenant le médicament est distribué à des taux de rationnement plus faibles qu'à l'ordinaire (de l'ordre de 1% du poids de poisson) (Michel, 1986).

Dans tous les cas, les doses usuellement conseillées chez les homéothermes devraient s'appliquer au poisson. La voie orale est un contrôle plus fiable pour s'assurer des quantités administrées. Avec les substances très solubles dans l'eau, une partie du principe actif ou bien de l'huile essentielle est dispersée, donc perdue pour le traitement. De plus, le comportement souvent hiérarchique (la nage aléatoire) des poissons ne permet pas d'assurer que tous les animaux aient également accès à l'aliment thérapeutique. Pour compenser ces incertitudes, il

est d'usage de fixer la dose au double de celle employée chez les mammifères (Michel, 1986). Les alevins ont reçu les principes actifs à une dose maximale de 200 mg/kg de poids corporel.

Pendant les 6 jours, nous avons :

- Mesuré les paramètres physiques de l'eau (température, oxygène dissous, conductivité électrique),
- Suivi le comportement des alevins,
- Nettoyé quotidiennement les bacs et l'écloserie avant distribution des repas.

b.2. Suivi et observation de l'état sanitaire des alevins

Le suivi a débuté quatre heures après la distribution de la ration journalière. Il correspond à la durée nécessaire pour la digestion des repas chez la truite arc en ciel. En effet, l'excrétion des fèces chez la truite est un phénomène continu tout au long du nyctémère (jour & nuit : 24 heures), avec une augmentation sensible au cours de la nuit (Possempes, 1973). Par ailleurs, ces variations dans l'excrétion quantitative des fèces s'accompagnent aussi d'un changement dans leur composition (Furukawa, 1973 ; Possempes, 1973). De plus, la durée moyenne du transit chez la truite est de 20 à 40 h selon la température d'élevage (Possempes, 1973 ; Windel et al., 1976).

D'autres études menées sur le transit bactérien chez la truite arc-en-ciel élevée à une température de 13°C, ont mis en évidence un premier pic d'excrétion fécale de bactéries 4 à 6h après l'ingestion d'un repas contenant un marqueur bactérien et un deuxième pic, d'une concentration environ 100 fois plus importante dix heures après l'alimentation des poissons (Lésel et al., 1986, 1990).

2 Tests *in-vivo*

A la lumière des résultats trouvés, l'apport du carvacrol a un effet négatif sur le bien-être ainsi que sur la croissance des alevins quel que soit la dose (Tableau 24).

Cette importante déduction nous a permis d'orienter notre travail en utilisant le Thymol pour ce test thérapeutique. Le Thymol a montré un effet stimulateur de la croissance des alevins sans aucun effet sur la morphologie interne des alevins même à grande dose.

Le même protocole expérimental utilisé dans le test de toxicité a été exécuté avec quelques modifications. Ces dernières ont concerné la période du traitement, l'ajout d'un témoin positif avec l'antibiotique et l'élimination du carvacrol. Cette expérimentation a eu lieu au niveau de l'écloserie et des bacs d'alevinage de la station Ain Aghbal.

Traitement curatif

Le but est de tester l'effet anti-flavobactérique du Thymol *in-vivo*. Pour cela, 6 bacs de 124,5L de volume ont été préparés pour cette expérimentation. Chaque bac contient 2 clayettes avec 20 alevins d'un poids moyen de 0.72g et d'une taille moyenne égale à 3.8cm.

Deux répétitions ont été effectuées pour la dose thérapeutique (200mg/kg poids corporel) du principe actif.

Les 4 bacs restants sont utilisés comme suit : deux comme témoin positif dont les alevins reçoivent le traitement avec la même dose de l'antibiotique utilisée d'habitude en élevage à la station Ain Aghbal, et les deux autres bacs, sont des témoins négatifs (les alevins ne reçoivent que l'aliment seul).

Un tri des alevins malades (présentant un noircissement du dos) a eu lieu avant l'expérimentation. Le protocole d'anesthésie et de mesure du poids et de la taille des alevins de chaque clayette a été réalisé de la même façon que celui donné dans le test de toxicité.

Les alevins ont été maintenus également à jeun pendant 2 jours avant le commencement de l'expérimentation. L'aliment médicamenteux est toujours distribué à des taux plus faibles qu'à l'ordinaire pour éviter les pertes et s'assurer que tous les alevins ont consommé la totalité du médicament. Ces alevins ont reçu un repas chaque matin pendant 7 jours. Avant sa distribution, l'aliment est enrobé par la dose du principe actif.

Pendant les 7 jours, nous avons :

- Mesuré la température, l'oxygène dissous et la conductivité électrique
- Suivi le comportement des alevins.
- Nettoyé quotidiennement les bacs et l'écloserie avant distribution des repas.

Cette expérimentation a eu lieu au niveau de l'écloserie de la station Ain Aghbal, Azrou.

Traitement préventif

Le but de cette expérimentation est de mettre en place une stratégie de prévention contre l'attaque bactérienne du genre *Flavobacterium* au sein de la station en alevinage et cela à partir du premier repas après ouverture de la bouche des alevins. De ce fait, le tri a concerné cette fois des alevins après résorption des sacs vitellins, de taille moyenne égale à 1cm et 0.11g de poids moyen.

4 bacs de 124,5L de volume ont été utilisés. Chaque bac contient 2 clayettes avec 50 alevins chacune. Deux répétitions ont été effectuées pour deux doses (50- 100mg/kg poids corporel) du principe actif.

Les repas sont toujours distribués à des taux de rationnement plus faibles qu'à l'ordinaire. Ces alevins ont reçu dès leur premier repas une dose du traitement chaque matin pendant 7 jours.

Pendant les 7 jours, nous avons réalisé le même suivi que pour le traitement curatif.

Cette expérimentation a eu lieu au niveau de la station Ain Aghbal dans des bacs appelés bacs d'alevinage I (bacs contenant des alevins après résorption de la vésicule vitelline). Les effets de la température (Mughal et al., 1985) et de la photopériode (Nakanishi, 1986) sur la réponse du système immunitaire chez les poissons poikilothermes ont été également étudiés vue la différence des conditions d'élevage entre l'écloserie (local fermé dont la température est plus élevée et éclairé avec des lampes LED 24/24) et les bacs d'alevinage I (sous lumière naturelle et une variation nycthémerale de la température).

III. Résultats

1. Test de toxicité

Les résultats du test de toxicité sont présentés au niveau des tableaux 24 et 25.

Durant l'expérimentation avec le Carvacrol, nous n'avons observé aucune mortalité, mais des changements de comportement au niveau de la nage et de l'appétit. Ces comportements sont observés le 4^{ème} jour chez les alevins qui reçoivent les doses CD3 (Carvacrol dose 3) (150mg/Kg de poids corporel) et CD4 (200mg/Kg de poids corporel), et à partir du 5^{ème} jour chez tous les alevins y compris ceux qui ont reçu les doses CD1 (50mg/Kg de poids corporel) et CD2 (100mg/Kg de poids corporel).

Quant au Thymol, nous n'avons observé aucune mortalité ni changement au niveau du comportement des alevins même chez ceux qui reçoivent des doses élevées.

Après le 6^{ème} jour, nous avons arrêté l'apport des principes actifs, et nous avons réalisé à nouveau un échantillonnage afin de suivre les changements des paramètres zootechniques, et réaliser un diagnostic au niveau des organes internes des alevins.



Photo 2 : Prélèvements et conditions de manipulation des alevins.

Pour examiner l'aspect externe et la morphologie des organes internes, un diagnostic a été effectué sur des alevins (10 individus) par clayette (deux prélèvements par dose) prélevés de façon aléatoire (Tableau 26).

Pour les alevins du bac témoin négatif (aliment tout seul) dont le poids moyen des alevins est de 1,05g et leur taille moyenne est de 4.8cm, les examens externe et interne n'ont pas montré de signes d'anomalie.

Pour l'examen externe des alevins qui ont reçu le Carvacrol à des doses élevées CD4 a montré la présence de pus au niveau de l'orifice uro-génital. L'examen interne a montré que les alevins ayant reçu le Carvacrol à des doses plus ou moins élevées (à partir de la 2ème dose, CD2), présentent plusieurs anomalies : apparition de pus et hémorragie au niveau de la dernière partie de l'intestin, couleur pâle du foie et diminution de la taille de la rate. Egalement, les poids et les tailles moyens des alevins sont affectés et se révèlent tous au deçà des valeurs trouvées chez les alevins témoins.

La lecture du tableau 24 permet de déduire que l'apparition des anomalies respecte la relation dose-réponse du fait que l'intensité des anomalies devient sérieuse quand la concentration augmente.

Par contre, les alevins recevant le Thymol, aucun signe d'anomalie n'a été observé lors des examens interne et externe. Les tailles et poids moyens des alevins ayant subi des concentrations TD1 (Thymol dose 1) et TD2 dépassaient ceux du témoin (Tableau 25).

Les résultats de 14 jours d'observation clinique après administration des principes actifs pour rechercher d'éventuels signes cliniques de morbidité ou de mortalité et apprécier le poids corporel en plus de l'examen des organes internes après sacrifice des poissons, sont présentés dans le tableau 27.

4 jours après l'arrêt du test, nous avons enregistré l'apparition des mortalités au niveau des bacs des alevins soumis à des traitements à base de carvacrol dès la concentration 150 mg/kg de poids corporel.

Par contre, aucune mortalité n'est observée chez les alevins ayant subi les traitements à base de thymol.

Tableau 194 : Suivi du test de toxicité de Carvacrol.

	Doses	Comportement			Mortalité	Paramètres physico-chimiques de l'eau			
		Nage	Réponse aux risques	Appétit		O ₂ (mg/l)	T°C	pH	C.E (µS/cm)
Jour 1	Carvacrol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	8.67	8.7	7.2	659.3
	Carvacrol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Carvacrol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Carvacrol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 2	Carvacrol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	9.87	9.9	7.4	659.0
	Carvacrol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Carvacrol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Carvacrol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 3	Carvacrol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	9.58	10.9	6.8	659.2
	Carvacrol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Carvacrol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Carvacrol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 4	Carvacrol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	8.67	8.9	7.0	658.9
	Carvacrol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Carvacrol dose 3	Lente	Lente	Anormale	-				
	Carvacrol dose 4	Lente	Lente	Anormale	-				
Jour 5	Carvacrol dose 1	Lente	Lente	Anormale	-	9.33	10.4	7.2	659.1
	Carvacrol dose 2	Lente	Lente	Anormale	-				
	Carvacrol dose 3	Arrêt	Lente	Presque absente	-				
	Carvacrol dose 4	Arrêt	Lente	Presque absente	-				
Jour 6	Carvacrol dose 1	Lente	Lente	Anormale	-	9.52	9.7	7.1	659.3
	Carvacrol dose 2	Lente	Lente	Anormale	-				
	Carvacrol dose 3	Arrêt	Lente	Presque absente	-				
	Carvacrol dose 4	Arrêt	Lente	Presque absente	-				

Tableau 205 : Suivi du test de toxicité de Thymol.

	Doses	Comportement			Mortalité	Paramètres physico-chimiques de l'eau			
		Nage	Réponse aux risques	Appétit		O ₂ (mg/l)	T°C	pH	C.E (µS/cm)
Jour 1	Thymol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	8.67	8.7	7.2	659.3
	Thymol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 2	Thymol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	9.87	9.9	7.4	659.0
	Thymol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 3	Thymol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	9.58	10.9	6.8	659.2
	Thymol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 4	Thymol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	8.67	8.9	7.0	658.9
	Thymol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 5	Thymol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	9.33	10.4	7.2	659.1
	Thymol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 6	Thymol dose 1	Normale	Normale	Normale	-	9.52	9.7	7.1	659.3
	Thymol dose 2	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 3	Normale	Normale	Normale	-				
	Thymol dose 4	Normale	Normale	Normale	-				

- : absence de mortalité

Tableau 216 : Examen interne et externe des alevins après arrêt des apports de carvacrol et thymol.

		Témoin	Carvacrol dose 1	Carvacrol dose 2	Carvacrol dose 3	Carvacrol dose 4	Thymol dose 1	Thymol dose 2	Thymol dose 3	Thymol dose 4
Taille (cm)		4.8	4.3	4.2	4.1	4.2	4.85	4.85	4.75	4.6
Poids (g)		1.05	0.75	0.625	0.6	0.585	1.305	1.225	1.00	0.975
Examen externe	Nageoires	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Yeux	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Branchies	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Bouche	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Peau & écailles	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Orifice uro-génital	N	N	N	N	N	Présence de pus	N	N	N
Examen interne	Rate	N	N	N	Petite taille	Petite taille	N	N	N	N
	Intestins	N	N	Présence d'hémorragie	Présence d'hémorragie	Présence d'hémorragie	N	N	N	N
	Foie	N	N	Pâle	Pâle	Pâle	N	N	N	N
	Cœur	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Reins	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Estomac	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Aspect normale

Tableau 227 : Diagnostic 14 jours après arrêt du test de toxicité.

		Témoïn	Carvacrol dose 1	Carvacrol dose 2	Carvacrol dose 3	Carvacrol dose 4	Thymol dose 1	Thymol dose 2	Thymol dose 3	Thymol dose 4
Taille moyenne (cm)		6.45	5.00	4.97	5.01	4.93	6.81	6.81	6.7	6.56
Poids moyen (g)		3.02	2.53	2.4	2.375	2.3	3.38	3.3	3.00	3.1
Examen externe	Nageoires	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Yeux	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Branchies	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Bouche	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Peau & écailles	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Orifice uro- génital	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Examen interne	Rate	N	N	N	Petite taille	Petite taille	N	N	N	N
	Intestins	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Foie	N	N	Pâle	Pâle + grande	Pâle + grande	N	N	N	N
	Cœur	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Reins	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Estomac	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N : Aspect normale.

A la lumière du tableau 27, il ressort que les examens externe et interne n'ont présenté aucun signe d'anomalies pour :

- les alevins du bac témoin négatif (aliment seul), ayant un poids moyen de 3,02g et une taille moyenne de 6.45cm.
- les alevins recevant le Thymol avec des tailles et poids moyens dépassant ceux du témoin pour toutes les doses.

14 jours après l'arrêt de l'apport en carvacrol, l'examen externe des alevins n'a montré aucun signe d'anomalie alors que l'examen interne a montré qu'à partir de la 2ème dose, les alevins, présentent une couleur pâle du foie. Quant à ceux qui reçoivent des doses plus élevées, leur diagnostic révèle que le foie présente une grande taille et de couleur pâle et que la taille de la rate est plus petite que la normale. Egalement, les poids et les tailles moyens des alevins ont relativement régressé par rapport à ceux trouvés chez les alevins témoins.

2 Test *in-vivo*

Traitement curatif

Pendant la période d'administration du traitement, aucune mortalité n'est observée chez les alevins à qui nous avons administré les traitements à base de thymol et antibiotique.

Par contre, dès le 4^{ème} jour nous avons noté l'apparition des mortalités des alevins au niveau des bacs du témoin négatif (Tableau 28). Au niveau de ces bacs, le poids moyen des alevins est de 1,05g et leur taille moyenne est de 4.8 cm. L'examen externe a montré un noircissement du dos, alors que l'examen interne a révélé une couleur pâle et la présence des nodules au niveau du foie.

Quant aux alevins qui ont reçu un traitement à base d'antibiotique, nous avons remarqué une perte de poids et de taille par rapport à ceux du témoin négatif. Les examens interne et externe ont révélé, respectivement, une pâleur du foie et la disparition du noircissement du dos des alevins ce qui explique leur guérison bien que le foie n'a pas encore retrouvé son teint normal.

Tableau 28 : Résultats du test curatif à base de thymol.

	Doses	Comportement			Mortalité	Paramètres physico-chimiques de l'eau			
		Nage	Réponse aux risques	Appétit		O2 (mg/l)	T°C	pH	C.E (µS/cm)
Jour 1	Traitement	Normale	Normale	Normale	-	8.67	8.7	7.2	659.3
	Témoin +	Normale	Normale	Normale	-				
	Témoin -	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 2	Traitement	Normale	Normale	Normale	-	9.87	9.9	7.4	659.0
	Témoin +	Normale	Normale	Normale	-				
	Témoin -	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 3	Traitement	Normale	Normale	Normale	-	9.58	10.9	6.8	659.2
	Témoin +	Normale	Normale	Normale	-				
	Témoin -	Normale	Normale	Normale	-				
Jour 4	Traitement	Normale	Normale	Normale	-	8.67	8.9	7.0	658.9
	Témoin +	Normale	Normale	Normale	-				
	Témoin -	Lente	Normale	Normale	2				
Jour 5	Traitement	Normale	Normale	Normale	-	9.33	10.4	7.2	659.1
	Témoin +	Normale	Normale	Normale	-				
	Témoin -	Lente	Normale	Normale	1				
Jour 6	Traitement	Normale	Normale	Normale	-	9.52	9.7	7.1	659.3
	Témoin +	Normale	Normale	Normale	-				
	Témoin -	Lente	Normale	Normale	2				
Jour 7	Traitement	Normale	Normale	Normale	-	9.58	10.7	7.3	659.0
	Témoin +	Normale	Normale	Normale	-				
	Témoin -	Lente	Normale	Normale	3				

- : absence de mortalité

Pour les alevins recevant le Thymol, nous avons noté la disparition du noircissement du dos, signe de la guérison des alevins au bout du 5^{ème} jour malgré la pâleur du foie détectée lors de la dissection réalisée un jour après l'arrêt du traitement (8^{ème} jour). Les alevins prélevés au hasard une semaine après l'arrêt du traitement (14^{ème} jour) n'ont montré aucun signe d'anomalie avec un foie à teint normal.

Il est important de souligner que le traitement avec du Thymol est non seulement curatif mais il est également bénéfique à la croissance des alevins. En effet, nous avons observé des tailles et poids moyens dépassant ceux du témoin négatif (tableau ci-dessous).

Tableau 29 : Résultats des examens interne et externe après le test curatif

		Témoin -	Témoin + ATB	Traitement
Taille moyenne (cm)		4.8	4.3	4.67
Poids moyen (g)		1.05	0.85	0.99
Examen externe	Nageoires	N	N	N
	Yeux	N	N	N
	Branchies	N	N	N
	Bouche	N	N	N
	Peau & écailles	Noircissement	N	N
	Orifice	N	N	N
Examen interne	Rate	N	N	N
	Intestin	N	N	N
	Foi	pâle (avec nodules)	pâle	pâle
	Cœur	N	N	N
	Rein	N	N	N
	Estomac	N	N	N

N : Aspect normale.

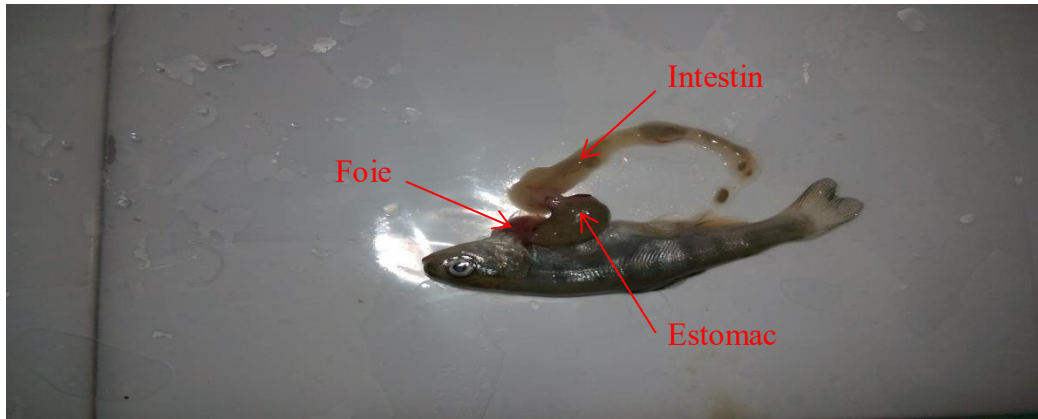


Photo 3: Dissection d'un alevin sujet de traitement à base de thymol.

Traitement préventif

Le poids moyen des alevins témoin négatif (aliment seul) est de 0.36g et leur taille moyenne est de 1.2 cm. Leurs examens externe et interne ont montré respectivement le noircissement du dos et des signes d'anomalie au niveau du foie avec la présence des nodules et une couleur pâle.

Les alevins ayant subi un traitement avec le Thymol ne montrent pas de signes d'anomalie et présentent une légère augmentation de la masse corporelle et de la taille quelle que soit la dose préventive administrée. En effet, le poids moyen est de 0.38g et 0.41g pour les doses 50mg/kg et 100mg/kg de poids corporel respectivement. La taille moyenne est de 1.3cm et 1.5cm respectivement.

À l'issue de cette expérimentation, ce traitement a été appliqué sur un lot entier d'alevins. Pendant 8 mois, et en comparaison avec d'autres lots non traités, le nombre de mortalité ne dépasse pas les normes avec une perte d'un poisson à trois par mois et l'absence de la maladie due au *Flavobacterium spp.*

Nous n'avons remarqué aucun effet de la température ou de la photopériode sur la réponse du système immunitaire chez nos alevins, les deux lots, ceux en éclosion ou ceux en alevinage I répondent de la même manière aux traitements.

IV. Discussion

Plusieurs études antérieures ont été consacrées à l'utilisation potentielle des huiles essentielles comme agent de conservation mais aucune étude n'a évalué l'effet antibactérien des principes actifs carvacrol et thymol sur les poissons. Toutefois, quelques études ont déterminé l'effet combiné de ces deux principes actifs sur les performances de croissance (Ahmadifar et al.,

2011), et d'autres sur l'effet des huiles essentielles entières sur les animaux tels que les volailles (Gabriel et al., 2013).

Nos résultats montrent des effets extrêmement variables du thymol et du carvacrol, tant par leur nature que par leur gravité. Pareillement, Alleman et al. (2013) ont rapporté que les différents effets toxiques observés peuvent aller d'une «simple perte de poids ou d'appétit» à la «mort de l'individu». Ceci justifie la diminution de la taille et la perte de la masse corporelle observées chez nos alevins sous traitement par thymol et carvacrol. Même si l'effet du thymol n'a eu lieu qu'à fortes doses. D'ailleurs, après une période de quatre jours, nous avons assisté à l'apparition des hémorragies en réponse à une toxicité chronique.

L'administration du thymol à faible et moyenne doses a un effet positif sur la masse corporelle, la taille et le bien-être général des alevins. Ces effets peuvent être dus à l'action stimulatrice de ce principe actif sur le tube digestif et sa flore (Alleman et al., 2013). Cependant, Ouwehand et al. (2010) rapportent que le thymol peut aussi exercer un effet stimulateur de la croissance de certaines bactéries comme des bifidobactéries et des lactobacilles. De plus, au niveau de l'épithélium digestif, principalement au niveau de l'intestin grêle, les cellules entérochromaffines possèdent des récepteurs olfactifs dont la stimulation par des molécules odorantes comme le thymol, entraînent la libération de sérotonine, qui exerce différentes actions sur le tractus digestif (Kidd et al., 2008). Zheng et al. (2009) rapportent que la combinaison de thymol et de carvacrol a un effet positif sur la croissance du poisson chat (*Ictalurus punctatus*). Ce composé a augmenté aussi la résistance des poissons exposés à l'infection due à *Aeromonas hydrophila*.

Il existe peu d'études concernant les effets d'antioxydants systémiques des produits d'origine végétale comme les HE chez les poissons, l'essentiel des études de ces effets porte sur la qualité de la viande et la conservation des aliments. Chez le rat, l'utilisation d'HE de thym ou de thymol peut entraîner un enrichissement en acides gras polyinsaturés des phospholipides de différents organes (foie, cerveau, rein et cœur) (Lee et al., 2003).

Nos résultats concernant la stimulation de la croissance et l'augmentation des paramètres zootechniques par le thymol à faibles doses, signifient l'occurrence d'un effet antioxydant. D'ailleurs, un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur élimination par les systèmes antioxydants peut avoir lieu et conduire à ce stress. Ces résultats sont en accord avec les constatations de Gabriel et al., (2013) indiquant que ce stress a des conséquences néfastes sur la physiologie de l'animal, avec notamment des effets sur sa croissance, ainsi que sur son immunité. Le thymol, avec un plus grand encombrement stérique du groupe phénol par

rapport au carvacrol, possède une plus grande activité antioxydante. Il agirait comme un éboueur de radicaux libres et influencerait les systèmes de défense *in vivo* (Knas-müller et al., 2008). Ceci explique la bonne santé et l'appétit normal de nos alevins.

L'inflammation est un processus hautement complexe. Il s'accompagne, entre autre, d'une augmentation du stress oxydatif (John et al., 2011) qui est une des cibles des HE comme indiqué précédemment, d'où leur effet antioxydant. Aussi, les HE peuvent exercer des effets anti-inflammatoires et stimuler l'immunité spécifique. Leur action anti-inflammatoire peut s'avérer particulièrement intéressante chez les poissons d'élevage du fait de l'état d'inflammation perpétuelle de l'intestin suite à la présence du micro-biote digestif qui stimule l'immunité (Gabriel et al., 2013). Chez le poulet de chair recevant des rations enrichies en HE de thym, Najafi et Torki (2010) ont observé une baisse du nombre des hétérophiles et une augmentation de celui des lymphocytes sanguins.

Le carvacrol et le thymol ont une activité inhibitrice de la cyclo-oxygénase, inhibant ainsi la production de prostaglandine E2 responsable de la réaction inflammatoire (Marsik et al., 2005, Landa et al., 2009). Chez le porc, Michiels et al. (2010b) ont observé, avec du thymol, une baisse du nombre de lymphocytes intra-épithéliaux de la muqueuse de l'intestin grêle. En effet, le devenir de ces molécules chez l'animal lors de leur consommation peut être très variable selon la composition de l'aliment, leur mode de présentation (sous forme libre ou protégée) et la dose utilisée. Elles peuvent ainsi être présentes au niveau de la sphère olfactive, de la sphère digestive ou dans la circulation sanguine après leur absorption dans l'appareil digestif. Ces molécules ont donc de nombreuses cibles potentielles d'action au niveau de l'animal, tant au niveau digestif que systémique. Ainsi, elles peuvent exercer diverses actions, tant sur le microbiote digestif, que sur l'animal lui-même à différents niveaux (état d'oxydation des différents tissus, immunité et en particulier l'inflammation, fonctionnement digestif, métabolisme global, système nerveux, comportement). Ces molécules représentent donc un grand potentiel pour leur utilisation chez l'animal d'élevage (Gabriel et al., 2013 ; Alleman et al., 2013).

V. Conclusion

Le manque de données sur les effets de l'administration de thymol et du carvacrol sur le comportement et la croissance des poissons d'eau froide en élevage, n'a pas permis de détailler davantage cet aspect. Cependant, des connaissances solides existent pour les animaux

à sang chaud ainsi que pour certains poissons d'eau chaude, tels que la carpe commune, le tilapia et le poisson-chat.

Les composants des HE présentent plusieurs types d'activités biologiques, anti-microbiennes, anti-oxydantes et anti-inflammatoires. L'action de ces molécules chez l'animal dépend à la fois de leur métabolisme et des conditions rencontrées *in vivo*.

Pour le test de toxicité, nous avons trouvé que le carvacrol présente une forte toxicité même à petites doses vis-à-vis des alevins de truites arc-en-ciel à 0.72g de poids moyen, cette toxicité s'est traduite par une perte de poids corporel, une anomalie du comportement et une perte d'appétit. En revanche, le test de toxicité révèle que le thymol ne présente pas d'effet toxique sur les alevins. Pour cela, nous avons réalisé les tests thérapeutiques seulement par le thymol.

Les tests thérapeutiques ont été divisé en deux sous-tests, curatif qui a concerné les alevins malades présentant les symptômes cliniques de la maladie due aux Flavobactériens et préventif pour les alevins en période de sevrage après résorption de la vésicule vitelline (avant l'administration de leur premier repas).

Les résultats du test curatif ont montré que le thymol est doué d'une activité antibactérienne importante presque similaire de celle observée chez les sujets traités par les antibiotiques conventionnels et présente un pouvoir guérison durable.

Le test préventif a permis de confirmer l'effet stimulateur du système immunitaire des alevins, qui est traduit par l'absence totale de la maladie et de ses symptômes chez les alevins du cheptel traité. En plus les alevins traités ont pris du poids et leurs tailles sont plus grandes par rapport aux alevins des témoins traités par l'antibiotique.

De tout ce qui a précédé, on peut déduire que le thymol pourra présenter une alternative Bio chez les alevins de la truite arc en ciel. Il présente un grand potentiel antibactérien sans risque de toxicité ou d'effets secondaires néfastes sur le bon fonctionnement des organes internes. Sans négliger ses effets positifs sur les paramètres zootechniques (taille et poids).

Nos résultats sur terrain nous ont permis de considérer l'utilisation des principes actifs des huiles essentielles comme pratique thérapeutique avec des rendements satisfaisants.

L'aquaculteur doit recourir à ces pratiques préventives pour maintenir de bonnes conditions d'élevage et d'hygiène dans l'objectif de réduire le plus possible la contamination des élevages d'une part, et de garantir la sécurité sanitaire et la qualité des produits aquacoles d'autre part.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail, il est important de faire le point sur les résultats obtenus de l'étude réalisée à la station piscicole Ain Aghbal à Azrou sur l'*Utilisation des huiles essentielles pour la lutte contre les infections bactériennes dues au genre Flavobacterium chez les alevins de la truite arc-en-ciel dans le domaine Ain Aghbal.*

Les bactéries appartenant à ce genre font partie des principaux pathogènes répertoriés responsables des cas déclarés de pertes dans les élevages de salmonidés. L'espèce hôte choisie dans notre étude est la truite arc-en-ciel, en tant que principale production piscicole dans les eaux douces au Maroc et espèce particulièrement sensible à la flavobactériose des eaux froides.

Jusqu'à aujourd'hui, les moyens de lutte disponibles contre ces infections bactériennes sont limités à l'utilisation des antibiotiques. Mais ces progrès sont sérieusement remis en question par l'apparition et la propagation de germes résistants à ces médicaments. Donc la problématique d'inefficacité devient de plus en plus inquiétante.

L'étape primordiale était de confirmer la présence des bactéries pathogènes de poissons du genre *Flavobacterium* au niveau de la station Ain Aghbal et en fournir des connaissances scientifiques. La confirmation de cette présence ainsi qu'un diagnostic approfondi sur un hôte donné manquait donc, a fortiori à une échelle géographique réduite.

Ces considérations nous ont incités et conduits à élaborer un programme d'analyses de manière saisonnière. De ce fait, nos recherches se sont orientées dans un premier temps sur l'inspection de la présence des bactéries du genre *Flavobacterium* à l'échelle des œufs fécondés importées de la France, surtout que la salmoniculture française est touchée par ces pathogènes. Après des prélèvements et analyses ont concernés des poissons de différentes tranches d'âge et état de santé (sains ou en phase clinique), en plus de l'eau des bassins d'élevage et les biofilms formés. Par la suite, nous nous sommes intéressés à identifier nos isolats et à les comparer avec des souches de référence de *Flavobacterium psychrophilum* importées selon les critères générales de la caractérisation microbiologique classique.

Pour cela, en plus de la caractérisation phénotypique, biochimique et enzymatique de l'agent agresseur des alevins de la truite arc en ciel, nous nous sommes intéressés à la recherche d'alternatives biologiques curatives et préventives pour maintenir les bonnes conditions d'élevage et d'hygiène, réduire la contamination bactérienne et garantir la sécurité sanitaire et la qualité des produits aquacoles.

L'isolement et l'identification des isolats provenant des œufs, de poissons sains ou en phase clinique de la maladie, de l'eau et du biofilm ont été réalisés de façon saisonnière au niveau de la station Ain Aghbal. Les résultats ont été comparés aux caractéristiques des souches de référence de *Flavobacterium psychrophilum* importées de la France et de la Suisse.

Ces résultats ont montré que *Flavobacterium* est bien le genre bactérien dominant présent dans les différents échantillons prélevés et analysés tout au long de l'année.

L'analyse du profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques de familles différentes a montré que la majorité des souches sont multi-résistantes, ce qui indique qu'elles sont des souches non-sauvages, donc la possibilité qu'elles soient importées dans les œufs et fortement adopté.

Dans le but de surmonter la résistance des bactéries aux antibiotiques en limitant leur utilisation et éviter leurs effets secondaires, le pouvoir antibactérien des actinobactéries productrices des substances actives contre les souches de *Flavobacterium psychrophilum* a été évalué. Les interactions entre les actinomycètes actives et le pathogène en question ont été bien démontré avec un fort pouvoir inhibiteur sur les souches testées. Toutefois, proposer les actinomycètes comme traitement thérapeutique dans notre cas est pratiquement impossible du fait du grand risque que peut présenter le traitement à base des microorganismes vivants dans une ferme piscicole avec les problèmes de changement du matériel génétique entre bactéries via les biofilms. Pour ces raisons techniques, nous n'avons pas présenté les résultats des actinobactéries dans ce rapport et nous avons orienté notre recherche vers l'application de molécules biologiques d'origine naturelle douées du pouvoir antibactérien fort : les huiles essentielles et leurs groupements majoritaires.

Notre démarche a débuté par une étude des plantes aromatiques et médicinales marocaine. Dans le but de proposer des alternatives naturelles efficaces, sans risque de développement de résistances et sans effets secondaires.

Le criblage a porté sur des plantes médicinales dont certaines sont endémiques au Maroc. Les huiles essentielles ont fait l'objet d'une étude détaillée de leurs compositions chimiques par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectroscopie de masse (SM).

Les résultats ont montré des différences significatives qualitatives et quantitatives dans la composition chimique des huiles essentielles des différentes espèces végétales étudiées. Cette composition semble varier au sein de la même espèce en fonction de la localisation géographique, des conditions édaphiques et climatiques ainsi que de la période de récolte.

Pourtant, ces facteurs de variabilité influencent la composition chimique de l'huile essentielle et déterminent donc son chémotype, et par la suite sa spécificité et ses propriétés thérapeutiques.

L'ensemble des résultats de cette étude chimique nous a mené à supposer que les espèces choisies pourraient présenter un caractère préventif et curatif intéressant du fait de leur composition chimique aussi variée et diversifiée. Nos résultats ouvrent aussi, la voie vers un nombre de questions relatives à l'activité antibactérienne des huiles essentielles de ces espèces. Ceci requiert, alors, plus de confirmations et d'approfondissements.

L'efficacité antimicrobienne effective des huiles essentielles étudiées a été détaillée. En effet, les HE de *Thymus maroccanus*, et de trois échantillons d'*Origanum compactum* ont été très actives sur les souches de bactéries testées. L'HE de *Thymus broussonetii* avait une activité forte mais moins importante que celle de *Thymus maroccanus*. Les HE de *P. graveolens*, *L. officinalis*, *E. globulus* et *S. aromaticum* présentent une activité antibactérienne variant entre forte et moyenne. Celles de *C. atlantica*, *C. mixtus* et *S. officinali* ont une activité antibactérienne faible alors que celle de *R. officinalis*, elle semble être inefficace sur *Flavobacterium spp.*

Les HE de *T. maroccanus* et *O. compactum* ont montré une activité antibactérienne bactéricide contre toutes les bactéries testées. Cette activité est attribuée à la présence de forte concentration en fraction phénolique, qui est généralement responsable des propriétés antimicrobiennes de l'HE, notamment le thymol et le carvacrol.

Ainsi, il s'est avéré pertinent de choisir les composés majoritaires de ces deux huiles essentielles, le carvacrol et le thymol, pour déterminer leur capacité à inhiber les bactéries du genre *Flavobacterium in-vivo*, et leur pouvoir guérison vis-à-vis des alevins de la truite arc-en-ciel.

La toxicité des composés majoritaires sur les alevins a été étudiée pour caractériser de façon complète et profonde le potentiel de ces composés et déterminer les doses thérapeutiques à administrer en fonction des poids corporel des alevins.

Nous avons pu démontrer que le carvacrol peut être toxique à petite dose, et le thymol devient toxique à grandes doses. Cette toxicité se traduit chez les alevins par la diminution de la taille et la perte de la masse corporelle. Cependant, l'administration du thymol à faible et moyenne doses a permis d'améliorer la masse corporelle des alevins, leurs tailles ainsi que leur bien-

être général. Ces effets peuvent être dus à l'action de ce principe actif sur les composantes du tube digestif et sa flore banale.

Parallèlement, l'étude du pouvoir guérison du thymol *in-vivo* contre les flavobactériens chez les alevins de la truite dans les bacs d'alevinage a révélé un pouvoir similaire à celui observé lors de l'utilisation d'antibiotiques conventionnels en élevage avec une amélioration des performances zootechniques (gains de poids et de la taille et amélioration du bien-être de l'animal). Ceci est probablement dû à la richesse du thymol en encombrements stériques du groupe phénol par rapport au carvacrol. En effet, le thymol agirait comme un éboueur de radicaux libres et influencerait les systèmes de défense *in vivo*.

Il convient alors de dire que le thymol constitue un traitement à grand potentiel de guérison sans effets secondaire. Ce composé à connotation «naturelle» agit comme stimulateur du système immunitaire et de la croissance en élevage.

En définitive, ce travail nous a permis de démontrer les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et de leurs principes actifs à l'égard de bactéries pathogènes du genre *Flavobacterium*. Ceci témoigne du potentiel que présentent ces huiles essentielles pour la recherche de molécules antibactériennes innovantes.

Les résultats sur terrain permettent de considérer l'utilisation des principes actifs des huiles essentielles étudiées comme pratique thérapeutique contre cet agent agresseur de la truite arc en ciel avec des rendements satisfaisants.

Perspectives

En termes de perspectives, nous envisageons de continuer la recherche sur certains axes de recherche pertinents qui méritent d'être étudiés davantage à savoir :

- Faire le séquençage partiel du gène de l'ARN 16S des isolats pour identifier les espèces du genre *Flavobacterium* impliquées aux infections mortelles au niveau de la station.
- Caractériser les gènes impliqués dans la virulence et la pathogénicité des *Flavobacterium spp.* en relation avec leur pouvoir adhésif.
- Faire une étude approfondie sur les effets des molécules naturelles sur le tractus digestif, le système immunitaire et la physiologie des poikilothermes.
- Etudier le (s) mode (s) d'action des huiles essentielles ainsi que de leurs composés majoritaires utilisés lors de ce modeste travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.

- Aafi A., Achhal A.K., Benabid A., Rouchdi M., 2005. Richesse et diversité floristique de l'écosystème de chêne-liège de la forêt de la Mamora. *Acta Bot. Malacitana*, 30, 127-138.
- Aafi A., Ghanmi M., Satrani B., Aberchane M., Ismaili My.R., EL Abid A., 2011. Diversité et valorisation des principales plantes aromatiques et médicinales (PAM) de l'écosystème cédraie au Maroc. Centre de Recherche Forestière, 16 p.
- Aakra Å., Vebø H., Indahl U., Snipen L., Gjerstad Ø., Lunde M., Nes I.F., 2010. *The Response of Enterococcus faecalis V583 to Chloramphenicol Treatment. International Journal of Microbiology*, 2010, 1–7. doi:10.1155/2010/483048
- Adebussyi A., Foght J., 2013. Physico-chemical factors affect chloramphenicol efflux and EmhABC efflux pump expression in *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *Research in Microbiology* 164: 172-180.
- Ahmad I., Aqil F., 2007. *In vitro* efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESβL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiological Research* 162: 264-275.
- Ahmadifar E., Falahatkar B., Akrami R., 2011. Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(4), 1057–1060. doi:10.1111/j.1439-0426.2011.01763.x
- Alanis A.J., 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of medical research* 36: 697-705.
- Alleman F., Gabriel I., Dufourcq V., Perrin F., Gabarrou J.-F., 2013. Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 1. Performances de croissance et règlementation. *INRA Prod. Anim.*, 26, 1, 3-12.
- Alviano D.S., Alviano C.S., 2009. Plant extracts: search for alternatives to treat microbial diseases. *Curr Pharm Biotech.* 10: 106-21.
- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouch A., 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14(1), 141-148.
- Amend D.F., 1983. Columnaris (*Flexibacter columnaris*) disease of freshwater fishes and a brief review of other flexibacterial disease of fish. In Anderson, D. P., Dorson, M. M. and Dubourget, P. editors. *Antigens of fish pathogens*. Lyon, France: Collection Foundation Marcel Merieux.
- Anacker R.L., Ordal E.J., 1955. Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. *Journal of Bacteriology*: 70, 738–741
- Anderson R.L., Ordal E.J., 1961. *Cytophaga succinicans* sp.n., a facultatively anaerobic, aquatic myxobacterium. *Journal of Bacteriology* : 81, 130–138.
- Andrews J. M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 48 (suppl 1): 5-16.
- Apablaza P., Brevik O.J., Mjos S., Valbenito S., Ilardi P., Battaglia J., Dalsgaard I., Nylund A., 2015. Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) analysis of

Flavobacterium psychrophilum from salmonids in Chile and Norway. *BMC Veterinary Research* 11: 150 DOI 10.1186/s12917-015-0469-7.

- Arnold T.M., Forrest G.N., Messmer K.J., 2007. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections. *American Journal of Health-System Pharmacy* 64: 819-826.
- Austin B., Austin D.A., 2007. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish 4th edition. Springer-Praxis Publishing Ltd United Kingdom.
- Avendano-Herrera R., Magarinos B., Irgang R., Toranzo A.E., 2006. Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum Maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus Maximus*). *Aquaculture* 257, 104-110.

B.

- Bader J.A., Shotts E.B.Jr., 1998. Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of Aquatic Animal Health*: 10, 311–319.
- Bader J.A., Shoemaker C.A., Klesius P.H., 2003. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. *Journal of Microbiological Methods*: 52, 209–220.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food Chem Toxicol.* 46: 446-475.
- Barbeyron T., L'Haridon S., Corre E., Kloareg B., Potin P., 2001. *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of Flavobacteriaceae isolated from a red alga, and reclassification of [Cytophaga] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* : 51, 985-997.
- Barnes M.E., Brown M.L., 2011. A review of *Flavobacterium psychrophilum* biology, clinical signs, and bacterial cold water disease prevention and treatment. *Open Fish Science J* 4, 40-48.
- Barony G., Tavares G., Assis G., Luz R., Figueiredo H., Leal C., 2015. New hosts and genetic diversity of *Flavobacterium columnare* isolated from Brazilian native species and Nile tilapia. *Dis Aquat Org.* 117(1):1–11. <https://doi.org/10.3354/dao02931>.
- Bartelme R.P., Newton R.J., Zhu Y., Li N., LaFrentz B.R., McBride M.J., Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* strain C# 2. *Genome Announc.* 2016;4(3):e00624–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00624-16>.
- Bartlett J.G., Tally F.P., 1980. Chloramphenicol. Kajan, B. M., cd.: Antimicrobial Therapy. Philadelphia, W.B. Saunders Co., pp. 127-13.
- Beck B., Li C., Farmer B., Barnett L., Lange M., Peatman E., 2016. A comparison of high- and low-virulence *Flavobacterium columnare* strains reveals differences in iron acquisition components and responses to iron restriction. *J Fish Dis*;39(3):259– 268. <https://doi.org/10.1111/jfd.12343>.
- Bego G.V., 2003. Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. *Ed. MDB*.
- Belaqqiz R., Harrak R., Romane A., Oufdou K., El Alaoui ElFels M., 2010. Antimicrobial and Insecticidal Activities of the Endemic *Thymus broussonetti* Boiss. and *Thymus maroccanus*

- Beck B., Barnett L., Farmer B., Peatman E., Carter D., 2015. Kaolinitic clay protects against *Flavobacterium columnare* infection in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J Fish Dis.* 38(3): 241–8. <https://doi.org/10.1111/jfd.12229>.
- Belletti N., Lanciotti R., Patrignani F., Gardini F., 2008. Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. *J Food Sci* 73: 331-8.
- Benabid A., 2000. *Flore et écosystèmes du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité*. Paris.
- Benedetti P., Rassa M., Pavan G., Sefton A., Pellizzer G., 2011. Septic shock, pneumonia, and soft tissue infection due to *Myroides odoratimimus*: report of a case and review of *Myroides* infections. *Infection*: 39, 161-165.
- Benjlali B., 2004. Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- Bergey D.H., Harrison F.C., Breed R.S., Hammer B.W., Huntoon F.M., 1923. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 1st edition*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.
- Bernardet J.F., Grimont P.A.D., 1989. Deoxyribonucleic Acid Relatedness and Phenotypic Characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., norn. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International journal of systematic bacteriology*, July 1989, p. 346-354 0020-7713/89/030346-09\$02.00/0
- Bernardet J.F., Segers P., Kersters K., Holmes B., 1996. In W. Whitman editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Volume 4*. Baltimore, MD: The Williams and Wilkins Co.
- Bernardet J.-F., Nakagawa Y., Holmes B., 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 1049–1070
- Bernardet J.F., Vancanneyt M., Matte-Tailliez O., Grisez L., Tailliez P., Bizet C., Nowakowski M., Kerouault B., Swings J., 2005. Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Systematic and Applied Microbiology*: 28, 640– 660.
- Bernardet J.-F., Nakagawa Y., 2006. An Introduction to the Family Flavobacteriaceae. Springer, New York.
- Bernardet J.F., Bowman J. P., 2006. The genus *Flavobacterium*. In Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. editors. *The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria Volume 7*. New York: Springer-Verlag.
- Bernardet J.F., Hugo C., Bruun B., 2006. The Genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. In The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria 3rd edition Volume 7. Dworkin, M, Falkow, S, Rosenberg, E, Schleifer, K. H. and Stackebrandt E. editors. New York: Springer.

- Bernardet J.F., 2011. Family I. Flavobacteriaceae Reichenbach 1992. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, 2nd edn (Whitman W, Ed), pp. 106–111, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Bernardet J.F., Bowman J.P., 2011. Genus I. *Flavobacterium*. Bergey et al. 1923, *emend.*
- Bernardet J.F., Hugo C., Bruun B., 2011. *Genus VII. Chryseobacterium*.
- Bisognano C., 2001. Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones sur l'adhérence à la fibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. Thesis, Université de Genève, Genève.
- Bowman J.P., McCammon S.A., Brown J.L., Nichols P.D., McMeekin T.A., 1997. *Psychroserpens burtonensis* gen. nov., sp. nov., and *Gelidibacter algens* gen. nov., sp. nov., psychrophilic bacteria isolated from Antarctic lacustrine and sea ice habitats. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 47, 670-677.
- Bowman J.P., McCammon S.A., Lewis T., Skerratt J.H., Brown J.L., Nichols D.S., McMeekin T.A., 1998. *Psychroflexus torquis* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson et al. 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. nov. *Microbiology*: 144, 1601-1609.
- Bowman J.P., Nowak B., 2004. Salmonid gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease. *Journal of Fish Disease*: 27, 483–492.
- Borg A.F., 1948. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. Ph.D.Thesis. *University of Washington. Seattle*.
- Borg A.F., 1960. Studies on Myxobacteria Associated with Diseases in Salmonid Fishes. *American Association for the Advancement of Science. Washington, DC. Wildlife Disease Series, No. 8*.
- Bouchikhi T., 1994. Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles. Thèse. *Doct. Universit. Balaise Pascal. Clermont-Ferrand*.
- Boutin S., Audet C., Derome N., 2013. Probiotic treatment by indigenous bacteria decreases mortality without disturbing the natural microbiota of *Salvelinus fontinalis*. *Can J Microbiol.* 59(10):662– 70. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0443>.
- Bowker J.D., Carty D., Trushenski J.T., Bowman M.P., Wandelaar N., Matthews M., 2013. Controlling mortality caused by external columnaris in largemouth bass and bluegill with chloramine-T or hydrogen peroxide. *N Am J Aquac.* 75(3):342–51. <https://doi.org/10.1080/15222055.2013.783521>.
- Bozin B., Mimica-Dukic N., Simin N., Anackov G., 2006. Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1822-1828.
- Brown R.P., Aplin R.T., Schofield C.J., 1996. Inhibition of TEM-2 beta-lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid: observation of intermediates by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochemistry* 35: 12421-12432.
- Boyacioğlu M., Kum C., Kirkan Ş., Sekkin S., Parin U., Karademir Ü., 2015. Comparison of in vitro and in vivo antibacterial efficacy for the control of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry: the first

genotypical evidence in West Aegean region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci.* 39(3):314–21. <https://doi.org/10.3906/vet-1502-36>. The paper demonstrates the difference between *in vitro* and *in vivo* results of testing the effectiveness of antimicrobial substances used to treat fish suffering from RTFS.

- Bullard S., Mohammed H., Arias C., 2013. First record of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* genomovar II from bluegill, *Lepomis macrochirus* (Rafinesque), with observations on associated lesions. *J Fish Dis.* 36(4):447–51. <https://doi.org/10.1111/jfd.12005>.

- Bullock G.L., McLaughlin J.J.A., 1970. Advances in knowledge concerning bacteria pathogenic to fishes (1954-1968). In Snieszko, S.F. editor. *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes. Washington, D.C., American Fisheries Society, Special Publication No. 5: 231-242.*

- Bullock G.L., 1972. Studies on selected myxobacteria pathogenic for fishes and on bacterial gill disease in hatchery-reared salmonids. *U.S. Fish Wildl. Serv., Tech. Pap.* 60. 30 pp

- Bullock G.L., Snieszko S.F. , 1981. Fin Rot, Coldwater Disease, and Peduncle Disease of Salmonid Fishes. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service. *Fish Disease Leaflet 66, 28 pages.*

- Bullock G.L., Hsu T.C., Shotts E.B., 1986. Columnaris diseases of fish. Fish Disease Leaflet No. 47. U.S. Department of the Interior. Fish and Wildlife Division of Fisheries and Wetland Research. Washington, DC. *Government Printing Office.*

- Bullock G.L., 1990. Bacterial gill disease of freshwater fishes. *U.S. Fish and Wildlife Service Fish Disease Leaflet 19.* Washington, DC.

- Burt S.A., Reinders R.D., 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157:H5. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 162-167.

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

C.

- Cabral J.P.S., 2010. “Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7.10: 3657–3703. PMC. Web. 22 Jan. 2018

- Campbell L.L., Williams O.B., 1951. A study of chitin-decomposing microorganisms of marine origin. *Journal of General Microbiology:* 5, 894-905.

- Cannon J.B., Cantrell C.L., Astatkie T., Zheljzkov V.D., 2013. Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. *Industrial Crops and Products* 41: 214-220.

- Carlet J., Collignon P., Goldmann D., 2011. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *The Lancet* 378: 369-371.

- Cars O., Hedin A., Heddini A., 2011. The global need for effective antibiotics – Moving towards concerted action. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 14: 68-69.

- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V., 1995. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*. 82 (332):181-5.
- Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1914-1920.
- Castillo D., Higuera G., Villa M., Middelboe M., Dalsgaard I., Madsen L., Espejo R.T., 2012. Diversity of *Flavobacterium psychrophilum* and the potential use of its phages for protection against bacterial cold water disease in salmonids. *Journal of Fish Disease*: 35, 193-201.
- Castillo D., Christiansen R.H., Espejo R., 2014. Diversity and geographical distribution of *Flavobacterium psychrophilum* isolates and their phages: patterns of susceptibility to phage infection and phage host range. *Microb Ecol*;67:748–57
- Castillo D., Christiansen R.H., Dalsgaard I., 2015. Bacteriophage resistance mechanisms in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*: linking genomic mutations to changes in bacterial virulence factors. *Appl Environ Microb*;81:1157–67
- Castillo D., Christiansen R.H., Dalsgaard I., 2016. Comparative genome analysis provides insights into the pathogenicity of *Flavobacterium psychrophilum*. *PLoS One*;11:e0152515
- Cattoir V., 2012. Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. *Revue Francophone des Laboratoires* 2012: 79-87.
- Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A., Remmal A., 2005. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol. Immun.* 20, 106-111.
- Chebli B., Achouri M., Idrissi Hassani L.M., Hmamouchi M., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers : Fr. *J. Ethnopharmacol.* 89, 165-169.
- Chopra I., Roberts M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 232-260.
- Christensen P.J., 1977. The history, biology and taxonomy of the Cytophaga group. *Canadian Journal of Microbiology*: 23, 1599-1653.
- Cipriano R.C., Teska J.D., 1994. Effects of medium composition on the growth of two fish pathogens, *Cytophaga columnaris* and *Cytophaga psychrophila*. *Biomedical Letters*: 49, 7-12.
- Cipriano R.C., Holt R.A., 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. *Fish Disease Leaflet* No. 86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV.
- Cipriano R.C., 2015. Bacterial analysis of fertilized eggs of Atlantic salmon from the Penobscot, Naraguagus, and Machias Rivers, Maine. *J Aquat Anim Health.* 27(3):172–7. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1050127>.

- Clausell A., Garcia-Subirats M., Pujol M., Busquets M.A., Rabanal F., Cajal Y., 2006. Gram-Negative Outer and Inner Membrane Models: Insertion of Cyclic Cationic Lipopeptides. *The Journal of Physical Chemistry B* **111**: 551-563.
- Coiffier G., Albert J.D., 2012. Les aminosides ont-ils encore leur place dans le traitement des infections ostéoarticulaires aiguës de l'adulte en 2012 ? *Revue du Rhumatisme* **79**: 104-107.
- Combe J., Simonnet F., Simonnet G., 1988. Action du xibornol sur la division cellulaire et les synthèses macromoléculaires des bactéries à gram positif. *Ann pharm fr.* 46(1): 19-26.
- Conrad R.A., 2013. Determination of *Flavobacterium columnare* virulence factors in zebra fish. *NCUR* 2013.
- Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol.* 29(2):130-5.
- Couic-Marinier F., Lobstein A., 2013a. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*; 52 (525) : 18-21
- Couic-Marinier F., Lobstein A., 2013b. Composition chimique des huiles essentielles. *Actual pharm* ; 52 (525): 22-25.
- Couic-Marinier F., Lobstein A., 2013c. Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actual pharm*; 52 (525) : 26-30.
- Cox S.D., Gustafson J.E., Mann C.U., Warmington J., 1998. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 355.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170-175.
- Cox G., Wright G.D., 2013. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*.
- Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6300-6308.
- Christiansen R.H., Dalsgaard I., Middelboe M., Lauritsen A.H., Madsen L., 2014. Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum*-specific bacteriophages in vivo in rainbow trout upon oral administration: implications for disease control in aquaculture. *Appl Environ Microbiol.* 80(24):7683-93. <https://doi.org/10.1128/AEM.02386-14>.
- Christiansen R.H., Madsen L., Dalsgaard I., Castillo D., Kalatzis P.G., Middelboe M., 2016. Effect of bacteriophages on the growth of *Flavobacterium psychrophilum* and development of phage-resistant strains. *Microb Ecol.* 71(4):845-59. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0737-5>. Knowledge on bacteriophage activity on bacteria and development of resistant bacteria isolates as demonstrated in this paper is essential for a potential use of this method in the combat of flavobacteriosis.

D.

- Davis H.S., 1922. A new bacterial disease of freshwater fishes. *United States Bureau of Fisheries Bulletin*: 38, 261-280.
- Davis H.S., 1926. A new gill disease of trout. *Trans. American Fisheries Society*: 56, 156-160.
- Davis H.S., 1927. Further observations on the gill disease of trout. *Transactions of the American Fisheries Society*: 57, 210-212.
- Davis H.S., 1946. Care and diseases of trout Research Report no 12-63-66, *US Fish and Wildlife Service, US Dept of the Interior, US Government Printing Office* (cited in Bullock et al. 1971)
- D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W.L., Schwarz C., 2011. *Antibiotic resistance is ancient*. *Nature*. 477(7365):457-61.
- Declercq A.M., Chiers K., Haesebrouck F., Van den Broeck W., Dewulf J., Cornelissen M., 2015. Gill infection model for columnaris disease in common carp and rainbow trout. *J Aquat Anim Health*. 27(1):1–11. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.953265>.
- Delcour A.H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1794: 808-816.
- Demarne F.E., 1985. « Le géranium rosat ». *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, n°62.
- Desjobert J.M., Bianchini A., Tommy P., Costa J., Bernardini A.F., 1997. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. *Application à la valorisation des plantes de la flore Corse*. *Analysis*; 25 (6) : 13-16.
- D-H X., Shoemaker C.A., LaFrentz B.R., 2014. Enhanced susceptibility of hybrid tilapia to *Flavobacterium columnare* after parasitism by *Ichthyophthirius multifiliis*. *Aquaculture*. 430:44–9. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.041>.
- Didry N., Dubreuil L., 1993. Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. *Pharmacize*; 48: 301-4.
- Dixon R.A., 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dong H., Senapin S., LaFrentz B., Rodkhum C., 2016. Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid morphotypes of *Flavobacterium columnare* in red tilapia, *Oreochromis sp.*, fry. *J Fish Dis*. 39(6):649–55. <https://doi.org/10.1111/jfd.12385>.
- Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J App Microbiol*. 88(2):308-16.
- Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X., 2008. Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 385-392.

E.

-

- Echeverrigaray S., Grazziotin G., Grazziotin F., Agostini G., 2001. Random amplified polymorphisms between two South American subspecies of rattlesnakes (*Crotalus durissus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44: 313-317.
- El Bouzidi L., Jamali Alaoui C., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Industrial Crops and Products* 43: 450-456.
- Elamrani A., Zrira S., Benjilali B., Berrada M., 2000. A study of Moroccan rosemary oils. *Journal of essential oil research* 12: 487-495.
- Epidemiology & Animal Health (CEAH) <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/SA-Epidemiology-AnimalHealth-CEAH>
- Esteban M.A., Cerezuela R., 2015. Fish Mucosal Immunity: Skin. In: Beck and Peatman, Eds., *Mucosal Health in Aquaculture*, Academic Press, Cambridge, 67-92.
- EUMOFA, 2016. The EU fish market. *Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries of the European Commission, Brussels*, p 66
- Evenhuis J.P., LaPatra S.E., Marancik D., 2014. Early life stage rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortalities due to *Flavobacterium columnare* in Idaho, USA. *Aquaculture*; 418:126–31. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.044>.
- Evenhuis J.P., Mohammed H., LaPatra S.E., Welch T.J., Arias C.R., 2016. Virulence and molecular variation of *Flavobacterium columnare* affecting rainbow trout in Idaho, USA. *Aquaculture*. 464: 106–10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.017>.
- Evenhuis J.P., LaPatra S.E., Graf J., 2017. Draft genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* strain CSF-298-10. *Genome Announc.* 5(15):e00173–17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00173-17>.

F.

- Fadli M., Chevaliera J., Saad A., Mezrioui N.E., Hassani L., 2011. Essential oils from Moroccan plants as potential chemosensitisers restoring antibiotic activity in resistant Gram-negative bacteria. *Inter. J. Antimicrob. Agents* 38, 325-330.
- Faisal M., Diamanka A., Loch T., LaFrentz B., Winters A., García J., 2017. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* strains infecting fishes inhabiting the Laurentian Great Lakes basin. *J Fish Dis.* 40(5):637–48. <https://doi.org/10.1111/jfd.12548>.
- FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture en 2012. Vue générale du secteur aquacole national français. FishstatPlus. *Changement climatique, agriculture et sécurité alimentaire*
- FAO, 2016. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture en 2016. Vue générale du secteur aquacole national français. FishstatPlus *Changement climatique, agriculture et sécurité alimentaire*
- Farkas J., 1985. Filamentous *Flavobacterium* sp. isolated from fish with gill diseases in cold water. *Aquaculture*: 44, 1–10.

- Farmer B.D., Beck B.H., Mitchell A.J., Rawles S.D., Straus D.L., 2017. Dietary copper effects survival of channel catfish challenged with *Flavobacterium columnare*. *Aquac Res.* 48(4):1751–8. <https://doi.org/10.1111/are.13012>.
- Farmer B.D., Beck B.H., Mitchell A.J., Straus D.L., 2013. Pretreating channel catfish with copper sulfate affects susceptibility to *columnaris disease*. *N Am J Aquac.* 75(2):205–11. <https://doi.org/10.1080/15222055.2012.758210>.
- Farmer B.D., Straus D.L., Beck B.H., Kelly A.M., 2015. The effectiveness of flow-through or static copper sulfate treatments on the survival of golden shiners and fathead minnows infected with *Flavobacterium columnare*. *N Am J Aquac.* 77(1):90–5. <https://doi.org/10.1080/15222055.2014.953280>.
- Ferguson H.W., Ostland V.E., Byrne P., Lumsden J.S., 1991. Experimental production of bacterial gill disease in trout by horizontal transmission and by bath challenge. *Journal of Aquatic Animal Health:* 3, 118–123.
- Fernández-Álvarez C., Torres-Corral Y., Santos Y., 2017. Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Proteome.* <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.09.007>.
- Ferra, 2008. *Aquaculture Ed. Vuibert.*
- Filipovska A., Rackham O., 2013. Specialization from synthesis: How ribosome diversity can customize protein function. *FEBS Letters* **587**: 1189-1197.
- Fleming A., 1928. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*.
- Floss H.G., Yu T.W., 2005. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chemical Reviews* 105: 621-632.
- Fontana R., Comaglia G., Ligozzi M., Mazzariol A., 2000. The final goal: penicillin-binding proteins and the target of cephalosporins. *Wiley-Blackwell, Oxford, ROYAUME-UNI.*
- FranceAgriMer, 2017c. Observatoire de la formation des prix et des marges des produits alimentaires / rapport au Parlement / 2017
- Franchomme P., Pénoël D., Jollois R., 1990. L'aromathérapie exactement. R. J. Editeur. Limoges.
- Fredriksen B., Furevik A., Olsen R., Gauthier D., Mendoza J., Norderhus E., 2016. Virulence of Chilean field isolates of *Flavobacterium psychrophilum* in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr. *Bull Eur Ass Fish Pathol.* 36(2):67.
- Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 10, pp.1545-1560.
- Frelief P.F., Elston R.A., Loy J.K., Mincher C., 1994. Macroscopic and microscopic features of ulcerative stomatitis in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms:* 18, 227-231.
- Fu Y., Tang X., Lai Q., Zhang C., Zhong H., Li W., Liu Y., Chen L., Sun F., Shao Z., 2011. *Flavobacterium beibuense* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology:* 61, 205-209.

- Fujiwara-Nagata E., Eguchi M., 2009. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Disease*: 32, 873-881.
- Fujiwara-Nagata E., Ikeda J., Sugahara K., Eguchi M., 2012. A novel genotyping technique for distinguishing between *Flavobacterium psychrophilum* isolates virulent and avirulent to ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis* (Temminck and Schlegel). *J Fish Dis* 35:471–480
- Fuller S.A., Farmer B.D., Beck B.H., 2014. White bass *Morone chrysops* is less susceptible than its hybrid to experimental infection with *Flavobacterium columnare*. *Dis Aquat Org.* 109(1):15–22. <https://doi.org/10.3354/dao02716>.

G.

- Gabriel I., Alleman F., Dufourcq V., Perrin F., Gabarrou J.-F., 2013. Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles. 2. Hypothèses sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Prod. Anim.*, 26, 1, 13-24
- Gao D.X., Gaunt P.S., 2016. Development of new G media for culture of *Flavobacterium columnare* and comparison with other media. *Aquaculture*. 463:113–22. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.006>.
- Garner J., 1996. Phytothérapie-aromathérapie. *Encycl. Méd. Nat*, p : 20.
- Garnjobst L., 1945. *Cytophaga columnaris* (Davis) in pure culture: A myxobacterium pathogenic to fish. *Journal of Bacteriology*: 49, 113–128.
- Gibbs G.D., 2015. Detection of *Flavobacterium columnare* in tissues and pond water using real-time polymerase chain reaction. Mississippi: Mississippi State University.
- Giesecker C.M., Mayer T.D., Crosby T.C., Carson J., Dalsgaard I., Darwish A.M., 2012. Quality control ranges for testing broth microdilution susceptibility of *Flavobacterium columnare* and *F. psychrophilum* to nine antimicrobials. *Dis Aquat Org.* 101(3):207–15. <https://doi.org/10.3354/dao02527>.
- Ghedira K., Goetz P., Le Jeune R., 2010. Phytothérapie *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) *Giroflier* 8: 37. doi:10.1007/s10298-009-0521-5.
- Ghosh B., Cain K., Nowak B., Bridle A., 2016. Microencapsulation of a putative probiotic *Enterobacter* species, C6-6, to protect rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against bacterial coldwater disease. *J Fish Dis.* 39(1):1–11. <https://doi.org/10.1111/jfd.12311>.
- Gibbons S., 2008. Phytochemicals for bacterial resistance--strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med* 74: 594-602.
- Gill A.O., Holley R.A., 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology* 111: 170-174.
- Giordani R., Kaloustian J., 2006a. Action anticandidosique des huiles essentielles: leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytothérapie*, 4(3), 121-124.
- Girault M., Bougeon J., 1971. L'aromatogramme. *Cahier de biothérapie*, n°29.

- Gonny M., Bradesi P., Casanova J., 2004. Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 424-433.
- Good C.M., Thorburn M. A., Stevenson R.M.W., 2008. Factors associated with the incidence of bacterial gill disease in salmonid lots reared in Ontario, Canada government hatcheries. *Preventive Veterinary Medicine*: 83, 297-307.
- Goossens H., 2009. Antibiotic consumption and link to resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 3: 12-15.
- Gosink J.J., Woese C.R., Staley J.T., 1998. Polaribacter gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolated polar marine bacteria of the Cytophaga-*Flavobacterium*-Bacteroides group and reclassification of "*Flectobacillus glomeratus*" as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 48, 223-235.
- Grasteau A., 2015. Contribution à une approche intégrée pour la prévention de la flavobactériose dans les élevages de truites arc-en-ciel. Biodiversité et Ecologie. Université de Bordeaux. Français. ffNNT : BORD0312ff. fft.
- Green D.W., 2002. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 6(1), 1–20. doi:10.1517/14728222.6.1.1
- Grundmann H., Klugman K.P., Walsh T., 2011. A framework for global surveillance of antibiotic resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 14: 79-87.
- Guan L., Santander J., Mellata M., Zhang Y., Curtiss R., 2013. 3rd. Identification of an iron acquisition machinery in *Flavobacterium columnare*. *Dis Aquat Org.* 106(2):129– 38. <https://doi.org/10.3354/dao02635>.
- Guillemot D., Leclercq R., 2005. Impact de l'exposition des populations sur le risque de résistance bactérienne. *Médecine et Maladies Infectieuses* 35, Supplement 3: S212-S220.
- Guinoiseau E., 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Corse. Français. fftel-00595051f
- Gultepe N., Tanrikul T.T., 2006. Treatment methods of *Flavobacterium psychrophilum*: cause of rainbow trout fry syndrome (RFTS) and bacterial coldwater disease (BCWD) in Turkey. *Journal of Fisheries International* 1, 102-105.

H.

- Haburjak J.J., Schubert T.A., 1997. *Flavobacterium breve meningitis* in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*: 33, 509-512.
- Haddad P.S., Depot M., Settaf A., Chabli A., Cherrah Y., 2003. - Comparative study on the medicinal plants most recommended by traditional practitioners in Morocco and Canada. *J.Herbs, Spices Med. Plants*, 10(3), 25-45
- Hancock R.E.W., 2007. The end of an era? *Nature Reviews Drug Discovery* 6: 28-28.
- Hartmann G., Honikel K.O., Knüsel F., Nüesch J., 1967. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochimica et Biophysica Acta* 145: 843-844.

- Hawke J.P., Thune R.L., 1992. Systemic isolation and antimicrobial susceptibility of *Cytophaga columnaris* from commercially reared channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*: 4, 109–113.
- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3590-3595.
- Henríquez-Nuñez H., Evrard O., Kronvall G., Avendaño-Herrera R., 2012. Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354-355, 38-44.
- Hemaiswarya S., Kruthiventi A.K., Doble M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15: 639-652.
- Hernandez-Divers S.J., Hensel P., Gladden J., Hernandez-Divers S.M., Buhlman K.A., Hagen C., Sanchez S., Latimer K.S., Ard M., Camus A.C., 2009. Investigation of shell disease in map turtles (*Graptemys* spp.). *Journal of Wildlife Diseases*: 45, 637-652.
- Hibi K., Ushio H., Fukuda H., Mitsubayashi K., Hayashi T., Ren H., Endo H., 2008. Immunomagnetic separation using carbonyl iron powder and flow cytometry for rapid detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*: 391, 1147-1152.
- Hmammouchi M., 2005. Stratégie de conservation, de valorisation et de développement des plantes aromatiques et médicinales au Maroc. eds., pp. 9. Errachidia, Maroc.
- Hoare R., Ngo T.P., Bartie K., Adams A., 2017. Efficacy of a polyvalent immersion vaccine against *Flavobacterium psychrophilum* and evaluation of immune response to vaccination in rainbow trout fry (*Onchorynchus mykiss* L.). *Vet Res.* 48(1):43. [https:// doi.org/10.1186/s13567-017-0448-z](https://doi.org/10.1186/s13567-017-0448-z).
- Holliman A., Austin B., Pottinger T.G., 1991. A previously unrecognized *Cytophaga*-like bacterium (CLB) causing jaw erosion in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*: 11, 114-115.
- Holt R.A., 1987. *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. *PhD thesis, Oregon State University, Corvallis*.
- Holmes B., Snell J.J.S., Lapage S.P., 1977. Revised description, from clinical isolates, of *Flavobacterium odoratum* Stutzer and Kwaschnina 1929, and designation of the neotype strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 27, 330-336.
- Holmes B., Snell J.J.S., Lapage S.P., 1978. Revised description, from clinical strains, of *Flavobacterium breve* (Lustig) Bergey et al. 1923 and proposal of the neotype strain. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 28, 201-208.
- Holmes B., Owen R.J., Steigerwalt A.G., Brenner D.J., 1984a. *Flavobacterium gleum*, a new species found in human clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 34, 21-25.
- Holmes B., Owen R.J., McMeekin T.A., 1984b. Genus *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon 1923, 97AL. In Krieg, N. R. and Holt, J.

G. editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

- Hooper D.C., 2000. Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases* 31: S24-S28.

- Honderlick P., Gravisse J., Dardelle D., Cahen P., 2007. L'Aztréonam est-il « un challenger » possible pour le traitement des infections à Gram négatif ? Tentative de réponse à partir des données microbiologiques : étude *in vitro* concernant 36 485 entérobactéries et *Pseudomonas*. *Pathologie Biologie* 55: 475-477.

- Horn M., Harzenetter M.D., Linner T., Schmid E.N., Müller K.D., Michel R., Wagner M., 2001. Members of the Cytophaga-*Flavobacterium-Bacteroides* phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: Proposal of "Candidatus Amoebophilus asiaticus." *Environmental Microbiology*: 3, 440-449.

- Horn M.A., Ihssen J., Matthies C., Schramm A., Acker G., et Drake H.L., 2005. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 55, 1255-1265.

I.

- Ichrak G., Rim B., Loubna A.S., Khalid O., Abderrahmane R., Said el M., 2011. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oils from *Thymus satureioides* and *Thymus pallidus*. *Natural Product Communications* 6: 1507-1510.

- Ilardi P., Fernandez J., Avendaño-Herrera R., 2009. *Chryseobacterium piscicola* sp. nov., isolated from diseased salmonid fish. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 59, 3001-3005.

- Imajoh M., Tsuji Y., Yamashita H., Ohgi M., Monno S., Ohnishi K., 2017. Draft genome sequence of *Flavobacterium psychrophilum* strain SSADA-1411, isolated from an ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) migrating downriver to spawn in the Shimanto River, Kochi, Japan. *Genome Announc.* 2017;5(31):e00735-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00735-17>

- Imelouane B., Amhamdi H., Wathelet J.P., Ankit M., Khedid K., El Bachiri A., 2009. Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 205-208.

- Imhoff J. F., Stohr R., 2003. Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. In Muller, W. E. G. editor. *Sponges (Porifera)*. Berlin: Springer.

- Ismaili H., 2004. Valorisation du genre *Thymus* du Maroc: Etude phytochimique et pharmacologique des extraits non-volatils de trois espèces de thym : *T. willdenowii* Boiss, *T. broussonetii* Boiss, et *T. satureioides* Coss. Thesis, Université Mohamed V, Rabat. Maroc.

- Iturriaga M., Espinoza M.B., Poblete-Morales M., Feijoo C.G., Reyes A.E., Molina A., 2017. Cytotoxic activity of *Flavobacterium psychrophilum* in skeletal muscle cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Microbiol.* 210:101-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.009>.

J.

- Jaafari A., Ait Mouse H., Rakib E.M., Ait M'barek L., Tilaoui M., Benbakhta C., Boulli A., Abbad A., Zyad A., 2007. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17: 477-491.
- James C.E., 2018. « Traditional, complementary and alternative medicine use in Sub-Saharan Africa: a systematic review », *BMJ Global Health*, vol. 3, no 5, e000895 (PMID 30483405, PMCID 6231111, DOI 10.1136/bmjgh-2018-000895)
- Jevons M.P., Coe A.W., Parker M.T., 1963. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* 904- 907.
- Jin W.J., Zheng Z.M., Wang Q.Q., Qin A.J., Shao H.X., Qian K., 2012. Fosfomycin Resistance in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Journal of Integrative Agriculture* 11: 2051-2057.
- Jobling M., 1981. The influences of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review*. NOTE ADDED IN PROOF. *Journal of Fish Biology*, 18(5), 615–615. doi:10.1111/j.1095-8649.1981.tb03802.x
- Johansen J.E., Nielsen P., Sjøholm C., 1999. Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [Cytophaga] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 49, 1231-1240.
- Jones J.D.G., Dangl J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*. 444, 323-329.
- Jooste P.J., 1985. The Taxonomy and Significance of *Flavobacterium-Cytophaga* Strains from Dairy Sources [PhD thesis]. *University of the Orange Free State. Bloemfontein*, South Africa.
- Joulain D., 1994. Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: *use and abuse*, *Perfumer & Flavorist*, 19: 5-17.
- Juergens U.R., Dethlefsen U., Steinkamp G., 2003. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med* 97(3): 250–256.

K.

- Kahan F.M., Kahan J.S., Cassidy P.J., Kropp H., 1974. The mechanisms of action of fosfomycin *Annals of the New York Academy of Sciences* **235**: 364-386.
- Kahne D., Leimkuhler C., Lu W., Walsh C., 2005. Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chemical Reviews* **105**: 425-448.
- Kalembe D., Kunicka A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Med Chem*; 10(10): 813-29.
- Kämpfer P., Fallschissel K., Avendaño-Herrera R., 2011. *Chryseobacterium chaponense* sp. nov., isolated from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61, 497–501.
- Kämpfer P., Lodders N., Martin K., Avendaño-Herrera R., 2012. *Flavobacterium chilense* sp. nov., and *Flavobacterium araucanum* sp. nov., two novel

species isolated from farmed salmonid in Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 62,6,1402-8.

- Kannapiran E., Ravindran J., 2012. Dynamics and diversity of phosphate mineralizing bacteria in the coral reefs of Gulf of Mannar. *Journal of Basic Microbiology*: 52, 91-98.

- Karatas S., Ercan D., Steinum T.M., Turay E., Memis D., Candan A., 2010. First isolation of a *Flavobacterium johnsoniae* like bacteria from cultured Russian sturgeon in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*: 9, 1943-1946.

- Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H., 2006. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Med.* 72, 1330- 1334.

- Kato G., Sakai T., Suzuki K., Sano N., Takano T., Matsuyama T., 2014. Protective efficacies and immune responses induced by recombinant HCD, atpD and gdhA against bacterial cold-water disease in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Fish Shellfish Immunol.* 39(2): 396–400. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.040>.

- Katz M.L., Mueller L.V., Polyakov M., Weinstock S.F., 2006. Where have all the antibiotic patents gone? *Nature Biotechnology* 24: 1529-1531.

- Kayansamruaj P., Dong H.T., Hirono I., Kondo H., Senapin S., Rodkhum C., 2017. Comparative genome analysis of fish pathogen *Flavobacterium columnare* reveals extensive sequence diversity within the species. *Infection, Genetics and Evolution.* <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.012>. The publication gives a comprehensive summary on diversity and similarities between *F. columnare* isolates worldwide

- Kazemi M., Mousavi E., Bandrez N., 2012. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* and *Tanacetum parthenium*. *Research Journal of Soil Biology*, 4, 21-31.

- Kellner., Kobert., 1954. Möglichkeiten der verwendung ätherischer ole Zur Raumdesinfection. *Aeznein*; 4: 319.

- Kelly K.N., Monson J.R.T., 2012. Hospital-acquired infections. *Surgery (Oxford)* 30: 640-644.

- Kent M.L., Dungan C.F., Elston R.A., Holt R.A., 1988. *Cytophaga* sp. (Cytophagales) infection in seawater pen-reared Atlantic salmon *Salmo solar*. *Diseases of Aquatic Organsims*: 4, 173- 179.

- Kim H.M., Lee E.H., Hong S.H., 1998. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats», *Journal of Ethnopharmacology*, 60: 125 - 131.

- Kim K.K., Kim M.K., Lim J.H., Park H.Y., Lee S.T., 2005. Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb. nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 55, 1287–1293.

- Kim J., Gomez D.K., Nakai T., Park S.C., 2010. Isolation and identification of bacteriophages infecting ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* specific *Flavobacterium psychrophilum*. In: *Veterinary microbiology*. 140 (1-2), pp. 109-15.

- Kim J.J., Jin H.M., Lee H.J., Jeon C.O., Kanaya E., Koga Y., Takano K., Kanaya S., 2011. *Flavobacterium banpakuense* sp. nov., isolated from leaf-and-branch compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 61,1595–1600.
- Kinnula H., 2016. The influence of infective dose, nutrient availability and coinfection on virulence of *Flavobacterium columnare*: implications of intensive aquaculture on opportunistic infections. *Jyväskylä studies in biological and environmental. Science*. 321.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8: 423-435.
- Kumagai A., 2016. Bacterial cold-water disease in salmonid fish and ayu. *Fish Pathol.* 51(4):153–7. <https://doi.org/10.3147/jsfp.51.153>.
- Kumarasamy K.K., Toleman M.A., Walsh T.R., 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* 10: 597-602.
- Kumru S., Tekedar H.C., Waldbieser G.C., Karsi A., Lawrence M.L., 2016. Genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* genomovar II strain 94-081. *Genome Announc.* 4(3):e00430–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00430-16>.
- Kumru S., Tekedar H.C., Gulsoy N., Waldbieser G.C., Lawrence M.L., Karsi A., 2017. Comparative analysis of the *Flavobacterium columnare* genomovar I and II genomes. *Front Microbiol.* 8:1375. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01375>.
- Kunle O., Okogun J., 2003. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine*; 10: 59-61.
- Kunttu H., 2010. Characterizing the bacterial fish pathogen *Flavobacterium columnare*, and some factors affecting its pathogenicity. *Biology and Environmental Science*: 206, 1–69.
- Kunttu H.M., Sundberg L.R., Pulkkinen K., Valtonen E.T., 2012. Environment may be the source of *Flavobacterium columnare* outbreaks at fish farms. *Environ Microbiol Rep.*;4(4):398–402. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00342.x>.

L.

- Laanto E., Penttinen R.K., Bamford J.K., Sundberg L.-R., 2014. Comparing the different morphotypes of a fish pathogen implications for key virulence factors in *Flavobacterium columnare*. *BMC Microbiol.* 14(1):170. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-170>.
- Laanto E., Bamford J.K., Ravantti J.J., Sundberg L.-R., 2015. The use of phage FCL-2 as an alternative to chemotherapy against columnaris disease in aquaculture. *Front Microbiol* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00829>.
- LaFrentz B. R., LaPatra S.E., Jones G.R., Congleton J.L., Sun B., Cain K.D., 2002. Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative per cent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum* J. *Fish Dis.* 25 703–713
- LaFrentz B.R., LaPatra S.E., Call D.R., Cain K.D., 2008. Isolation of rifampicin resistant *Flavobacterium psychrophilum* strains and their potential as live

- attenuated vaccine candidates. *Vaccine*, 26(44), 5582–5589. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.083
- LaFrentz B.R., Lapatra S.E., Shoemaker C.A., Klesius P.H., 2012. Reproducible challenge model to investigate the virulence of *Flavobacterium columnare* genomovars in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 101, 115–122.
 - Lafrentz B.R., Waldbieser G.C., Welch T.J., Shoemaker C.A., 2014. Intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA genes of *Flavobacterium columnare* and standard protocol for genomovar assignment. *J. Fish Dis.* 37, 657–669. doi: 10.1111/jfd.12166
 - Lafrentz B.R., Garcia J.C., Dong H.T., Waldbieser G.C., Rodkhum C., Wong F.S., 2016. Optimized reverse primer for 16S-RFLP analysis and genomovar assignment of *Flavobacterium columnare*. *J. Fish Dis.* doi: 10.1111/jfd.12583. [Epub ahead of print].
 - Lahlou M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res*; 18: 435-48.
 - Lakhdar L., Hmamouchi M., Rida S., Ennibi O., 2012. Antibacterial activity of essential oils against periodontal pathogens: *A qualitative systematic review*. *Trop Dent J*; 35(140).
 - Lambert R.J.W., Skandamis P.N., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J App Microbiol*; 91(3): 453-62.
 - Lange M., Farmer B., Declercq A., Peatman E., Decostere A., Beck B., 2017. Sickeningly sweet: L-rhamnose stimulates *Flavobacterium columnare* biofilm formation and virulence. *J Fish Dis.* 40(11):1613–24. <https://doi.org/10.1111/jfd.12629>.
 - Langeveld W.T., Veldhuizen E.J.A., Burt S.A., 2013. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology* 1-19.
 - Lamendin H., Toscano G., Requirand P., 2004. *Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires*. *EMC-Dentisterie*, 1(2), 179-192.
 - Lamendin H., 2004. Huiles essentielles en diffusion atmosphérique. *Chir. Dent. Fr*; 1185 : 78 80.
 - LaPatra S.E., Fehring T.R., Cain K.D., 2014 A probiotic *Enterobacter sp.* provides significant protection against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after injection by two different routes. *Aquaculture*.433:361–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.022>. 78.
 - Lawrence M.L., Karsi A., Tekedar H.C., Banes M.M., Gibbs D., 2012. Comparative genomics and transcriptomics of *Flavobacterium columnare* isolates from genomovars I and II.
 - Leadbetter E.R., Order II., 1974. Cytophagales Nomen novum. In *Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. editors. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.*
 - Leclercq R., 2002. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases* 34: 482-492.

- Lee E.W., Huda M.N., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T., 2003. EfrAB, an ABC Multidrug Efflux Pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3733-3738.
- Levy S., 2002. From tragedy the antibiotic era is born. In: Levy SB, ed. *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers*. 2nd ed. Cambridge, MA: *Pereus Publishing* 1-14.
- Li H., Qiao G., Gu J.Q., Zhou W., Li Q., Woo S.H., Xu D.H., Park S.I., 2010. Phenotypic and genetic characterization of bacteria isolated from diseased cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in northeastern China. *Diseases of Aquatic Organisms*: 91, 223-235.
- Li N., Zhu Y., LaFrentz B.R., Evenhuis J.P., Hunnicutt D.W., Conrad R.A., 2017. The type IX secretion system is required for virulence of the fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *Appl Environ Microbiol.* AEM. 01769–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01769-17>.
- Libes Y., 2013. La toxicité et son évaluation La toxicité chimique et son évaluation. http://www4.ac-nancy-metz.fr/ia54-ircos/ienstmax/sites/ienstmax/IMG/pdf/pdf_La
- Lien S.K., 1988. Relatedness of *Flexibacter* spp. and *Flavobacterium* spp. isolated from fishes. Doctoral Dissertation, University of Georgia.
- Lievens B., Frans I., Heusdens C., Justé A., Jonstrup S.P., Lieffrig F., Willems K.A., 2011. Rapid detection and identification of viral and bacterial fish pathogens using a DNA array-based multiplex assay. *Journal of Fish Disease*: 34, 861-875.
- Lim C.S., Oh Y.S., Lee J.K., Park A.R., Yoo J.S., Rhee S.K., Roh D.H., 2011. *Flavobacterium chungbukense* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61, 2734-2739.
- Lindstrom N.M., Call D.R., House M.L., Moffitt C.M., Cain K.D., 2009. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay and filtration-based fluorescent antibody test as potential tools to screen broodstock for infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Aquatic Animal Health*: 21, 43-56.
- Liu H., Izumi S., Wakabayashi H., 2001. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in various organs of ayu *Plecoglossus altivelis* by in situ hybridization. *Fish Pathology*: 36, 7-11.
- Liu M., Li Y.H., Liu Y., Zhu J.N., Liu Q.F., Liu Y., Gu J.G., Zhang X.X., Li C.L., 2011. *Flavobacterium phragmitis* sp. nov., an endophyte of reed (*Phragmites australis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61, 2717-2721.
- Loch T.P., Faisal M., 2013. *Flavobacterium spartansii* sp. nov., a pathogen of fishes, and emended descriptions of *Flavobacterium aquidurensis* and *Flavobacterium araucanum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 2), 406–412. doi:10.1099/ij.s.0.051433-0
- Long A., Call D.R., Cain K.D., 2014. Investigation of the link between broodstock infection, vertical transmission, and prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* in eggs and progeny of rainbow trout and coho salmon. *J Aquat Anim Health*. 26(2):66–77. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.886632>.

- Lorenzen E., 1993. The importance of the brand of the beef extract in relation to the growth of *Flexibacter psychrophilus* in Anacker and Ordals medium. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*: 13, 64–65.
- Lorenzen E., 1994. Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to Rainbow trout Fry Syndrome (RTFS). Ph. D. thesis. Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Lorenzen E., Dalsgaard I., Bernardet J.F., 1997. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: Phenotypic and genomic studies. *Diseases of Aquatic Organisms*: 31, 197–208.
- Lorrain E., 2013. 100 questions sur la phytothérapie. *Ed. La boétie, Italie*.
- Luo Z., Fu J., Li N., Liu Z., Qin T., Zhang X., 2016. Immunogenic proteins and their vaccine development potential evaluation in outer membrane proteins (OMPs) of *Flavobacterium columnare*. *Aquacult Fish*. 1:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2016.10.002>.
- Luo Z., Liu Z., Fu J., Zhang Q., Huang B., Nie P., 2016. Immunogenicity and protective role of antigenic regions from five outer membrane proteins of *Flavobacterium columnare* in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Chin J Oceanol Limnol*. 34(6): 1247–57. <https://doi.org/10.1007/s00343-016-5096-z>.

M.

- MacPhee D.D., Ostland V.E., Lumsden J.S., Ferguson H.W., 1995. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to estimate the quantity of *Flavobacterium branchiophilum* on the gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*: 21, 13-23.
- Madetoja J., Nyman P., Wiklund T., 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ*. 43, 27-38
- Madsen L., Dalsgaard I., 1999. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ*. 36, 169-176.
- Madsen L., Bertelsen S.K., Dalsgaard I., Middelboe M., 2013. Dispersal and survival of *Flavobacterium psychrophilum* phages in vivo in rainbow trout and in vitro under laboratory conditions: implications for their use in phage therapy. *Appl Environ Microbiol*. 79(16):4853–61. <https://doi.org/10.1128/AEM.00509-13>. To evaluate the potential of phage therapy information on the survival of phages as provided in this paper is crucial
- Madsen L., Dalsgaard I., 2008. Water recirculation and good management: potential methods to avoid disease outbreaks with *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis* 31, 799-810.
- Magnadóttir B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Majumdar S.S., Padiglione A.A., 2012. Nosocomial infections in the intensive care unit. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* 13: 204-208.

- Martin E., 2013. Étude de l'immunité intestinale de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et perspectives de modulation par des additifs alimentaires : approches cellulaires et moléculaires. Biologie animale. Université de Lorraine, Français. ffNNT : 2013LORR0125ff. fftel-01750165f
- Marzouk B., Edziri H., Haloui I., Issawi M., Chraief I., El-Ouni N., Marzouk Z., 2009. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of a new chemotype of Tunisian *Thymus vulgaris* oils growing in Sayada. *J. Food Agric. Environ.* 7, 263–267.
- Massa F., Delorme C., Bagliniere J.L., Prunet P., Grimaldi C., 1999. Expositions d'oeufs de truite commune (*Salmo trutta*) à des hypoxies temporaires ou continue: effets sur la branchie, la résorption de la vésicule vitelline et les caractéristiques morphométriques des alevins. Bulletin Français de La Pêche et de La Pisciculture, (355), 421–440. doi:10.1051/kmae:1999007
- Matasyoh J.C., Maiyo Z.C., Ngure R.M., Chepkorir R., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry* 113: 526- 529.
- McCammon S.A., Bowman J.P., 2000. Taxonomy of Antarctic Flavobacterium species: description of *Flavobacterium gillisiae* sp. nov., *Flavobacterium tegetincola* sp. nov., and *Flavobacterium xanthum* sp. nov., nom. rev. and reclassification of [*Flavobacterium*] salegens as *Salegentibacter salegens* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: 50, 1055-1063.
- McGaw., Eloff., 2008. « Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties », *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, no 3, p. 559–574 (ISSN 0378-8741, PMID 18620038, DOI 10.1016/j.jep.2008.06.013)
- McGimpsey J.A., Douglas M.H., Van Klink J.W., Beauregard D.A., Perry N.B. 1994. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal* 9: 347-352.
- McMeekin T.A., Shewan J.M., 1978. A review: taxonomic strategies for *Flavobacterium* and related bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*: 45, 321-332.
- McVicar J., 2006. *Le grand livre des Herbes*.
- Mente E., Smaal A.C., 2016. Introduction to the special issue on “European aquaculture development since 1993: the benefits of aquaculture to Europe and the perspectives of European aquaculture production”. *Aquacult Int* 24, 693–698 doi:10.1007/s10499-016-0003-3
- Michel C., 1986. Intérêt pratique, dangers potentiels et règles d'emploi des thérapeutiques antibactériennes chez les poissons ; *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 5 (3), 635-657
- Michel C., Antonio D., Hedrick R.P., 1999. Production of viable cultures of *Flavobacterium psychrophilum* approach and control. *Research in Microbiology*: 150, 351–358.
- Michel C., Matte-Tailliez O., Kerouault B., Bernardet J.F., 2005. Resistance pattern and assessment of phenicol agents' minimum inhibitory concentration in multiple

drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *Journal of Applied Microbiology*: 99, 323–332.

- Milhau G., Valentin A., Benoit F., Mallie M., Bastide J., Pelissier Y., Bessiere J., 1997. *In vitro* antimicrobial activity of eight essential oils. *Journal of Essential Oil Research* 9: 329-333.

- Miranda C.D., Smith P., Rojas R., Contreras-Lynch S., Vega J.A., 2016. Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* from Chilean salmon farms and their epidemiological cut-off values using agar dilution and disk diffusion methods. *Front Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01880>.

- Miyashita M., Fujimura S., Nakagawa Y., Nishizawa M., Tomizuka N., Nakagawa T., Nakagawa J., 2010. *Flavobacterium algicola* sp. nov., isolated from marine algae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 60, 344-348.

- Mohammed H., Arias C., 2016. Protective efficacy of *Nigella sativa* seeds and oil against columnaris disease in fishes. *J Fish Dis.* 39(6):693–703. <https://doi.org/10.1111/jfd.12402>.

- Moreno P., Molinari L., Hualde P., Miyazaki T., 2016. First report of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Argentina. *Bull Eur Ass Fish Pathol.* 36(2):59.

- Morrison C., Cornick J., Shum G., Zwicker B., 1981. Microbiology and histopathology of "saddleback" disease of underyearling Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*: 4, 243-258.

- Mudarris M., Austin B., Segers P., Vancanneyt M., Hoste B., Bernardet J.-F., 1994. *Flavobacterium scopthalmum* sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 447–453

N.

- Nakayama H., Mori M., Takita T., Yasukawa K., Tanaka K., Hattori S., 2017. Development of immersion vaccine for bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81(3):608–13. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1268041>.

- Nematollahi A., Decostere A., Pasmans F., Haesebrouck F., 2003a *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *J Fish Dis* 26:563–574

- Neiger R., Thomas M., Das S., Barnes M., Fletcher B., Snekvik K., 2016. Draft genome sequences of three *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from coldwater disease outbreaks at three production hatcheries. *Genome Announc.* 4(2): e00035–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00035-16>.

- Ngo T.P., Bartie K.L., Thompson K.D., Verner-Jeffreys D.W., Hoare R., Adams A., 2017. Genetic and serological diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from salmonids in United Kingdom. *Vet Microbiol.* 2017;201:216–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.01.032>

- Nham T., 2012. Suivi *in vivo* et en temps réel du processus infectieux induit par *Yersinia pestis*. Bactériologie. Université Paris-Diderot - Paris VII. Français. ffitel-00731170f

- Nilsen H., Sundell K., Duchaud E., Nicolas P., Dalsgaard I., Madsen L., 2014. Multilocus sequence typing (MLST) identifies epidemic clones of *Flavobacterium psychrophilum* in Nordic countries. *Appl Environ Microbiol.* AEM. 04233–13. [https://doi.org/ 10.1128/AEM.04233-13](https://doi.org/10.1128/AEM.04233-13). The publication provides the most complete overview on the different sequence types of *F. psychrophilum* in North European countries.
- Noble A.C., Summerfelt S.T., 1996. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual Review of Fish Diseases*, 6, 65–92. doi:10.1016/s0959-8030(96)90006-x

O.

- OMS, 2002. Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel - *Organisation Mondiale de la Santé. eds.*, pp. 4-6.
- Onawunmi G.O., 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett Appl Microbiol.* 9: 105–108.
- Oplinger R.W., Wagner E.J., 2012. Effects of media ingredient substitution and comparison of growth of *Flavobacterium psychrophilum* among four media. *J Aquat Anim Health.* 24(1):49–57. <https://doi.org/10.1080/08997659.2012.668510>.
- Oplinger R.W., Wagner E.J., 2013. Control of *Flavobacterium psychrophilum*: tests of erythromycin, streptomycin, osmotic and thermal shocks, and rapid pH change. *J Aquat Anim Health.* 25(1):1–8. <https://doi.org/10.1080/08997659.2012.720636>.
- Oplinger R.W., Wagner E.J., 2015. Use of penicillin and streptomycin to reduce spread of bacterial coldwater disease I: Antibiotics in sperm extenders. *J Aquat Anim Health.* 7(1):25–31. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.966211>. 70.
- Oplinger R.W., Wagner E.J., Cavender W., 2015. Use of penicillin and streptomycin to reduce spread of bacterial coldwater disease II: Efficacy of using antibiotics in diluents and during water hardening. *J Aquat Anim Health.* 27(1):32–7. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.945049>. 71.
- Ordal E.J., Rucker R. R., 1944. Pathogenic *myxobacteria*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*: 56, 15–18.
- Orioux N., Bourdineaud J.P., Douet D.G., Daniel P., Le Hénaff M., 2011. Quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), tissues by qPCR. *Journal of Fish Disease*: 34, 811-821.
- Osawa K., Yasuda H., Morita H., 1996. Macroparas H, I, and J from the leaves of *Eucalyptus globulus*. *J Nat Prod* 59(9): 824–827.
- Ostland V.E., Lumsden J.S., MacPhee D.D., Ferguson H.W., 1994. Characteristics of *Flavobacterium branchiophilum*, the cause of salmonid bacterial gill disease in Ontario. *Journal of Aquatic Animal Health*: 6, 13–26.

P.

- Pacha R.E., 1968. Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. *Journal of Applied Microbiology*: 16, 97-101.

- Pagès J.M., James C.E., Winterhalter M., 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria *Nature Reviews Microbiology* 6: 893-903.
- Paneru B., Al-Tobasei R., Palti Y., Wiens G.D., Salem M., 2016. Differential expression of long non-coding RNAs in three genetic lines of rainbow trout in response to infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *Sci Rep.* 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36032>.
- Papadopoulou A., Dalsgaard I., Lindén A., Wiklund T., 2017. *In vivo* adherence of *Flavobacterium psychrophilum* to mucosal external surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *J Fish Dis.* 40(10):1309–20. <https://doi.org/10.1111/jfd.12603>.
- Paquet-Bouchard C., 2006. Caractérisation moléculaire de la protéine antibiotique P1 du phage P205. Thesis, Université Laval, Québec.
- Park J.T., Uehara T., 2008. How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72: 211- 227.
- Park H.W., Kim Y.O., Ha J.S., Youn S.H., Kim H.H., Bilgrami A.L., Shin C.S., 2011. Effects of associated bacteria on the pathogenicity and reproduction of the insect-parasitic nematode *Rhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). *Canadian Journal of Microbiology*: 57, 750- 758.
- Parra O., Sánchez-Armengol Á., Capote F., Bonnin M., Arboix A., Campos-Rodríguez F., Macarrón J.L., 2014. Efficacy of continuous positive airway pressure treatment on 5-year survival in patients with ischaemic stroke and obstructive sleep apnea: a randomized controlled trial. *Journal of Sleep Research*, 24(1), 47–53. doi:10.1111/jsr.12181
- Patra A., Sarker S., Banerjee S., Adikesavalu H., Biswas D., Abraham T., 2016. Rapid detection of *Flavobacterium columnare* infection in fish by species-specific polymerase chain reaction. *J Aquac Res Dev.* 7:445. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000445>.
- Pattnaik S., 1995. Effect of essential oils in the variability and morphology of *Escherichia coli*. *Microbios*, 48: 195-9.
- Peatman E., Li C., Peterson B.C., Straus D.L., Farmer B.D., Beck B.H., 2013. Basal polarization of the mucosal compartment in *Flavobacterium columnare* susceptible and resistant channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mol Immunol.* 56(4):317–27. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.04.014>. 109.
- Penttinen R., Kinnula H., Lipponen A., Bamford J.K., Sundberg L.-R., 2016. High nutrient concentration can induce virulence factor expression and cause higher virulence in an environmentally transmitted pathogen. *Microb Ecol.* 72(4):955–64. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0781-1>. The importance of environmental factors as stressors for fish is well known. However, in this study, the effects of environmental parameters, i.e., nutrients, on the pathogen are elucidated and shown to have a major influence on pathogenicity.

- Pepin J.F., Emery E., 1993. Marine *Cytophaga-like* bacteria (CLB) isolated from diseased reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from French Mediterranean coast. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*: 13, 165-167.
- Pereira M.J., 2012. Characterization of chondroitin AC lyase in *Flavobacterium columnare*. Master Thesis, University of Rhode Island. <https://search.proquest.com/docview/1095368429>.
- Pérez-Sancho M., Vela A.I., Wiklund T., Kostrzewa M., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F., 2017. Differentiation of *Flavobacterium psychrophilum* from *Flavobacterium psychrophilum*-like species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Res Vet Sci*. 115:345– 52. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.022>.
- Perruci S., Mancianti F., Cioni P.L., Famini G., Morelli I., Macchioni G., 1994. In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *Planta Med*; 60: 184-187.
- Pharmacopée européenne, 2008. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (Afssaps) Mai 2008.
- Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Gonçalves M.J., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodrigues A., Martinez-de-Oliveira J., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and *dermatophyte* species. *Journal of Medical Microbiology*, 55, pp. 1367–1373.
- Pintore G., Usai M., Bradesi P., 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 17: 15-19.
- Pibiri M.C., 2006. Thèse Doctorat. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *EPFL Lausanne*, p.161.
- Plant K.P., LaPatra S.E., Call D.R., Cain K.D., 2014. Attempts at validating a recombinant *Flavobacterium psychrophilum* gliding motility protein N as a vaccine candidate in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) against bacterial cold-water disease. *FEMS Microbiol Lett*. 358(1):14–20. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12543>.
- Pupo E., Hardy E., 2009. Complexity and solutions to the isolation problem of Gram negative lipopolysaccharides' bacteria molecular species. *Biotechnología Aplicada* 26: 9-15.

Q.

- Qu J.H., Yuan H.L., Li H.F., Deng C.P., 2009. *Flavobacterium cauense* sp. nov., isolated from sediment of a eutrophic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 59, 11, 2666-2669.

R.

- Rafi A., Tasneem U.S., Achfaq A., Muchtaq A., 1994. Medicinal importance of essential oils. *Hamdard Medicus*. XXXVI(3): 101-105.
- Rahimmalek M., Goli S.A.H., 2013. Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymys daenensis* subsp. *daenensis*. Celak leaves. *Industrial Crops and Products* 42: 613-619.
- Rangdale R.E., Richards R.H., Alderman D.J., 1996. Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive

fluids and egg surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*: 16, 63–67.

- Rasooli I., Bagher Rezaei M., Allameh A., 2006. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int J Infect Dis* 10 : 236-41.

- Reichenbach H., 1989. Order I: Cytophagales Leadbetter 1974. In Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig N., Holt J.G., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD: *Williams and Wilkins*.

- Rochat T., Barbier P., Nicolas P., Loux V., Pérez-Pascual D., Guijarro J.A., 2017. Complete genome sequence of *Flavobacterium psychrophilum* strain OSU THCO2-90, used for functional genetic analysis. *Genome Announc.* 5(8):e01665–16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01665-16>.

- Rochat T., Fujiwara-Nagata E., Calvez S., Dalsgaard I., Madsen L., Calteau A., Lunazzi A., Nicolas P., Wiklund T., Bernardet J.F., Duchaud E., 2017. Genomic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* serotypes and development of a multiplex PCRbased serotyping scheme. *Front Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01752>.

- Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19: 681-687.

- Rioux D., 2000. Contribution à la validation physique de la modélisation des microhabitats en2D pour le saumon Atlantique (*Salmo salar*) de la rivière Sainte-Marguerite. Mémoire de maîtrise, INRS-Eau. Sainte-Foy, Québec. 164 p.

- Rucker R.R., Johnson H.E., Ordal E.J., 1949. An investigation of the bactericidal action and fish toxicity of two homologous series of quarternary ammonium compounds. *Journal of Bacteriology*: 57, 225-234.

- Rucker R.R., Johnson H.E., Kaydas G.M., 1952. An interim report on gill disease. *Progressive Fish Culturist*: 14, 10-14.

- Ryerse I.A., Hooft J.M., Bureau D.P., Anthony Hayes M., Lumsden J.S., 2016. Diets containing corn naturally contaminated with deoxynivalenol reduces the susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to experimental *Flavobacterium psychrophilum* infection. *Aquac Res.* 47(3):787–96. <https://doi.org/10.1111/are.12537>.

- Ryu S.H., Park J.H., Moon J.C., Sung Y., Lee S.S., Jeon C.O., 2008. *Flavobacterium resistens* sp. Nov., isolated from stream sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 58, 2266-2270.

S.

- Saad A., Fadli M., Bouaziz M., Benharref A., Mezrioui N.E., Hassani L., 2010. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine* 17: 1057-1060.

- Safaei-Ghomi J., Ahd A.A., 2010. Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacogn Mag*; 6:172-5.

- Salgueiro L.R., Vila R., Tomi F., 1997. Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry* 45: 307-311.
- Santos F.S.R., Novales M.G.M., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech.* 23:136–41.
- Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D., Talbi M., 2007. Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, pp. 85-96.
- Schrader K.K., Cantrell C.L., Mamonov L.K., Kustova T.S., 2013. Bioassaydirected isolation and evaluation of harmine from the terrestrial plant *Peganum harmala* L. for antibacterial activity against *Flavobacterium columnare*. *J Microbiol Res.* 3(6):255–60.
- Schulz C., Faisal M., 2010. The Bacterial Community Associated with the Leech *Myzobdella lugubris* Leidy 1851 (Hirudinea: Piscicolidae) from Lake Erie, Michigan, USA. *Parasite Volume:* 17, 2, 113-121.
- Schwedt G., 1993. Méthodes d'analyse. *Ed. Flammarion.*
- Scott S.J., Bollinger T.K., 2014. *Flavobacterium columnare*: an important contributing factor to fish die-offs in southern lakes of Saskatchewan, Canada. *J Vet Diagn Investig.* 26(6):832–6. <https://doi.org/10.1177/1040638714553591>.
- Sealey W.M., Conley Z.B., Bensley M., 2015. Probiotic supplementation has only minimal effects on growth efficiency, intestinal health and disease resistance of Westslope cutthroat trout *Oncorhynchus clarkii lewisi* fed 30% soybean meal. *Front Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00396>.
- Sebastião F.A., Pilarski F., Lemos M.V.F., 2013. Composition of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Flavobacterium columnare* isolated from tropical fish in Brazil. *Braz J Microbiol.* 44(3):861–4. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000058>.
- Sefidkon F., Jamzad Z., 2000. Essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge. *Journal of Essential Oil Research* 12:545-546.
- Sefidkon F.K., Abbasi Z., Jamzad S., Ahmadi F., 2007. "The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad, *Food Chemistry*, vol.100, pp. 1054-1058.
- Segers P., Mannheim W., Vancanneyt M., De Brandt K., Hinz K.H., Kersters K., Vandamme P., 1993. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the *Flavobacterium- Cytophaga* rRNA homology group. *International Journal of Systematic Bacteriology:* 43, 768-776.
- Seghouani H., Garcia-Rangel C.-E., Füller J., Gauthier J., Derome N., 2017. Walleye autochthonous bacteria as promising probiotic candidates against *Flavobacterium columnare*. *Front Microbiol.* 8: 1349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01349>.
- Siekoula-Nguédia C., Blanc G., Duchaud E., Calvez S., 2012. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: predominance of a clonal complex. *Vet Microbiol;* 161(1):169–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.022>.

- Sheu S.Y., Chiu T.F., Young C.C., Arun A.B., Chen W.M., 2011. *Flavobacterium macrobrachii* sp. nov., isolated from a freshwater shrimp culture pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61, 6, 1402-1407.
- Shewan J.M., 1961. The microbiology of sea-water fish. In Borgstrom, G. editor. *Fish as Food Volume 1*. New York: Academic Press.
- Shewan J. M., 1977. The Bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action. In Proceedings of handling, processing and marketing of tropical fish conference. *Tropical Products Institute, London*, pp 51-66.
- Shieh H.S., 1980. Studies on the nutrition of a fish pathogen, *Flexibacter columnaris*. *Microbios Letters*: 13, 129-133.
- Shimizu M., Goda H., Yamasaki K., Oshima S.-i., Ohnishi K., Osaki Y., 2016. Draft genome sequence of *Flavobacterium psychrophilum* strain KTEN-1510 with genotype A/GC, isolated from an ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) in the Kagami River, Kochi, Japan. *Genome Announc.* 4(1):e01762-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01762-15>.
- Shoemaker C.A., LaFrentz B.R., 2015. Growth and survival of the fish pathogenic bacterium, *Flavobacterium columnare*, in tilapia mucus and porcine gastric mucin. *FEMS Microbiol Lett.* 362(4):1-5. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu060>.
- Shotts E.B., Hsu T.C., Waltman W.D., 1985. Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathology*: 20, 37-44.
- Shotts E.B., Starliper C.E., 1999. Flavobacterial diseases: Columnaris disease, cold-water disease and bacterial gill disease. In: *Woo, P. T. K. and Bruno D. W. editors. Fish Diseases and Disorders Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. Oxford, UK: CABI Publishing.*
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J Food Chem*; 44: 1202-5.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022-8028.
- Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., 1997. Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3197-3201.
- Snieszko S.F., 1981. Bacteria gill disease of freshwater fishes. U.S. *Fish Wildlife Service Fish Disease Leaflet* 62.
- Soares G.M.S., Figueiredo L.C., Faveri M., Cortelli S.C., Duarte PM., Feres M., 2012. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science* 20: 295-309.
- Soltani M., Munday B., Carson J., 1994. Susceptibility of some freshwater species of fish to infection by *Cytophaga johnsonae*. *Bulletin of European Fish Pathologists*: 14, 133-135.
- Sokmen A., Gulluce M., Askin Akpulat H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M., Sahin F., 2004. The *in vitro* antimicrobial and anti oxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control* 15, 627-634.

- Sokovic M.D., Vukojevic J., Marin P.D., Brkic D.D., Vajs V., Van Griensven L.J.L.D., 2009. Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules* 14, 238-249.
- Soundouss C., 1998. « Les essences de Géranium : Influences pédoclimatique et saisonnière sur les essences Marocaines : Classification par les méthodes d'analyse de données ». Thèse de doctorat en Sciences, Université Aix en Provence, Marseille, 3p. (no: 98 AIX3 0076).
- Stahl-Biskup E., Saez F., 2002. *Thyme: the genus Thymus*. New York. *Stagliano M. Actifs et additifs en cosmétologie, techniques et documentations Lavoisier* 1992.
- Starliper C.E., 1992. Studies on the effects of environmental factors of fish diseases. Doctoral Dissertation. University of Georgia.
- Starliper C.E., 2011. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research*: 2, 97-108.
- Starliper C.E., 2012. Flavobacterial diseases: columnaris disease, coldwater disease, and bacterial gill disease. In: Woo PTK, Bruno DW, Schill WB, editors. *Fish Diseases and Disorders*. 2nd edn. Vol. 3. Wallingford, UK: CAB International. pp. 606–631.
- Straus D.L., Farmer B.D., Beck B.H., Bosworth B.G., Torrans E.L., Tucker C.S., 2015. Water hardness influences *Flavobacterium columnare* pathogenesis in channel catfish. *Aquaculture*. 435:252–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.003>.
- Strohl W.R., Tait L.R., 1978. *Cytophaga aquatilis* sp. nov., a facultative anaerobe isolated from the gills of freshwater fish. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 28, 293–303.
- Strepparava N., Nicolas P., Wahli T., Segner H., Petrini O., 2013. Molecular epidemiology of *Flavobacterium psychrophilum* from Swiss fish farms. *Dis Aquat Org.*; 105 (3):203–10. <https://doi.org/10.3354/dao02609>.
- Sudheesh P.S., Cain K.D., 2016. Optimization of efficacy of a live attenuated *Flavobacterium psychrophilum* immersion vaccine. *Fish Shellfish Immunol*. 56:169–80. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.004>.
- Sudheesh P., Zimmerman J., Cain K., 2016. Dietary effects on immunity, stress, and efficacy of two live attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine formulations. *Aquaculture*. 454:35–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.004>.
- Suebsing R., Kim J.H., 2012. Isolation and characterization of *Flavobacterium johnsoniae* from farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*: 15, 1, 83-89.
- Suebsing R., Kampeera J., Sirithammajak S., Withyachumnarnkul B., Turner W., Kiatpathomchai W., 2015. Colorimetric method of loopmediated isothermal amplification with the pre-addition of calcein for detecting *Flavobacterium columnare* and its assessment in tilapia farms. *J Aquat Anim Health*. 27(1):38–44. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.966212>.

- Suzuki M., Nakagawa Y., Harayama S., Yamamoto S., 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: Proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 51, 1639–1652.

T.

- Tahiri B., 1996. Etude biosystématique et chimique du genre Thymus L. (Labiatae) au Maroc. Thesis, Université Mohamed V, Rabat. Maroc.

- Tan C.-X., Schrader K.K., Khan I.A., Rimando A.M., 2015. Activities of wogonin analogs and other flavones against *Flavobacterium columnare*. *Chem Biodivers.* 12(2):259–72. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400181>.

- Targant H., 2010. L'îlot de multirésistance aux antibiotiques, Salmonella Genomic Island 1(SGI1) : variabilité, diffusion inter - espèces et implication dans la virulence. Thesis, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon.

- Taudou A., 1990. Activité antifongique des labiatae. Données bibliographiques. Etudes in vitro de treize huiles essentielles (intérêt de la microémulsion). Doctorat d'état en sciences pharmaceutiques. Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

- Tekedar H.C., Karsi A., Gillaspay A.F., Dyer D.W., Benton N.R., Zaitshik J., 2012. Genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* ATCC 49512. *J Bacteriol.* 194(10):2763–4. <https://doi.org/10.1128/JB.00281-12>.

- Toyama T., Kita-Tsukamoto K., Wakabayashi H., 1994. Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathology*: 29, 271–275.

- Toyama T., Kita-Tsukamoto K., Wakabayashi H., 1996. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology*: 31, 25–31.

- Triyanto K.A., Wakabayashi H., 1999. The use of PCR targeted 16S rDNA for identification of genomovars of *Flavobacterium columnare*. *Fish Pathology*: 34, 217–218.

- Typas A., Banzhaf M., Gross C.A., Vollmer W., 2012. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 123-136.

U.

- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., 2002. *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus.* *American Society for Microbiology, Washington, DC, Etats-Unis.*

V.

- Vaara M., 2010. Polymyxins and their novel derivatives. *Current Opinion in Microbiology* 13: 574-581.

- Valvano M.A., 2011. Common themes in glycoconjugate assembly using the biogenesis of Oantigen lipopolysaccharide as a model system. *Biochemistry* **76**: 729-735.

- Vancanneyt M., Segers P., Torck U., Hoste B., Bernardet J.F., Vandamme P., Kersters K., 1996. Reclassification of *Flavobacterium odoratum* (Stutzer 1929) strains to a new genus, *Myroides*, as *Myroides odoratus* comb. nov. and *Myroides odoratimimus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 46, 926-932.
- Vancanneyt M., Vandamme P., Segers P., Torck U., Coopman R., Kersters K., Hinz K.H., 1999. *Riemerella columbina* sp. nov., a bacterium associated with respiratory disease in pigeons. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 49, 289-295.
- Vandamme P., Bernardet J.F., Segers P., Kersters K., Holmes B., 1994. New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 44, 827-831.
- Vandamme P., Vancanneyt M., Segers P., Ryll M., Köhler B., Ludwig W., Hinz K.H., 1999. *Coenonia anatina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium associated with respiratory disease in ducks and geese. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 49, 867-874.
- Van Vliet D., Loch T.P., Faisal M., 2015. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid broodstock and hatchery-propagated stocks of the Great Lakes Basin. *J Aquat Anim Health*. 27(4):192-202. <https://doi.org/10.1080/08997659.2015.1088488>.
- Van Vliet D., Wiens G.D., Loch T.P., Nicolas P., Faisal M., 2016. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from three *Oncorhynchus* spp. in the United States, as revealed by multilocus sequence typing. *Appl Environ Microbiol*. 82(11):3246-55. <https://doi.org/10.1128/AEM.00411-16>.
- Vela A.I., Fernandez A., Sánchez-Porro C., Sierra E., Mendez M., Arbelo M., Ventosa A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F., 2007. *Flavobacterium ceti* sp. nov., isolated from beaked whales (*Ziphius cavirostris*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 57, 11, 2604-2608.
- Verma D.K., Rathore G., 2013. Molecular characterization of *Flavobacterium columnare* isolated from a natural outbreak of columnaris disease in farmed fish, *Catla catla* from India. *J Gen Appl Microbiol*. 59(6):417-24. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.417>.
- Verrier E., 2013. Bases génétiques de la résistance aux rhabdovirus et réponse cellulaire chez la truite arc-en-ciel: importance des mécanismes de défense innés. Sciences agricoles. *AgroParisTech. Français*. ffNNT : 2013AGPT0001ff. ffpastel-00914894f.
- Villarroel M.J., Sancho E., Andreu-Moliner E., Ferrando M.D., 2009. Biochemical stress response in tetradifon exposed *Daphnia magna* and its relationship to individual growth and reproduction. *Sci. Total Environ*. 407, 5537-5542.
- Vinegar R., Truax J.F., Selph J.L., 1973. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 143(3):711-714.

- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Al- Alvarez J.A., 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J. of Food Safety*. 27, 91-101.
- Vogtlander N.J., Van Kasteren M.E., Natsch S., Kullberg B., Hekster Y.A. Van Der Meer J.M., 2004. Improving the process of antibiotic therapy in daily practice: Interventions to optimize timing, dosage adjustment to renal function, and switch therapy. *Archives of Internal Medicine* 164: 1206-1212.
- Vuorelaa P., Leinonenb M., Saikkuc P., Tammela P., Rauhad J.P., Wennberge T., Vuorela H., 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Current Medicinal Chemistry* 11: 1375-1389.

W.

- Wacksman S.A., Woodruff H.B., 1940. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease producing bacteria. In *“Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”*. Williams & Wilkins Eds, 4: 2333-2648.
- Wagner E.J., Oplinger R.W., Arndt R.E., Forest A.M., Bartley M., 2010. The safety and effectiveness of various hydrogen peroxide and iodine treatment regimens for rainbow trout egg disinfection, Vol 72. *American Fisheries Society, Bethesda, MD, ETATS-UNIS*, 9 p.
- Wagner E.J., Oplinger R.W., 2014. Comparison of the susceptibility of four rainbow trout strains to cold-water disease. *J Aquat Anim Health*. 26(3):160–7. <https://doi.org/10.1080/08997659.2014.922514>.
- Wakabayashi H., 1980. Bacterial gill disease of salmonid fish. *Fish Pathology*: 14, 185-189.
- Wakabayashi H., Huh G.J., Kimura N., 1989. *Flavobacterium branchiophila* sp. nov., a causative agent of bacterial gill disease of freshwater fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology*: 39, 213–216.
- Wakabayashi H., Horinouchi M., Bunya T., Hoshiai G., 1991. Outbreaks of cold-water disease in coho salmon in Japan. *Fish Pathol* 26:211–212
- Wald M., Schwarz K., Rehbein H., Bußmann B., Beermann C., 2016. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chem*. 205:221–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002>.
- Walsh C., 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.
- Wegrzyn R., Lamendinh H., 2005. Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire. *Chir. Dent. Fr*; 1225: 62-66.
- Wiklund T., Madsen L., Bruun M.S., Dalsgaard I., 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology*: 88, 299–307.
- WHO, 2002. “Traditional Medicine Strategy “ [archive], (consulté le 29 septembre 2014), p. 1
- WHO, 2012. Antibiotic resistance. *World Health Organization - Geneva*.

- Wood J.W., 1968. Diseases of Pacific Salmon: Their Prevention and Treatment. *Washington, D.C., State of Washington Department of Fisheries, Hatchery Division.*
- Wright G.D., 2012. Antibiotics: A New Hope. *Chemistry & Biology* 19: 3-10.
- Wright G.D., Poinar H., 2012. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends in Microbiology* 20: 157-159.
- Wurtsbaugh W.A., Davis G.E., 1977. Effects of fish size and ration level on the growth and food conversion efficiency of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 11(2), 99–104. doi:10.1111/j.1095-8649.1977.tb04102.x

X.

- Xiang H., Wei G.F., Jia S., Huang J., Miao X.X., Zhou Z., Zhao L.P., Huang Y.P., 2006. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Canadian Journal of Microbiology*: 52, 1085–1092.
- Xi N., Huang Q., Liu L., 2008. 4.02 - Imidazoles. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*, (Alan RK, Christopher AR, Eric FVS & Richard JKT, eds.), pp. 143-364. *Elsevier, Oxford.*
- Xie Z.Y., Zhou Y.C., Wang S.F., Mei B., Xu X.D., Wen W.Y., Feng Y.Q., 2009. First isolation and identification of *Elizabethkingia meningoseptica* from cultured tiger frog, *Rana tigrina rugulosa*. *Veterinary Microbiology*: 138, 140-144.
- Xu M., Xin Y., Tian J., Dong K., Yu Y., Zhang J., Liu H., Zhou Y., 2011. *Flavobacterium sinopsychrotolerans* sp. nov., isolated from a glacier. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61, 20-24.
- Xu D.H., Shoemaker C.A., Zhang D., 2015. Treatment of *Trichodina* sp reduced load of *Flavobacterium columnare* and improved survival of hybrid tilapia. *Aquaculture Reports*, 2, 126–131. doi:10.1016/j.aqrep.2015.09.007
- Xu H.-J., Jiang W.-D., Feng L., Liu Y., Wu P., Jiang J., 2016. Dietary vitamin C deficiency depressed the gill physical barriers and immune barriers referring to Nrf2, apoptosis, MLCK, NF-κB and TOR signaling in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under infection of *Flavobacterium columnare*. *Fish Shellfish Immunol.* 58:177–92. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.029>.

Y.

- Yadaiah G., Joshi P., Oza B., 2011. Traditional knowledge of wild medicinal plants of Baria forest division, Dahod district, Gujarat state. *The Indian Forester* 137: 812-821.
- Yang X., Guo J.L., Ye J.Y., Zhang Y.X., Wang W., 2015. The effects of Ficus carica polysaccharide on immune response and expression of some immune-related genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Shellfish Immunol.* 42(1):132–7. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.10.037>.
- Yano Y., Satomi M., Oikawa H., 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology* 111: 6-11.

- Yeh H.Y., Shoemaker C.A., Klesius P.H., 2006. Sensitive and rapid detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus* by a loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Applied Microbiology*: 100, 919-925.
- Yildirim-Aksoy M., Beck B.H., 2017. Antimicrobial activity of chitosan and a chitosan oligomer against bacterial pathogens of warmwater fish. *J Appl Microbiol.* 122(6):1570–8. <https://doi.org/10.1111/jam.13460>.
- Yoon J.H., Park S., Kang S.J., Oh S.J., Myung S.C., Kim W., 2011. *Flavobacterium ponti* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 61, 1, 81-5.

Z.

- Zaika L.L., 1988. Spices and Herbs - Their antimicrobial activity and its determination. *J Food Safety*; 9(2): 97-118.
- Zhang J., Chiang F.I., Wu L., Czyryca P.G., Li D., Chang C.W.T., 2008. Surprising Alteration of Antibacterial Activity of 5"-modified neomycin against resistant bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry* **51**: 7563-7573.
- Zhang J., Jiang R.B., Zhang X.X., Hang B.J., He J., Li S.P., 2010. *Flavobacterium haoranii* sp. nov., a cypermethrin-degrading bacterium isolated from a wastewater treatment system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 60, 12, 2882-2886.
- Zhang C., Li D.-L., Chi C., Ling F., Wang G.-X., 2015. Dactylogyrus intermedius parasitism enhances *Flavobacterium columnare* invasion and alters immune-related gene expression in *Carassius auratus*. *Dis Aquat Org* 116(1):11–21. <https://doi.org/10.3354/dao02902>.
- Zhang Y., Zhao L., Chen W., Huang Y., Yang L., Sarathbabu V., 2017. Complete genome sequence analysis of the fish pathogen *Flavobacterium columnare* provides insights into antibiotic resistance and pathogenicity related genes. *Microb Pathog.* 111: 203–11. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.035>. Information on the gene-based interactions between the fish host and the pathogen *F. columnare* are provided
- Zhao H., Li C., Beck B.H., Zhang R., Thongda W., Davis D.A., 2015. Impact of feed additives on surface mucosal health and columnaris susceptibility in channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. *Fish Shellfish Immunol.* 46(2):624–37. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.005>.
- Zhu W., Yang G., Zhang Y., Yuan J., An L., 2012. Generation of biotechnology-derived *Flavobacterium columnare* ghosts by PhiX174 gene E-mediated inactivation and the potential as vaccine candidates against infection in grass carp. *Biomed Res Int.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/760730>.
- Zamora L., Fernández-Garayzábal J.F., Svensson-Stadler L.A., Palacios M.A., Domínguez L., Moore E.R., Vela A.I., 2012a. *Flavobacterium oncorhynchi* sp. nov., a new species isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Systematic and Applied Microbiology*: 35, 2, 86-91.
- Zamora L., Vela A.I., Palacios M.A., Sánchez-Porro C., Svensson-Stadler L.A., Domínguez L., Moore E., Ventosa A., Fernández-Garayzábal J.F., 2012b.

Chryseobacterium viscerum sp. nov., isolated from diseased fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 35, 1, 24-29.

- Zamora L., Fernández-Garayzábal J.F., Palacios M.A., Sánchez-Porro C., Svensson-Stadler L.A., Domínguez L., Moore E.R.B., Ventosa A., Vela A.I., 2012c. *Chryseobacterium oncorhynchi* sp. nov., isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Systematic and Applied Microbiology*: 35, 1, 24-29.

- Zamora L., Vela A.I., Sanchez-Porro C., Palacios M.A., Moore E.R.B., Dominguez L., Ventosa A., Fernandez-Garayzabal J.F., 2013. *Flavobacterium tructae* sp. nov. and *Flavobacterium piscis* sp. nov., isolated from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 2), 392–399. doi:10.1099/ijms.0.056341-0

- Zamora-Cristales R., Boston K., Sessions J., Murphy G., 2013. Stochastic simulation and optimization of mobile chipping economics in processing and transport of forest biomass from residues. *Silva Fennica* 47 (5) article id 937. <https://doi.org/10.14214/sf.937>.