

Année 2018

**UTILISATION DE L'EXTRAIT DE
PLANTES FRAÎCHES STANDARDISÉ
DE *CUPRESSUS SEMPERVIRENS*
(CYPRÈS TOUJOURS VERT) COMME
VIRUCIDE LORS DE MALADIES
RESPIRATOIRES DES BOVINS**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

le 31 octobre 2018

par

Amandine Marie Laurence PRÉLOT-CLAUDON

Née le 14 janvier 1993 à Nancy (Meurthe-et-Moselle)

JURY

Président : Pr. CHOUAID

Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL

Membres

Directeur : Pr Yves MILLEMANN

Professeur à l'ENVA

Co-Directeur : Dr Sébastien PERROT

Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : Dr Fabienne CONSTANT

Maître de conférences à l'ENVA

Invités : Isabelle GUINOBERT et Claude FAIVRE

Directeur : M. le Professeur Christophe Degueurce
 Directeur des formations : Pr Chateau Henry
 Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin
 Directeurs honoraires : MM. les Professeurs Charles Pilet, Bernard Toma, André-Laurent Parodi,
 Robert Moraillon, Jean-Pierre Cotard, Jean-Paul Mialot & Marc Gogny

Liste des membres du corps enseignant

Département d'élevage et de pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

Unité pédagogique de cardiologie - Pr Chetboul Valérie* - Dr Gkouli Vassiliki, Praticien hospitalier Unité pédagogique de clinique équine - Pr Audigé Fabrice - Dr Berton Lélia, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Maître de conférences contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoux Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier* - Dr Molroud Claire, Praticien hospitalier Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale - Dr Bencheikroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guilbert Morgane, Maître de conférences contractuelle - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences	Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport - Dr Cléro Delphine, Maître de conférences - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelman Nicolas, Maître de conférences Unité pédagogique de pathologie chirurgicale - Pr Fayolle Pascal - Dr Mailhac Jean-Marie, Maître de conférences - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique* Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs - Dr Verwaerde Patrick, Maître de conférences (convention EnvT) - Dr Zilberstein Luca, Maître de conférences Discipline : ophtalmologie - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences Discipline : nouveaux animaux de compagnie - Dr Pignon Charly, Praticien hospitalier
---	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments - Pr Augustin Jean-Christophe* - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Carlier Vincent Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Praud Anne, Maître de conférences - Dr Rivière Julie, Maître de conférences Unité pédagogique de pathologie des animaux de production - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier	Unité pédagogique de reproduction animale - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Aline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Dr Leroy-Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Ponter Andrew - Dr Wolgast Valérie, Praticien hospitalier
---	--

Département des sciences biologiques et pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Dr Desquilbet Loïc - Adjoint : Pr Pilot-Storck Fanny

Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques - Dr Boissady Emilie, Maître de conférences contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoux Nathalie - Pr Robert Céline* Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie - Pr Boulois Henri-Jean - Pr Elloit Marc - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences * Unité pédagogique de biochimie - Pr Bellier Sylvain* - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier - Dr Michaux Jean-Michel, Maître de conférences Discipline : éducation physique et sportive - M. Phillips Pascal, Professeur certifié Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences*	Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Dr Desquilbet Loïc, Maître de conférences (Biostatistique, Épidémiologie) - Dr Fournel Christelle, Maître de conférences contractuelle (Gestion et management)* - Dr Marignac Geneviève, Maître de conférences Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Cochet-Falvre Noëlle, Praticien hospitalier (rattaché au DEPEC) - Dr Darmon Céline, Maître de conférences contractuelle (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Verónica, Maître de conférences Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie - Dr Kohlhauser Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Éthologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Turet Laurent (Physiologie, Pharmacologie)*
---	---

* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émérites :

Mmes et MM. : Bénét Jean-Jacques, Chermette René, Combrisson Hélène, Enriquez Brigitte, Niebauer Gert, Panthier Jean-Jacques, Paragon Bernard.

REMERCIEMENTS

À Monsieur/Madame le professeur de la faculté de médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux

À Monsieur le Professeur Yves Millemann,

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté la direction de cette thèse,

Pour son écoute, sa disponibilité et ses précieux conseils qui ont permis l'élaboration de cette thèse.

Hommage reconnaissant.

À Monsieur le Docteur Sébastien Perrot,

Maître de conférence à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté la direction de cette thèse,

Pour ses corrections et ses intéressantes explications sur la phytothérapie qui ont d'enrichi ce travail.

Hommage reconnaissant.

À Madame la Docteure Fabienne Constant,

Maître de conférence à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté d'être notre assesseuse de thèse.

Sincères remerciements.

À Monsieur le Docteur Claude Faivre,

Vétérinaire du laboratoire Wamine,

Pour nous avoir proposé ce sujet de thèse passionnant.

Sincères remerciements.

À Madame Isabelle Guinobert,

Chargée de recherches du laboratoire Pilege,

Pour ses conseils avisés, sa gentillesse et ses corrections.

Sincères remerciements.

À Mesdames Laïla Haddioui et Haouria Belkhelfa,

Pour votre accueil dans votre laboratoire de Toulouse, vos explications et votre temps.

Sincères remerciements.

À ma Sœur, Anaïs,

Puisses-tu continuer à briller dans la voie que tu as choisie, bientôt, tu seras une autre Docteure dans la famille.

Je suis fière de toi.

À ma Maman,

Mon modèle, qui m'a permis de réaliser mon rêve professionnel et m'a toujours soutenue,
Merci.

À mon Papa,

Pour son soutien et ses enseignements,
Merci

À mes Grands-Parents,

Qui ont toujours été là, je ne les remercierai jamais assez.

À Tom,

Merci d'être présent dans ma vie.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE	13
Première partie : Le plan EcoAntibio en médecine vétérinaire	15
1. Motivation et histoire du plan EcoAntibio	17
1.1 La résistance bactérienne aux antibiotiques.....	17
1.2 Le plan EcoAntibio 1 : buts et enjeux	19
2. Premier bilan et situation actuelle	21
2.1 Les mesures mises en place	21
2.2 La LAAAF (Loi d'Avenir pour l'Agriculture, l'Alimentation et la Forêt).....	23
2.3 Les résultats sur l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire	24
2.4 Les résultats sur les résistances bactériennes.....	25
3. Evolution possible dans le futur	26
3.1 Le plan EcoAntibio 2	26
3.2 Qu'en est-il des médecines complémentaires ?	26
Deuxième partie : Les maladies respiratoires des bovins	29
1. Etiologie des maladies respiratoires bovines	32
1.1 Les parasites	33
1.2 Les broncho-pneumonies infectieuses enzootiques	33
1.2.1 Les bactéries	34
1.2.2 Les virus	37
1.3 Les pneumonies interstitielles.....	39
2. Diagnostic des broncho-pneumonies infectieuses enzootiques.....	40
2.1 Diagnostic clinique	40
2.2 Diagnostic en laboratoire	40
2.2.1 Prélèvements réalisables.....	41
2.2.2 Mise en évidence indirecte	42
2.2.3 Mise en évidence directe	43
3. Lutte contre les BPIE.....	46
3.1 Traitement.....	46
3.1.1 Gestion de l'inflammation et de la douleur	46
3.1.2 Antibiothérapie	47
3.2 Gestion des facteurs de risque	48
3.3 Vaccination	49

Troisième partie : La phytothérapie et l'utilisation de <i>Cupressus sempervirens</i> ou Cyprès toujours vert.....	51
1. La phytothérapie, principe et généralités	53
1.1 Histoire et principe	53
1.1.1 La phytothérapie au cours du temps.....	53
1.1.2 La phytothérapie aujourd'hui.....	54
1.1.3 L'approche phytothérapeutique	55
1.2 Les produits phytothérapeutiques	56
1.2.1 Définitions	56
1.2.2 Formes galéniques utilisées en phytothérapie	57
1.3 La phytothérapie en médecine vétérinaire.....	60
1.3.1 Le renouveau de la phytothérapie, pour les animaux aussi.....	60
1.3.2 Formation des vétérinaires à la phytothérapie.....	61
1.3.3 Bilan sur la phytothérapie en médecine vétérinaire aujourd'hui	63
1.4 La réglementation sur l'utilisation de la phytothérapie.....	63
1.4.1 Réglementation sur l'usage des médicaments vétérinaires	63
1.4.2 Obtention d'un dossier d'AMM.....	64
1.4.3 Cas des médicaments à destination des animaux d'élevage	64
1.4.4 Problématique de la phytothérapie	64
1.4.5 Position actuelle de l'Anses - ANMV	65
1.4.6 Commercialisation des produits à base de plantes.....	65
2. L'étude de la phytothérapie	67
2.1 Une méthode utilisée pour l'allopathie non applicable à la phytothérapie	67
2.2 Une étude basée sur les données bibliographiques existantes	68
3. La phytothérapie et la pathologie respiratoire en médecine vétérinaire	70
3.1 Intérêt et limites de la phytothérapie en pathologie respiratoire	70
3.1.1 Gravité de la maladie.....	70
3.1.2 Importance des paramètres d'ambiance	70
3.2 Les solutions proposées dans la littérature.....	71
3.3 Les preuves scientifiques.....	72
4. Le Cyprès toujours vert (<i>Cupressus sempervirens</i>) et son utilisation en phytothérapie... 74	
4.1 Effets recherchés historiquement	75
4.2 Rapide rappel : mode d'action des virus	75
4.3 Composition chimique de l'extrait de Cyprès et molécules d'intérêt.....	76

4.3.1	Etude de la composition chimique	76
4.3.2	Famille des tanins	77
4.3.3	Absorption des proanthocyanidines (PAC) par l'organisme	78
4.4	Effet de l'extrait de Cyprès sur les organismes vivants	79
4.4.1	Cytotoxicité du Cyprès.....	79
4.4.2	Activité protectrice du tissu conjonctif	80
4.4.3	Activité antivirale <i>in vitro</i>	80
4.4.4	Activité antivirale <i>in vivo</i>	81
4.4.5	Activité des proanthocyanidines sur les organismes biologiques.....	81
4.4.6	Mécanisme de la propriété antivirale des PAC	83
TRAVAIL EXPÉRIMENTAL		85
Première partie : Etude <i>in vitro</i> , test de virucidie		87
1.	Contexte et objectif	89
2.	Matériel et méthode	90
2.1	Mise en place du test	90
2.2	Matériel	90
2.2.1	Intérêt des virus testés	90
2.2.2	Extrait testé	90
2.2.3	Virus et cellules utilisés	91
2.3	Principe du test de virucidie	91
2.3.1	Le titrage viral	91
2.3.2	Cytotoxicité du produit à tester : extrait de Cyprès à 80%	92
2.3.3	Validations du test.....	92
2.4	Interférence de l'éthanol.....	94
3.	Résultats	94
3.1	Validation des tests selon la norme	94
3.2	Impact de l'extrait sur le titre viral.....	94
3.2.1	Activité contre le VRSB	94
3.2.2	Activité contre BoHV-1	95
3.2.3	Conclusion des tests de virucidie <i>in vitro</i>	95
4.	Discussion	95
5.	Conclusion	96
Deuxième partie : Étude terrain par questionnaire		97
1.	Contexte et objectif	99

2. Matériel et méthode	99
2.1 Population de l'étude	99
2.2 Élaboration du questionnaire	100
2.3 Collecte des données	100
2.4 Gestion des données	100
3. Résultats	100
3.1 Taux de réponse	100
3.2 Les vétérinaires utilisant la phytothérapie et leur clientèle	101
3.2.1 Région d'exercice et clientèle	101
3.2.2 Les vétérinaires	103
3.3 Utilisation de la phytothérapie	104
3.3.1 Origine de l'utilisation par la vétérinaire	104
3.3.2 Utilisation de la phytothérapie dans la clientèle	106
3.3.3 Les vétérinaires et la réglementation autour de la phytothérapie	107
3.4 Utilisation de l'EPS Cyprès	109
3.4.1 Objectif lors de l'usage de cet EPS	110
3.4.2 Modalités d'utilisation	111
3.5 Intérêts et limites de l'usage de l'EPS de Cyprès	116
3.5.1 Effets secondaires	116
3.5.2 Évaluation de l'efficacité	117
4. Discussion	118
4.1 Méthode	118
4.1.1 Population étudiée	118
4.1.2 Collecte des données	118
4.2 Taux de réponse	118
4.3 Réponses au questionnaire	118
4.3.1 Les vétérinaires utilisant la phytothérapie et leur clientèle	118
4.3.2 Utilisation de la phytothérapie	120
4.3.3 Utilisation de l'EPS Cyprès	121
4.3.4 Intérêt et limite lors de l'usage de cet EPS	123
5. Conclusion de l'étude du questionnaire	124
CONCLUSION GÉNÉRALE	125

Bibliographie.....	127
Annexe 1 : Réponses des étudiants au questionnaire	133
Annexe 2 : Exemple de calcul de la concentration d'une suspension virale	134
Annexe 3 : Questionnaire envoyé aux vétérinaires.....	136

Liste des figures

Figure 1 : Prévision par O'NEILL si aucune mesure n'est mise en place pour lutter contre l'antibiorésistance (AMR : AntiMicrobial Resistance)	18
Figure 2 : Campagne de sensibilisation des propriétaires d'animaux de compagnie	21
Figure 3 : Plaquette de sensibilisation à destination des éleveurs	22
Figure 4 : Evolution de l'ALEA de 1999 à 2015 source : Synthèse EcoAntibio 2012-2016	24
Figure 5 : Evolution des proportions de souches de E. coli non-sensibles au ceftiofur Source : (ANSES et al., 2017).	25
Figure 6 : Répartition des destinations des antibiotiques chez les Ruminants (source : Utilisation des antibiotiques chez les Ruminants, ANSES).	31
Figure 7 : Evolution de la flore microbienne pulmonaire au cours d'une BPIE (source : Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).	41
Figure 8 : Procédé d'extraction phytostandard Source : "point sur la qualité des EPS..." - A. Dessouroux.....	59
Figure 9 : Bilan des réponses au questionnaire rapide sur l'intérêt que portent les étudiants de 1�re, 2�me, 4�me et 5�me années de l'ENVA à la phytothérapie. Les pourcentages sont calculés par rapport au nombre d'étudiants sondés.	62
Figure 10 : Cyprès toujours vert, parc Lecoq, Clermont-Ferrand.....	74
Figure 11 : Partie haute du Cyprès (source : Wikipédia).	74
Figure 12 : Effet d'un antiviral selon le stade du cycle de réplication virale (inspiré de Clément, 1993).....	76
Figure 13 : Structure chimique de la catéchine (source Wikipédia, « Catéchine », 2018).....	78
Figure 14 : Fixation des tanins sur le virus VHS-1 (source : Clément, 1993) V : virus VHS-1 à : bille d'or.....	82
Figure 15 : Schéma du principe du test de virucidie (adapté de la thèse de Chloé Geller (Geller, 2010)).	93
Figure 16 : Résultats de la réduction logarithmique de la DICT50 pour le VRSB suite à l'action de l'extrait de Cyprès.....	94
Figure 17 : Résultats de la réduction logarithmique de la DICT50 pour le BoHV-1 suite à l'action de l'extrait de Cyprès.....	95
Figure 18 : Publications scientifiques traitant de la phytothérapie en fonction des années (base de recherche : PubMed).....	99
Figure 19 : Répartition régionale des vétérinaires répondants.....	101
Figure 20 : Pourcentage d'activité en médecine bovine chez les vétérinaires sondés.	102
Figure 21 : Pourcentage d'activité en secteur laitier parmi la clientèle bovine des vétérinaires sondés.	102
Figure 22 : Ecole d'origine des vétérinaires sondés.	103
Figure 23 : Nombre de vétérinaires sortis de l'�cole par période.....	103
Figure 24 : Les différentes formations suivies par les vétérinaires répondants.	104
Figure 25 : Répartition des vétérinaires selon leur durée de pratique de la phytothérapie.	104
Figure 26 : Raisons ayant poussé les vétérinaires à pratiquer la phytothérapie	105
Figure 27 : Pourcentages d'éleveurs intéressés par la phytothérapie selon les vétérinaires interrogés.	106

Figure 28 : Pourcentages d'éleveurs utilisant la phytothérapie dans leur élevage dans la clientèle des vétérinaires interrogés.....	106
Figure 29 : Proportion d'élevages biologiques parmi ceux qui utilisent la phytothérapie, dans chaque clientèle.	107
Figure 30 : Perception du statut réglementaire des traitements phytothérapeutiques par les vétérinaires.....	107
Figure 31 : Avis des vétérinaires sur le statut des traitements phytothérapeutiques.	107
Figure 32 : Nombre de vétérinaires prescrivant chaque temps d'attente pour l'EPS de Cyprès.	108
Figure 33 : Pourcentage de vétérinaires utilisant ou non l'EPS de Cyprès parmi les vétérinaires sondés	109
Figure 34 : Zone de l'organisme visée par le traitement.....	110
Figure 35 : Effets sur l'organisme attendus.....	110
Figure 36 : Résultats d'analyses positives pour ces pathogènes avant un traitement avec l'EPS de Cyprès.....	111
Figure 37 : Quantité d'EPS administrée à chaque prise (en millilitre).....	112
Figure 38 : Nombre de jours de traitement.	112
Figure 39 : Nombre d'administrations par jour.....	112
Figure 40 : Raisons ayant motivé la prescription de la posologie choisie.	112
Figure 41 : Nombre de vétérinaires utilisant l'extrait de Cyprès seul ou en mélange.	113
Figure 42 : Les différents EPS mélangés avec l'EPS de Cyprès selon le nombre de vétérinaires les utilisant.	113
Figure 43 : Utilisations d'autres médecines alternatives par les vétérinaires, en association avec l'EPS de Cyprès.	114
Figure 44 : Raisons pour lesquelles le traitement allopathique est prescrit, en nombre de vétérinaires ayant choisi la réponse.....	115
Figure 45 : Pourcentage de vétérinaires prescrivant, ou non, un traitement allopathique en association avec l'EPS de Cyprès.	115
Figure 46 : Nature du traitement allopathique prescrit, en nombre de vétérinaires ayant choisi la réponse parmi les 48 vétérinaires utilisant l'EPS de Cyprès.....	116
Figure 47 : Effets observés suite à l'administration d'EPS de Cyprès.....	117
Figure 48 : Évaluation de l'efficacité de l'EPS de Cyprès par les 48 vétérinaires l'utilisant. ..	117
Figure 49 : Comparaison des pourcentages de vétérinaires ayant répondu au questionnaire et de vaches présentes dans chaque région française. Source : FranceAgriMer, 2010.....	119
Figure 50 : Réponses des première, deuxième quatrième et cinquième années au questionnaire à propos de leur intérêt pour la phytothérapie (Nombre de répondants ; pourcentage)	133
Figure 51 : Réponses des étudiants de cinquième année	133
Figure 52 : Réponses des étudiants de quatrième année	133
Figure 53 : Réponses des étudiants de deuxième année	133
Figure 54 : Réponses des étudiants de première année	133
Figure 55 : Exemple d'une plaque 96 puits et son organisation pour les tests de virucidie. .	134
Figure 56 : Exemple de résultat d'un titrage viral	135

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de Lekeux selon les symptômes et le taux sanguin de L-lactate, recommandations de traitement.....	46
Tableau 2 : Résumé des différentes formes galéniques utilisées en phytothérapie d'après (Christophe, 2014 ; Létard <i>et al.</i> , 2015).	58
Tableau 3 : Voies d'administration possibles pour la phyto-aromathérapie en cas d'atteinte respiratoire (Pelt, 2002 ; Ventéjou, 2016 ; Labre, 2017).....	71
Tableau 4 : Quelques plantes utilisées en phytothérapie lors d'atteinte respiratoire et leurs propriétés (d'après Ventéjou, 2016 ; Labre, 2017).	72
Tableau 5 : Propriétés démontrées des plantes (Ayrle <i>et al.</i> , 2016).....	73

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALEA : Animal level of exposure to antimicrobials
ANMV : Agence Nationale du Médicament Vétérinaire
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN : Acide ribonucléique
ATTC : American Type Culture Collection (banque de cellules et pathogènes)
BoHV-1 (BHV-1) : Bovine herpesvirus 1 / Herpèsvirus bovin de type 1
BPIE : Broncho-pneumonie Infectieuse Enzootique
BVD/BVDV : Bovine viral diarrhea (Diarrhée virale bovine) / Bovine viral diarrhoea virus (Virus de la BVD)
EFSA : European food safety authority
ENVA : École nationale vétérinaire d'Alfort
EPS : Extrait de plantes fraîches standardisé
GTV : Groupement technique vétérinaire
H. somni : *Histophilus somni*
HIV : Virus de l'immunodéficience humaine
HTLV : virus T-lymphotropique humain
IBR : Rhinotrachéite infectieuse bovine
IPI : Infecté permanent immunotolérant
LAAAF : Loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt
M. haemolytica : *Mannheimia haemolytica*
MAC : Médecines alternatives et complémentaires
P. multocida : *Pasteurella multocida*
PAC : proanthocyanidines (tanins condensés)
PCR : Réaction en chaîne par polymérase
Résapath : Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales
SIPF : Suspension intégrale de plantes fraîches
SS : Suspension virale secondaire
Subsp : subspecies
VHS-1 (-2) : Virus de l'herpès simplex - 1 (-2)

INTRODUCTION

L'élevage des bovins fait partie intégrante de la culture française. Partout sur notre territoire se trouvent des exploitations destinées à leur élevage que ce soit pour la production de lait et/ou de viande. Selon les chambres d'agriculture françaises (France, 2017), en 2014, on comptait 19 250 000 têtes tous bovins confondus. Bien que le nombre de bovins en France soit en déclin depuis les années 1970, ce chiffre reste conséquent. En parallèle, la production laitière augmente depuis les années 1970 jusqu'à atteindre 24,6 milliards de litres pendant l'année 2014. La filière bovine a donc toute son importance dans l'économie française en particulier pour les 180 000 éleveurs bovins en 2012.

L'importance de la médecine vétérinaire bovine est évidente, tant pour le bien-être animal, que pour l'économie de la filière bovine et pour la santé publique puisque les denrées produites sont destinées à la consommation humaine. Les bovins sont concernés par de nombreuses entités pathologiques. Parmi celles-ci, la pathologie respiratoire représente une part importante des consultations vétérinaires en élevage, tant sur les adultes que les jeunes.

Le traitement des maladies respiratoires repose surtout sur l'antibiothérapie ; or depuis plusieurs années, l'usage historique des antibiotiques a été remis en cause. Une prise de conscience du développement de l'augmentation de l'antibiorésistance a conduit à la mise en place du premier plan EcoAntibio en France. Dans ce cadre, les vétérinaires ont été invités à réduire l'usage des antibiotiques en particulier en élevage.

La recherche autour de nouvelles thérapeutiques ou de moyens de prévention est de ce fait en pleine expansion. Cela pourrait aider les vétérinaires à enrichir leur arsenal thérapeutique et prophylactique tout en diminuant leur prescription d'antibiotiques. La phytothérapie, une médecine traditionnelle basée sur l'usage des plantes, semble être une alternative ou du moins un complément intéressant aux traitements existants. Les composés issus des plantes ont des activités variées sur les organismes vivants. Dans ce travail, nous nous intéresserons à cette médecine en plein essor et plus particulièrement aux propriétés de l'extrait de cônes de Cyprès. En effet, les extraits de cette plante sont historiquement connus pour avoir de nombreuses propriétés et en particulier un effet sur l'appareil respiratoire. Des études récentes s'intéressent à leur effet vis-à-vis des virus.

Nous avons donc décidé de mener ce travail, qui a pour objectif d'étudier, dans le cadre du plan EcoAntibio actuellement en place, l'intérêt thérapeutique de l'extrait de plantes fraîches standardisé de Cyprès pour lutter contre la pathologie respiratoire bovine d'origine virale.

Dans ce but, la dernière étude réalisée sur les propriétés virucides de l'extrait de Cyprès sera abordée dans la partie expérimentale de cette thèse. Un questionnaire adressé aux vétérinaires sur leur usage du Cyprès en phytothérapie accompagnera ces résultats. Mais avant, une partie bibliographique permettra de résumer les connaissances actuelles concernant le Cyprès en phytothérapie après avoir abordé le plan EcoAntibio et surtout la pathogénie et le traitement des maladies respiratoires chez les bovins.

TRAVAIL BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie :
Le plan EcoAntibio en médecine vétérinaire

L'usage des antibiotiques fait partie intégrante de la médecine. Cependant, l'usage d'antibiotiques conduit toujours à la sélection, inévitable, de bactéries résistantes à ces molécules, suivie de leur diffusion. L'apparition des résistances est amplifiée si ces molécules sont trop et mal utilisées. Or, ces résistances peuvent entraîner des échecs thérapeutiques en raison de l'inefficacité de certaines molécules antibiotiques. Par ailleurs ces résistances acquises en élevage, peuvent ensuite être transmises à des bactéries humaines et diffuser chez l'homme. C'est suite à la prise de conscience de l'importance de l'antibiorésistance que le plan EcoAntibio a été mis en place en France.

1. Motivation et histoire du plan EcoAntibio

En 2011, le plan national d'alerte (Ministère de la santé, 2011) sur les antibiotiques utilisés en médecine humaine a été publié. Il fait suite à deux plans (2001-2005 et 2007-2010) « qui visaient à maîtriser et rationaliser la prescription des antibiotiques ». Ces plans ont eu pour objectif de faire face à la menace de santé publique qui peut être provoquée par un mauvais usage des antibiotiques. En effet, ces molécules, bactériostatiques ou bactéricides, peuvent, suite à un usage raisonné ou non, conduire à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques. La diffusion de ces bactéries résistantes peut alors entraîner des échecs thérapeutiques face aux infections bactériennes. Malgré une prise de conscience de ce risque au début des années 2000, la prévalence des résistances aux antibiotiques a augmenté pendant une dizaine d'années. L'état promet donc une « juste utilisation des antibiotiques » selon une stratégie en trois axes à l'origine visant à une efficacité dans la prise en charge des patients, à préserver les antibiotiques existants et leur efficacité et enfin à valoriser la recherche pour trouver de nouvelles solutions pour traiter ou éviter les affections bactériennes. Dans ce cadre national, la médecine vétérinaire est tout autant concernée. En effet, comme ceux qui ont été définis pour la médecine humaine, des plans appelés « EcoAntibio » ont été mis en place par le Ministère de l'Agriculture. Ils concernent tous les acteurs de la filière animale, des éleveurs aux vétérinaires en passant par les propriétaires d'animaux de compagnie.

1.1 La résistance bactérienne aux antibiotiques

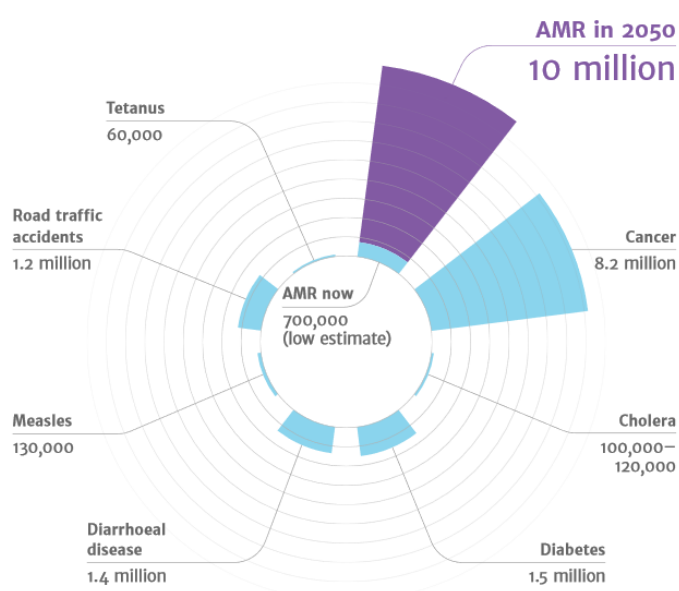
Les mécanismes de résistance ne sont pas réservés exclusivement aux bactéries. La résistance aux produits antimicrobiens au sens large existe pour les bactéries, les virus, les champignons et les parasites. On parle de résistance lorsque ces micro-organismes infectieux sont capables de survivre à l'action d'un traitement supposé les « éliminer » (O'Neill, 2016). Dès la découverte du premier antibiotique, la pénicilline, Alexander Fleming observait déjà le développement de résistances bactériennes à cette molécule lorsqu'elle était utilisée en trop faible quantité ou pendant une période trop courte. Il l'expliqua dans le New York Times en 1945 (Wright, 2005). Une étude sur des sédiments de 300 000 ans a mis en évidence la présence de gènes de résistance aux antibiotiques (D'Costa *et al.*, 2011). Ces résistances, naturellement présentes, ont vu leur prévalence augmenter dans les populations microbiennes au fil des années en conséquence d'un usage, mauvais ou non, des antibiotiques et en particulier récemment, avec la démocratisation de ces molécules. L'augmentation de leur consommation dans les pays émergents a été montrée (Klein *et al.*, 2018). Les familles de molécules antibiotiques disponibles sont limitées et la recherche n'en découvre pour le moment pas de nouvelles, d'autant plus que moins de cinq pour cent de l'investissement de la recherche et

développement de l'industrie pharmaceutique est destiné aux antimicrobiens (O'Neill, 2016). Nous sommes donc face à un ennemi grandissant avec un arsenal thérapeutique se réduisant. Trois importantes conséquences, selon O'Neill (2016), sont en découlent :

- la baisse de l'efficacité des molécules à notre disposition dans la lutte contre les maladies infectieuses bactériennes comme la pneumonie,
- la baisse de l'efficacité des molécules à notre disposition pour la prévention ou le traitement des infections conséquentes du traitement contre le cancer ou encore
- la baisse de l'efficacité des molécules à notre disposition pour prévenir les infections susceptibles d'émerger lors de chirurgies de plus en plus poussées (césariennes ou transplantations) qui sont classiques aujourd'hui et à faible risque grâce à notre capacité à limiter les infections bactériennes. Chaque année, des personnes meurent suite à des maladies infectieuses que les médecins ne peuvent pas traiter faute de molécule efficace : O'Neill estime ce chiffre à 700 000 personnes par an au minimum. Les antibiotiques sont au cœur de ce problème (Figure 1).

Les docteurs vétérinaires ont un rôle à jouer dans cette menace de santé publique. D'abord, les vétérinaires ruraux ont un rôle vis-à-vis des consommateurs puisque les produits et notamment la viande des animaux qu'ils soignent sont destinés à la consommation humaine. De plus, les animaux et les hommes partageant certaines bactéries et de fait certains antibiotiques (ou plutôt familles d'antibiotiques), les résistances créées chez les animaux peuvent affecter l'homme. Chez l'homme déjà, des bactéries multi résistantes aux antibiotiques, voire résistantes à toutes les familles d'antibiotiques connues, ont déjà été isolées (Lowy, 2007). Si l'on conserve uniquement le point de vue de la santé animale, si les résistances bactériennes entraînent une inefficacité de la majorité des antibiotiques disponibles, les vétérinaires ne seront plus en mesure à terme de soigner certaines maladies.

Figure 1 : Prévission par O'NEILL si aucune mesure n'est mise en place pour lutter contre l'antibiorésistance (AMR : AntiMicrobial Resistance)



1.2 Le plan EcoAntibio 1 : buts et enjeux

Les premiers plans mis en place étaient destinés à la médecine humaine (voir plus haut) mais en 2012 le ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt publie le « plan EcoAntibio 1 » (Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, 2016) visant à réduire l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire avec des objectifs chiffrés sur cinq ans. L'existence d'un tel plan en médecine vétérinaire se justifie par l'importance qu'ont les antibiotiques tant pour les hommes que pour les animaux.

Deux objectifs sont inscrits dans ce plan :

- D'abord, la réduction de 25% en cinq ans de l'exposition des animaux aux antibiotiques en se basant sur l'indicateur ALEA (Animal Level of Exposure to Antimicrobials), calculant le niveau d'exposition des animaux aux antibiotiques.

- Ensuite, la préservation de l'arsenal thérapeutique du vétérinaire en matière d'antibiotiques en réduisant en particulier l'usage des céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations et des

Les antibiotiques sont des molécules indispensables en médecine puisqu'elles sont actuellement les seules capables d'éliminer les bactéries. Or leur efficacité est mise en danger par l'existence de mécanismes de résistance des bactéries. Il est important de les préserver afin de garantir un arsenal thérapeutique suffisant contre les maladies bactériennes que ce soit pour l'homme ou l'animal.

fluoroquinolones.

Pour répondre à ces objectifs, cinq axes de travail ont été développés (Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, 2016) :

- « 1/ Promouvoir les bonnes pratiques et sensibiliser les acteurs
- 2/ Développer les alternatives évitant les recours aux antibiotiques
- 3/ Renforcer l'encadrement des pratiques commerciales et des règles de prescription
- 4/ Améliorer le dispositif de suivi de la consommation des antibiotiques et de l'antibiorésistance
- 5/ Promouvoir la même approche à l'échelon européen et international. »

Pour chaque axe, un certain nombre de mesures a été rédigé. Le plan EcoAntibio 1 comptait au total 40 mesures, toutes développées dans une « fiche action » disponible sur internet. (« Plan Antibiorésistance (EcoAntibio) : les 40 mesures EcoAntibio 2012-2017 | Alim'agri », s. d.) Chacune de ces mesures était sous la responsabilité d'un organisme défini au préalable, en accord avec ses compétences et ses moyens.

Piloté par le Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, le plan EcoAntibio a mobilisé de nombreux acteurs. Tous ont eu un rôle à jouer dans la réduction de l'utilisation et le bon usage des antibiotiques, qu'ils soient directement impliqués dans la réalisation des mesures ou non :

- Les éleveurs en tant qu'infirmiers de leurs élevages puisque c'est le plus souvent eux qui traitent leurs animaux en première intention ou qui administrent le traitement prescrit par le vétérinaire.
- Les vétérinaires et pharmaciens qui prescrivent et/ou vendent les médicaments vétérinaires.
- Les scientifiques et évaluateurs de risque pour leur expertise sur l'évolution de l'usage et des traitements.

- L'industrie pharmaceutique par des mesures financières et pour améliorer la recherche en cours.

- Les pouvoirs publics pour assurer une surveillance et des mesures améliorant la situation.

- Enfin, le public, en particulier tous les propriétaires d'animaux, par leur sensibilisation et leur compréhension.

Ainsi la protection contre cette menace de l'antibiorésistance concerne toute la population française, des patients aux médecins prescripteurs tout en passant par la médecine vétérinaire, des éleveurs aux vétérinaires eux-mêmes, sans oublier les propriétaires d'animaux de compagnie.

Le plan EcoAntibio 1 a été mis en place en 2012, pour faire place depuis 2017 au plan EcoAntibio 2.

Une prise de conscience internationale a permis la mise en place de plans visant à limiter l'émergence de résistances aux antibiotiques. En France, pour les acteurs de la médecine vétérinaire, le plan a été appelé EcoAntibio. Le premier courrait sur 5 années à partir de 2012, le deuxième a commencé en 2017.

2. Premier bilan et situation actuelle

2.1 Les mesures mises en place

Le détail des 40 mesures du plan EcoAntibio 1 étant longue, nous nous contenterons de quelques exemples choisis. Tout d'abord, pour le premier axe qui vise à sensibiliser sur l'antibiorésistance, on notera la mesure n°8 à propos de la formation des vétérinaires : « Renforcer la formation initiale des vétérinaires sur le sujet de l'antibiorésistance, notamment sur l'antibiothérapie appliquée ». Mon expérience personnelle me permet de dire que la problématique de l'antibiorésistance est bien enseignée dans les écoles vétérinaires. Par exemple, lors de travaux dirigés sur le choix des antibiotiques, le fait qu'ils soient considérés comme critiques ou non est bien précisé tout comme l'importance du respect des posologies. Pour les vétérinaires en exercice, il existe l'arrêté du 22 juillet 2015 « relatif aux bonnes pratiques d'emploi des médicaments contenant une ou plusieurs substances antibiotiques en médecine vétérinaire ». Il s'agit d'un guide rappelant la loi et donnant une ligne de conduite vis-à-vis de la prescription d'antibiotiques (*Arrêté du 22 juillet 2015 relatif aux bonnes pratiques d'emploi des médicaments contenant une ou plusieurs substances antibiotiques en médecine vétérinaire*, s. d.). Une autre mesure (n°13) vise à la sensibilisation des propriétaires : « Promouvoir le bon usage des antibiotiques auprès des propriétaires d'animaux de compagnie à travers une campagne de communication ». Cette campagne existe depuis plusieurs années et reprend le slogan de la campagne télévisée humaine (Figure 2).

L'axe 2 avait pour objectif la recherche d'alternatives. La mesure n°15, par exemple, visait à

Figure 2 : Campagne de sensibilisation des propriétaires d'animaux de compagnie

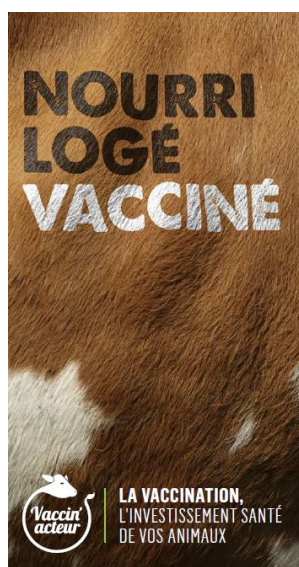


« Promouvoir la recherche dans le domaine de l'immunité et de l'utilisation de vaccins ou d'autovaccins », en effet, l'arrêté de 2003 interdisant les auto-vaccins a été abrogé par l'arrêté du 14 novembre 2016 (« Arrêté du 14 novembre 2016 relatif à la préparation des autovaccins à usage vétérinaire destinés aux ruminants | Legifrance », s. d.). Cette thérapeutique a été abordée lors des journées JNGTV (Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires) en mai 2018. Les GTV (Groupements Techniques Vétérinaires) proposent même un guide de bonnes pratiques de prescription des auto-vaccins (Boucher, 2018). La mesure n°19, elle demandait d'«évaluer le bénéfice de traitements alternatifs permettant de limiter le recours aux antibiotiques ». Or, un rapport

d'expertise a été récemment publié par l'Anses - ANMV¹ : « Etat des lieux des alternatives aux antibiotiques en vue de diminuer leur usage en élevage - *Elaboration d'une méthode d'évaluation des publications scientifiques et résultats* » (Groupe de travail « Alternatives aux antibiotiques » *et al.*, 2017). Ce rapport avait pour objectif de lister les alternatives existantes et leur usage tout en s'assurant de leur innocuité, le tout en s'appuyant sur des publications scientifiques.

L'encadrement des pratiques autour des antibiotiques a fait l'objet de l'axe 3. Citons la mesure n°25 qui demandait d'« établir la liste des antibiotiques «critiques» dont il faut prioritairement préserver l'efficacité pour l'homme ». Une première liste parue en 2013 a été réactualisée en 2015 (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), 2016). De plus, la mesure 31 visait à « renforcer le contrôle de la publicité sur les antibiotiques et promouvoir la vaccination ». La Figure 3 : Plaquette de sensibilisation à destination des éleveurs est un exemple de promotion de la vaccination.

Figure 3 : Plaquette de sensibilisation à destination des éleveurs



Ensuite, l'axe 4 avait pour objectif de suivre l'évolution de la consommation des antibiotiques et le niveau d'exposition des animaux. L'indicateur ALEA, par exemple, est calculé tous les ans par l'Anses - ANMV depuis 1999. On observe d'ailleurs une baisse notable de l'ALEA depuis le milieu des années 2000, début de la sensibilisation à l'antibiorésistance. La surveillance est aussi assurée par le réseau Résapath de l'Anses - ANMV (voir plus loin, en 2.4), ce qui répond à la mesure n°36 : « renforcer le suivi de l'antibiorésistance ».

Les mesures de l'axe 5 étaient plus compliquées à mettre en œuvre mais la France a pris une position politique à propos de l'usage des antibiotiques ne serait-ce qu'en mettant en place le plan EcoAntibio.

¹ Anses – ANMV : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail – Agence nationale du médicament vétérinaire

2.2 La LAAAF (Loi d'Avenir pour l'Agriculture, l'Alimentation et la Forêt)

La LAAAF a été votée le 13 octobre 2014. Elle impacte de nombreux codes juridiques dont le code rural et surtout le code de la santé publique. Parmi ses 96 articles, trois ont une importance particulière vis-à-vis du plan EcoAntibio. L'article 1 définit l'agroécologie, il impose la réduction de la consommation d'antibiotiques en élevage. L'article 48 modifie le code de la santé publique à propos des médicaments vétérinaires en particuliers les antibiotiques dans le cadre de la lutte contre l'antibiorésistance. Enfin, l'article 49 impose une réduction de 25% en 3 ans (de 2014 à 2016 inclus) de l'usage vétérinaire des antibiotiques dits critiques. Cette prévision s'ajoute à celle du plan EcoAntibio qui parlait de 25% de réduction de tous les antibiotiques vétérinaires sur cinq années.

Pour répondre à ces articles, des mesures législatives ont été mises en place en particulier des sanctions pénales ou non en cas de non-respect des différents articles. Citons l'interdiction de remises, rabais ou offres lors d'une vente de médicament ou de substance vétérinaire contenant des antibiotiques. En plus de cela, un décret (*Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique*, 2016) encadre désormais l'usage des antibiotiques critiques. En cas de non-respect de ces deux premières mesures, des sanctions pénales sont prévues. La loi donne un cadre législatif aux fiches et guides de bonnes pratiques des antibiotiques en médecine vétérinaire. Cette fois, la sanction n'est pas pénale mais ordinale. De plus, les antibiotiques cédés doivent obligatoirement être déclarés. Et enfin, la LAAAF prévoit une réglementation sur le recours aux antibiotiques critiques.

En pratique, lorsqu'un vétérinaire veut prescrire un antibiotique critique, il doit se plier à plusieurs règles. D'abord, la prescription des telles substances est strictement interdite à des fins prophylactiques. Ensuite, un examen clinique est indispensable à la prescription d'un antibiotique critique. Cela signifie qu'ils ne peuvent pas être prescrits dans le cadre du plan sanitaire d'élevage hors examen clinique. Enfin, la réalisation d'un antibiogramme est obligatoire avant l'usage d'un antibiotique critique à des fins curatives ou métaphylactiques : cela permet de s'assurer que la substance est suffisamment efficace contre la bactérie en cause. De plus, si l'on se fie à la notice proposée dans le « *Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique*, 2016 » il faut, pour pouvoir utiliser un antibiotique critique que les autres familles soient inefficaces. En cas d'atteinte aiguë, une dérogation existe et permet de réaliser l'antibiogramme dans les quatre jours suivant l'administration de l'antibiotique. L'usage de ces antibiotiques critiques n'est donc pas proscrit mais il doit être raisonné et justifié.

L'encadrement légal et surtout pénal que donne la LAAAF a eu un impact non négligeable sur la réduction de l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire.

Le gouvernement français a mis en place des outils visant à limiter le développement de résistances aux antibiotiques. Le plan EcoAntibio et la LAAAF donne un cadre et des objectifs à propos de l'usage des antibiotiques.

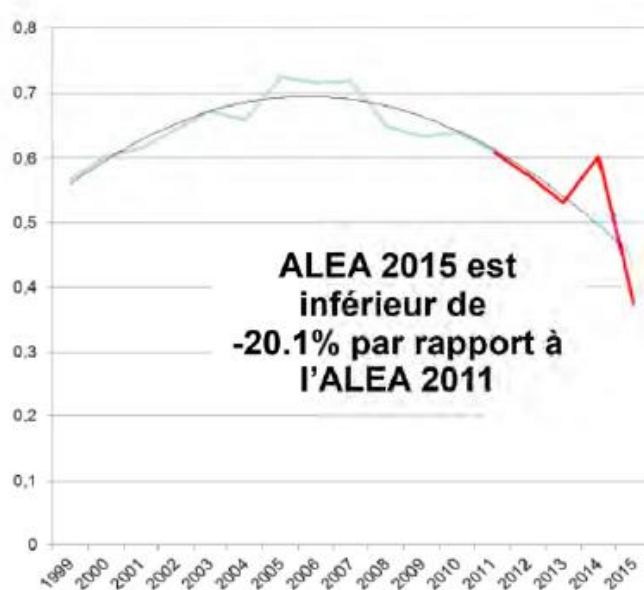
2.3 Les résultats sur l'usage des antibiotiques en médecine vétérinaire

Tous les ans, l'Anses - ANMV publie un rapport de suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques (Méheut *et al.*, 2017). L'organisme récolte des données sur les ventes, les usages, l'évolution de la population animale... Le rapport de 2017 fait le bilan de l'année 2016 et révèle ainsi les résultats finaux du plan EcoAntibio.

Une première information donnée se rapporte au tonnage de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques. Une baisse de 41,8% des ventes en tonnages est observée au cours du premier plan EcoAntibio. Cependant, cette information est très vague puisque les posologies et les activités des différents antibiotiques sont très différentes selon les molécules utilisées.

L'indicateur le plus informatif est donc l'ALEA (Figure 4). Il s'agit de mettre en rapport le pourcentage d'animaux traités avec la population animale totale ce qui renseigne sur l'exposition des animaux aux antibiotiques. L'ALEA a diminué de 36,6% pour l'ensemble des antibiotiques en cinq ans. L'objectif de 25% est donc dépassé. La LAAAF avait ajouté l'objectif de 25% de réduction de l'exposition aux antibiotiques critiques en trois ans. Or l'ALEA des céphalosporines de dernières générations a baissé de 81,3% en trois ans et celui des fluoroquinolones de 74,6%. Cet objectif aussi est rempli et même dépassé.

Figure 4 : Evolution de l'ALEA de 1999 à 2015
source : Synthèse EcoAntibio 2012-2016



En termes de réduction de l'exposition des animaux aux antibiotiques, les objectifs donnés par le plan EcoAntibio 1 sont largement remplis. Les efforts ont aussi été importants du point de vue de la sensibilisation autant auprès des vétérinaires, que des éleveurs et des propriétaires d'animaux. Les résultats de cette sensibilisation sont plus difficilement objectivables mais les campagnes de communications ont été d'une ampleur non négligeable

2.4 Les résultats sur les résistances bactériennes

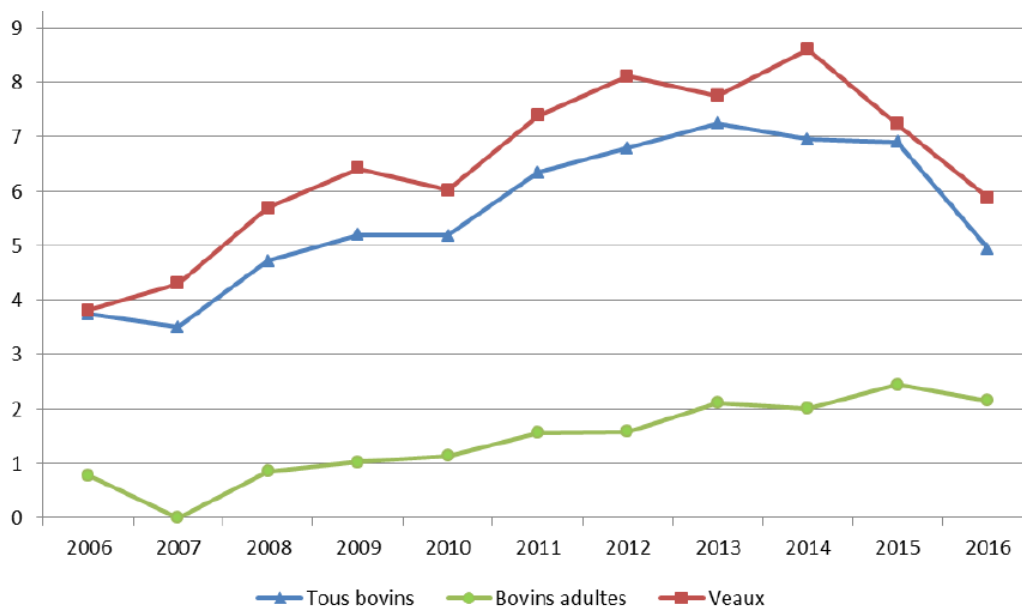
Tous les ans, le Résapath (Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) publie un rapport. Ce réseau vise à étudier l'évolution de l'antibiorésistance en France. Pour cela, il collecte les données des différents laboratoires partenaires effectuant des antibiogrammes et respectant une norme AFNOR. Depuis sa création, il y a dix ans, le réseau n'a cessé de progresser, ce qui a conduit en 2016, à la collecte de plus de 50 000 résultats d'antibiogrammes. Cela permet d'avoir un aperçu assez représentatif de l'antibiorésistance en France (Gay *et al.*, 2017).

Le rapport de 2016 correspond à la fin du plan EcoAntibio. Nous avons vu que l'exposition des animaux aux antibiotiques a été drastiquement réduite mais quel impact cela a-t-il eu sur les résistances bactériennes ? Les bactéries qui présentent le plus de résistances sont les colibacilles et les staphylocoques. Cependant, les fréquences de résistances aux antibiotiques chez les colibacilles semblent diminuer progressivement. De son côté, la proportion de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline est très faible (1-2%) et est également à la baisse.

Pour les antibiotiques critiques, la tendance côté antibiorésistance est aussi à la baisse. La fréquence de résistance aux fluoroquinolones chez les colibacilles (16,5%) reste toujours plus élevée que celle aux Céphalosporines de 3^{ème} et 4^{ème} générations (5-7%), quelle que soit l'espèce animale concernée (Figure 5). Cependant, on observe une augmentation de la sensibilité à ces antibiotiques critiques, en particulier depuis le vote de la LAAAF.

Figure 5 : Evolution des proportions de souches de *E. coli* non-sensibles au ceftiofur

Source : (ANSES *et al.*, 2017).



Si l'exposition des animaux aux antibiotiques a été réduite, le plan EcoAntibio 1 a aussi eu un effet positif sur la baisse des fréquences de résistance des bactéries aux antibiotiques.

La mise en place du plan EcoAntibio 1 et le vote de la LAAAF ont donc eu l'effet escompté : une limitation de l'antibiorésistance, voire un recul de ces résistances en réduisant l'exposition des animaux aux molécules antibiotiques.

3. Evolution possible dans le futur

3.1 Le plan EcoAntibio 2

Après le succès du plan EcoAntibio, des améliorations sont toujours possibles en matière de réduction de l'antibiorésistance. Un plan EcoAntibio 2 a donc été mis en place pour succéder au premier. L'objectif global reste le même : réduire le risque de résistances bactériennes en médecine vétérinaire en consolidant les résultats obtenus et en poursuivant les efforts. Les axes de travail, regroupant vingt actions, sont réduits au nombre de quatre (Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, 2017) :

« - Développer les mesures de prévention des maladies infectieuses et faciliter le recours aux traitements alternatifs

- Communiquer et former sur les enjeux de lutte contre l'antibiorésistance, sur la prescription raisonnée des antibiotiques et sur les autres moyens de maîtrise des maladies infectieuses

- Mettre à disposition des outils d'évaluation et de suivi du recours aux antibiotiques, ainsi que des outils pour leur prescription et administration responsables

- S'assurer de la bonne application des règles de bon usage au niveau national et favoriser leur adoption aux niveaux européen et international »

Les acteurs mobilisés sont les mêmes que pour le premier plan EcoAntibio.

3.2 Qu'en est-il des médecines complémentaires ?

L'axe n°2 du premier plan EcoAntibio portait sur les alternatives aux antibiotiques. Il s'agit d'un sujet vaste qui prend une grande ampleur dans la société. Cependant, les publications scientifiques sur ces « alternatives » aux antibiotiques sont peu nombreuses. Afin de répondre à ce manque d'informations simples et objectives sur ces traitements, l'Anses - ANMV a publié en décembre 2017 un rapport d'expertise sur l'état des lieux des alternatives existantes (Schmidely *et al.*, 2017). De nombreux acteurs de différentes origines ont participé à ce travail. Il s'agissait d'abord du recensement des traitements existants visant à réduire l'usage des antibiotiques puis d'évaluer leur innocuité et leur efficacité en se basant sur des données bibliographiques.

Dans le plan EcoAntibio 2, l'intérêt porté aux traitements alternatifs est augmenté. L'action n°2 porte uniquement sur ce point. Les objectifs de cette action sont multiples et impacte plusieurs milieux. D'abord, celui de la recherche afin de développer ces « nouveaux » traitements et de créer des références pour leur utilisation. Ensuite, il s'agit de connaître et faire évoluer la législation à propos de ces produits qui sont relativement récents pour leur usage en médecine vétérinaire. Les perspectives d'avenir pour les traitements alternatifs sont prometteuses puisqu'ils étaient déjà pris en compte dans le plan EcoAntibio 1 et ont une place de choix dans le plan EcoAntibio 2.

Le gouvernement s'implique dans la réduction des résistances bactériennes aux antibiotiques en médecine vétérinaire et s'intéresse pour cela aux médecines dites « alternatives aux antibiotiques ». Ces évolutions sont de bon augure pour l'évolution de tels traitements en médecine vétérinaire.

Le plan EcoAntibio 2 a débuté en 2017 en France, en accord avec les directives européennes. Il fait suite au plan EcoAntibio 1 qui a couru de 2012 à 2017. L'objectif est de limiter l'antibiorésistance bien qu'elle soit inévitable. Le plan propose donc une utilisation raisonnée des antibiotiques et le développement de solutions alternatives, de la phytothérapie par exemple.

Deuxième partie :

Les maladies respiratoires des bovins

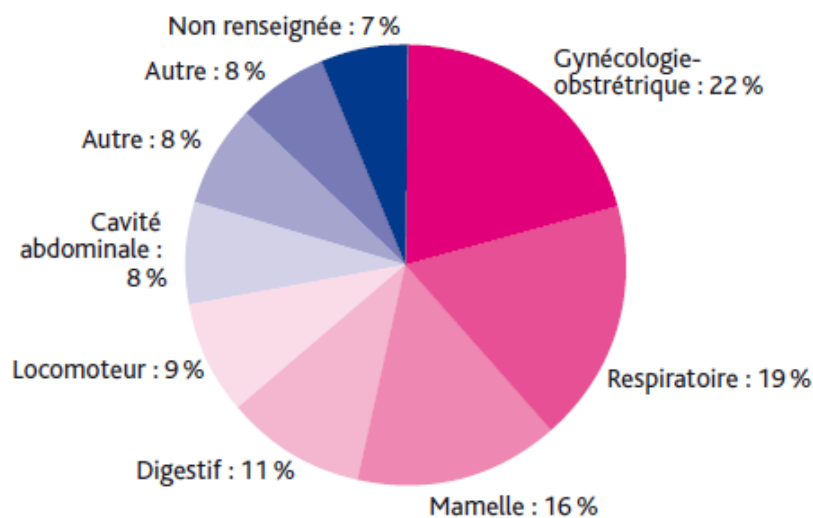
Des maladies majeures touchent les élevages, elles ont été caractérisées en élevage laitier par Barnouin et collaborateurs (Barnouin *et al.*, 1983). Chez les vaches adultes, les troubles de la reproduction sont ceux qui sont le plus souvent observés, suivis des maladies de la mamelle. On note que la pathologie respiratoire fait partie des dix catégories de maladies les plus importantes. Chez le veau, la pathologie respiratoire est la deuxième la plus représentée en élevage laitier, après les troubles digestifs. Les maladies respiratoires ont donc une place très importante en élevage bovin.

Elles provoquent des pertes économiques dues à une perte de production tant de lait que de viande avec une baisse du gain moyen quotidien (GMQ) des veaux et une augmentation du temps d'engraissement nécessaire (Bareille *et al.*, 2008). L'hyperthermie qui leur est souvent associée est susceptible d'induire des avortements. Dans des cas graves, elles peuvent aussi générer de graves séquelles respiratoires et parfois provoquer la mort de l'animal. L'enjeu pour le vétérinaire de maîtriser la pathologie respiratoire en élevage est important puisqu'elle a de grandes conséquences économiques qui comptent beaucoup pour l'éleveur.

De plus, lors d'atteintes respiratoires, une antibiothérapie est en général mise en place puisque les complications bactériennes apparaissent rapidement. Une étude a d'ailleurs montré que les maladies respiratoires étaient la deuxième cause d'usage d'antibiotiques chez les bovins après les atteintes gynécologiques d'après les vétérinaires interrogés (Gay *et al.*, 2012, Figure 6).

Figure 6 : Répartition des destinations des antibiotiques chez les Ruminants

(source : Utilisation des antibiotiques chez les Ruminants, ANSES).



L'étude des maladies respiratoires chez les bovins est donc intéressante, non seulement d'un point de vue du bien-être animal et d'un point de vue économique, mais aussi et surtout pour une réduction de l'usage des antibiotiques, en cherchant des méthodes complémentaires permettant de réduire les traitements.

1. Etiologie des maladies respiratoires bovines

Les bovins sont des animaux réputés pour être très sensibles au niveau de leur tractus respiratoire. En effet, les poumons des adultes ont une capacité de quatre litres pour cent kilogrammes de poids vif (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017). En comparaison, l'homme a une capacité pulmonaire de dix litres pour cent kilos de poids vif. De plus, la surface alvéolaire est plus faible et moins vascularisée proportionnellement aux autres animaux. Pourtant, même si la compartimentation des poumons est importante, le nombre de bronchioles est limité sans possibilité de shunt. Ainsi, lorsqu'une bronche est touchée, c'est toute une partie du poumon qui est condamnée. Aussi, les voies respiratoires supérieures telles que le pharynx, le larynx et surtout la trachée, ont un faible diamètre par rapport à la taille de ces animaux. On note aussi une longueur importante de l'arbre trachéo-bronchique, ce qui implique une augmentation de l'espace mort. Ces multiples spécificités rendent les bovins très sensibles aux atteintes respiratoires. Ainsi, par nature, ils sont considérés comme des « insuffisants respiratoires » sur le plan physiologique (Lekeux, 1991).

Une dichotomie peut se faire entre deux formes d'affections respiratoires : soit les voies respiratoires supérieures sont touchées, soit c'est l'appareil respiratoire profond, comportant les bronches, bronchioles et poumons. Nous nous intéresserons ici aux atteintes de l'appareil respiratoire profond.

Il existe de nombreux agents infectieux touchant l'appareil respiratoire profond. Ils peuvent être divisés en trois groupes selon leur étiologie : parasitaire, bactérienne et enfin, virale, sur laquelle nous nous attarderont particulièrement (Institut de l'Elevage (Paris), 2008). Il est important de garder à l'esprit que, malgré des étiologies variées, après quelques temps, les symptômes respiratoires sont surtout dus à l'inflammation provoquée par les pathogènes.

Il existe trois types de pneumonies, *i.e.* atteintes de l'appareil respiratoire profond. D'abord, les plus courantes, les broncho-pneumonies infectieuses enzootiques (ou BPIE) qui sont liées à une rupture d'équilibre entre le système immunitaire de l'hôte et la pression infectieuse liée au logement, à la densité animale... Elles peuvent donc être déclenchées par différents facteurs. Le stress, par exemple, provoque une baisse d'immunité non spécifique favorisant l'apparition de BPIE. Pour la même raison, la Diarrhée Virale Bovine (BVD) est aussi un facteur favorisant de BPIE. Des causes primaires, le plus souvent virales sont susceptibles d'engendrer cette pathologie. Enfin, des bactéries opportunistes se multiplient fréquemment lorsqu'une cause primaire leur rend la tâche plus facile. Parmi les BPIE, on peut noter la pneumonie enzootique des veaux laitiers. Les différences avec la BPIE « classique » se situent dans les facteurs de risques et le développement de la maladie, cependant, les étiologies sont identiques. Ensuite, la pneumonie peut être interstitielle, elle est alors liée à une inflammation du tissu alvéolaire interstitiel. Là aussi, les étiologies sont variées. Dans ces deux cas, l'affection se fait par voie descendante. C'est-à-dire par un agent pathogène qui atteint les poumons *via* les voies respiratoires supérieures. Les poumons sont, dans ces deux cas, surtout touchés dans leur partie cranio-ventrale. Enfin, les pneumonies métastatiques ont, elles, une étiologie systémique. En effet, lors d'une maladie intercurrente tout à fait différente, des embolies septiques sont susceptibles de se former et d'atteindre les poumons par voie systémique. Les lésions pulmonaires n'ont alors pas de localisation préférentielle.

1.1 Les parasites

Les parasites sont souvent responsables de pneumonies à la fin de l'été ou début d'automne. En effet, les animaux se contaminent lorsqu'ils sont à l'extérieur, en contact avec les parasites. Ils touchent des animaux de tous âges, sous différentes formes de maladies. Il existe deux principaux parasites touchant l'appareil respiratoire des bovins.

Le premier, le plus fréquent, est un nématode du genre *Dictyocaulus* qui provoque une maladie appelée la dictyocaulose ou « bronchite vermineuse » ou encore « toux d'été ». Ce parasite possède un cycle de reproduction dit monoxène, c'est-à-dire qu'il n'a qu'un hôte pour toute sa vie, les bovins en l'occurrence (Unité de parasitologie ENVA, 2016).

Il existe plusieurs espèces de grands strongles de ce genre : chez les bovins, on retrouve *Dictyocaulus viviparus*. Après ingestion de larves de stade L3 par les bovins puis un passage des parasites adultes par voies systémique, le parasite se loge dans la trachée et les bronches principales. Les larves produites par les adultes remontent la trachée, sont dégluties puis excrétées dans les fèces. Le dictyocaulose touche les jeunes animaux en particulier mais est susceptible de contaminer des animaux adultes présentant un défaut d'immunité (vaches laitières hautes productrices ou en fin de gestation...). La présence de cinq cent larves de stade L3 dans l'organisme suffit à provoquer les symptômes, la dose infestante est donc faible (Unité de parasitologie ENVA, 2016).

Ensuite *Aspergillus fumigatus*, champignon du genre *Aspergillus*, est avant tout une moisissure banale de l'environnement. D'autres moisissures du genre *Aspergillus* peuvent être pathogènes mais *A. fumigatus* est le pathogène responsable de l'affection dans 90% des cas d'aspergillose. L'aspergillose la plus connue est l'aspergillose aviaire, cependant ce champignon opportuniste peut aussi infecter les bovins (Unité de parasitologie ENVA, 2016). La contamination se fait par le milieu extérieur, il n'y a pas de transmission entre les animaux. L'inoculation a fréquemment lieu par voie aérienne mais elle peut aussi se faire par voie digestive ou transplacentaire. En effet, *A. fumigatus* diffuse facilement par voie systémique.

L'aspergillose se présente sous différentes formes chez les Ruminants. Elle peut être digestive en touchant les pré-estomacs des bovins adultes, disséminée le plus souvent sans signe clinique, respiratoire ou peut provoquer des mammites lors d'inoculation par les trayons. La forme respiratoire se traduit par des signes cliniques respiratoires non spécifiques.

1.2 Les broncho-pneumonies infectieuses enzootiques

Comme vu précédemment, les broncho-pneumonies infectieuses enzootiques (BPIE) constituent l'affection respiratoire profonde la plus répandue chez les bovins. Il s'agit d'une entité clinique présentant des symptômes généraux et respiratoires non spécifiques dus à différentes étiologies. Lorsqu'un animal est atteint d'une BPIE, on note des signes généraux tels qu'un abattement marqué, une hyperthermie importante (40 à 41°C), une dysorexie voire une anorexie ainsi que des signes respiratoires comme de la dyspnée, une auscultation pulmonaire modifiée et parfois de la toux et un jetage nasal (Institut de l'Elevage (Paris), 2008 ; Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

Les BPIE sont plus fréquentes en fin d'hiver (voire début de printemps) lorsque les animaux sont regroupés à l'intérieur depuis longtemps (Ribble *et al.*, 1995 ; Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017). Elles touchent les animaux de tous âges mais en particulier les jeunes bovins à l'engraissement de moins de dix-huit mois. Les animaux de moins d'un mois sont très rarement atteints par les BPIE.

Si les symptômes et l'épidémiologie sont constants, les étiologies sont variées. Voici une monographie des différentes causes possibles de BPIE regroupées sous deux entités : les bactéries et les virus. Il faut noter que si dans les prémices de la maladie, il n'y a souvent qu'un seul agent infectieux (appelé agent primaire) en cause, rapidement les poumons peuvent être surinfectés par d'autres pathogènes. Les symptômes observés sont dus au pouvoir pathogène direct des agents infectieux mais aussi et surtout à la réaction inflammatoire que l'organisme développe suite à l'infection.

1.2.1 Les bactéries

Une bactérie est un micro-organisme unicellulaire, sans organite ni noyau, son matériel génétique est donc diffus. Sa reproduction se fait par division cellulaire. Le panel des bactéries est très large, elles peuvent être intra ou extra-cellulaires, aéro et/ou anaérobies, etc... Leur pouvoir pathogène est varié et repose parfois sur des toxines qu'elles produisent ou encore sur leur multiplication dans l'organisme et la réponse inflammatoire que cela entraîne.

Des bactéries sont naturellement présentes dans tout l'arbre respiratoire supérieur, il s'agit de la flore bactérienne commensale respiratoire. Or cette flore s'autorégule et limite le développement d'une colonie spécifique ou de bactéries pathogènes par compétition : puisque les nutriments et les sites de développement sont déjà occupés par les bactéries commensales, les bactéries pathogènes n'ont pas la possibilité de se développer (Unité pédagogique des animaux des productions ENVA, 2017).

Cependant, parfois, lors d'une rupture d'équilibre entre la pression d'infection bactérienne et l'immunité passive de l'animal, certaines bactéries colonisent les voies respiratoires. Ces bactéries provoquent alors une atteinte respiratoire profonde : une Broncho-Pneumonie Infectieuse Enzootique. Dans ce cas, les bactéries sont l'agent primaire de la BPIE. Cependant, ce développement bactérien peut être lié à une baisse d'immunité ou une baisse de l'efficacité de régulation de la flore commensale lorsqu'une autre atteinte respiratoire est déjà présente. Ainsi, même lorsque l'étiologie primaire de la BPIE n'est pas bactérienne, une surinfection bactérienne apparaît souvent dans les jours suivants l'infection.

Dans les paragraphes suivants, nous nous intéresserons aux bactéries pouvant être des causes primaires de pneumonie. Lors de cultures bactériennes en cas de pneumonie, si d'autres bactéries sont retrouvées, elles sont sans doute liées à une surinfection.

1.2.1.1 Pasteurelloses

La famille des *Pasteurellaceae* regroupe un grand nombre de bactéries à Gram négatif. Elles sont colorées en rose par la coloration de Gram et leur paroi est organisée en trois parties (Dabo *et al.*, 2007). Au sein de cette famille, trois genres jouent un rôle important dans les pneumonies bovines. Ce sont des bactéries commensales de l'arbre respiratoire, elles sont donc présentes chez les animaux sains sur les muqueuses nasales, buccales et bronchiques. Ces bactéries sont opportunistes et colonisent les poumons lors d'un défaut d'immunité lié par exemple au stress ou une atteinte respiratoire déjà présente. La contamination peut aussi se faire par voie aérienne par des colonies étrangères à l'animal, le plus souvent des animaux plus âgés aux plus jeunes. Les colonies bactériennes qui colonisent les poumons et provoquent une BPIE sont pathogènes. Cependant, les différences moléculaires entre bactéries commensales et pathogènes sont très peu connues. Elles semblent reposer en grande partie sur la capacité ou non d'induire une réponse inflammatoire par leur adhésion aux cellules de l'hôte. Plusieurs genres de *Pasteurellaceae* peuvent être des agents primaires de BPIE.

D'abord, on trouve les pasteurelles, en particulier l'espèce *Pasteurella multocida*. Il s'agit d'un coccobacille à coloration de Gram négative. Cela signifie que leur forme est ovale (entre celle du coque, rond et du bacille, en bâtonnet). Cette espèce est classée en seize sérotypes. Les sérotypes sont une

façon de distinguer les bactéries selon leurs propriétés immunologiques. Chaque sérotype possède des anticorps spécifiques dirigés contre lui. La classification des pasteurelles repose en plus sur leur biotype : A ou T. Cette lettre correspond au sucre que la bactérie est capable de fermenter, respectivement l'arabinose et le tréhalose. Ainsi, le sérotype *P. multocida* A:3 est communément isolé lors de pneumonie (quel qu'en soit le type) chez les bovins (Harper *et al.*, 2006 ; Dabo *et al.*, 2007 ; Timsit *et al.*, 2017).

P. multocida est très présente en particulier lors d'atteinte respiratoire chez les veaux laitiers. Sa prévalence est d'ailleurs actuellement supérieure à celle de *Mannheimia haemolytica*, une autre représentante des *Pasteurellaceae* (Timsit *et al.*, 2017).

Le genre *Mannheimia* est le second le plus impliqué dans les pneumonies bovines. Il s'agit d'un coccobacille. L'espèce rencontrée est *Mannheimia haemolytica*. Elle est présente sur les muqueuses nasopharyngées des animaux et connue sous divers sérotypes. Les sérotypes A:1 et A:6 sont ceux qui sont les plus souvent isolés lors de pneumonie (Rice *et al.*, 2007).

Le dernier genre de *Pasteurellaceae* impliqué dans les pneumonies chez les bovins est *Histophilus* en particulier l'espèce *Histophilus somni*. Cette bactérie est responsable d'autres maladies telles que des septicémies, la méningo-encéphalite thrombo-embolique surtout, mais aussi des myocardites, de l'arthrite, des avortements et enfin des phénomènes d'infertilité (Sandal *et al.*, 2007).

Ces trois espèces de bactéries sont susceptibles de former un biofilm dans la trachée et les bronches, c'est-à-dire une agrégation très bien organisée de bactéries sur une surface. Cependant, les conditions de formations du biofilm sont différentes entre les espèces. *H. somni* y semble très bien disposé (Sandal *et al.*, 2007). Lorsqu'elles forment un biofilm, les bactéries sont adhérentes entre elles et protégées par une matrice, ce qui implique une résistance aux antibiotiques. De plus, ce biofilm peut entraîner la formation de bactéries « planctoniques » c'est-à-dire formées par le biofilm mais qui s'en séparent et se disséminent dans le milieu (Bauer *et al.*, 2002). Cela augmente le pouvoir pathogène des bactéries.

Nous avons vu que ces trois espèces de bactéries sont régulièrement impliquées dans les pneumonies bovines. Il s'agit d'agents présents dans la flore commensale respiratoire qui peuvent à la fois être primaires ou secondaires. Cela signifie qu'une de ces bactéries peut être à elle seule responsable de l'affection. Cependant, le plus souvent, il s'agit d'un agent de surinfection. Une pneumonie ayant une étiologie différente favorise le développement de ces bactéries en quelques jours.

1.2.1.2 Mycoplasmoses

La famille des *Mycoplasmataceae* comporte aussi une espèce de bactérie pathogène pour les voies respiratoires bovines. Il existe trois espèces de mycoplasmes pathogènes : d'abord *Mycoplasma bovis* et plus rarement *Mycoplasma dispar* et *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small Colony*.

Comme les pasteurelles, *Mycoplasma bovis* est une bactérie commensale des voies respiratoires hautes. Elle possède des caractéristiques susceptibles de la rendre pathogène. D'abord, ces bactéries n'ont pas de paroi, leur membrane est donc directement en contact avec les cellules de l'hôte, ce qui favorise leur adhérence car cette membrane est adhérente aux surfaces muqueuses. Enfin, elles possèdent des lipoprotéines de surface qui augmentent cette capacité d'adhésion et provoquent une forte réponse inflammatoire. *Mycoplasma bovis* est ainsi responsable de maladies

respiratoires mais aussi d'otites moyennes, d'arthrites, de mammites et de nombreuses autres maladies (Maunsell *et al.*, 2011).

Les symptômes respiratoires provoqués par *M. bovis* ne sont pas spécifiques : fièvre, tachypnée, dyspnée, toux et abattement. Ils peuvent s'accompagner de symptômes liés à d'autres maladies provoquées par *M. bovis*. Cette bactérie est donc difficile à identifier sur la base de l'examen clinique seul, étant donnée l'inconstance des symptômes dans l'expression de la maladie.

Le rôle de *M. bovis* dans les BPIE n'est pas clairement défini. Cette bactérie commensale des voies respiratoires supérieures semble pouvoir être un agent pathogène primaire : il a été montré qu'elle peut déclencher à elle seule une BPIE. Cependant, elle est aussi retrouvée chez des animaux en bonne santé (Maunsell *et al.*, 2011). *Mycoplasma bovis* est surtout un agent potentialisateur des autres pathogènes. Lorsqu'il est présent dans les poumons, il facilite grandement la colonisation par d'autres micro-organismes tels que des bactéries.

La péripneumonie contagieuse bovine (PPCB) due à *M. mycoides Mycoides Small Colony* se présente habituellement sous une forme aiguë. La forme aiguë se divise en trois phases. Au début les symptômes tels que la polypnée, des plaintes et de la douleur se mettent en place. Puis les signes s'aggravent vers une pleuropneumonie associée à une hyperthermie prononcée, une anorexie et une prostration. Enfin, après cette aggravation de l'état de l'animal, une lente guérison se met en place, la résorption des lésions n'est jamais complète. La forme suraiguë, plus rare, présente la même évolution mais plus rapide et conduisant à la mort sans traitement. Il existe deux autres formes de la maladie : les formes subaiguë et lente qui sont communes. L'atteinte est moindre mais conduit à la formation de foyers d'atteinte pulmonaire chronique (Provost *et al.*, 1987).

Cette maladie contagieuse réglementée a été éradiquée d'Europe au XIX^{ème} siècle grâce à une politique d'abattage sanitaire. Elle persiste aujourd'hui en Afrique subsaharienne. Il faut donc rester vigilant en cas d'une réémergence.

1.2.1.3 Ehrlichiose

La dernière bactérie pathogène respiratoire chez les bovins est *Anaplasma phagocytophilum* (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017). Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, intracellulaire obligatoire. Elle est transmise vectoriellement par les tiques. Elle est donc surtout présente au pâturage, durant la période d'activité des tiques. Elle touche des animaux de tous âges. Cette bactérie provoque une maladie appelée ehrlichiose qui entraîne un « syndrome de toux d'été ». Il ne s'agit pas d'un agent touchant directement l'appareil respiratoire mais par contamination des globules blancs par voie sanguine, elle induit une immunodépression qui favorise le « syndrome de toux d'été ». En effet, après l'apparition d'une hyperthermie prononcée, on peut rencontrer une toux persistante, des œdèmes des membres postérieurs, une possible anémie et des avortements (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

Les bactéries jouent donc un rôle important dans les affections respiratoires profondes des bovins. Elles peuvent être la cause primaire de ces affections.

Une colonisation bactérienne secondaire est quasi systématique lors d'une maladie respiratoire chez les bovins. Lorsque la cause primaire n'est ni parasitaire, ni bactérienne, la maladie peut être due à un virus.

1.2.2 Les virus

Les virus sont des agents infectieux dont la structure se limite à un génome (ARN pour les Rétrovirus et ADN pour les Adénovirus par exemple), plus ou moins associé à une coque protéique : la capside. Certains virus dits « enveloppés » sont entourés d'une enveloppe externe et ont besoin de matière organique pour survivre. Les autres sont les virus nus capables de résister plus longtemps que les premiers dans le milieu extérieur. Les virus sont des parasites qui ont une nécessité absolue d'être au sein d'une cellule hôte pour se répliquer. Leur pouvoir pathogène s'exprime parfois lors de la réplication par lyse de la cellule colonisée et/ou par la réponse immunitaire de l'organisme qui détruit les cellules contenant du virus (Eloit, 2014).

Les virus sont responsables d'un grand nombre de BPIE, soit en étant une cause primaire d'atteinte respiratoire soit en provoquant une baisse d'immunité favorisant les surinfections.

1.2.2.1 *Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB)*

Ce virus est l'une des grandes causes de BPIE en élevage bovin. Il s'agit d'un Pneumovirus de la famille des *Paramyxoviridae*. Ce virus enveloppé a un génome, sous forme d'ARN, qui code onze protéines dont huit sont les mêmes que celles du virus syncytial humain. Il mute facilement et détourne le système de réplication des cellules, en particulier celui des cellules ciliées (couche superficielle de l'épithélium pulmonaire) et parfois celui des pneumocytes II, pour se dupliquer. Il est présent dans l'appareil respiratoire profond (Durand, 2002 ; Valarcher et Taylor, 2007).

Selon le type d'élevage, ce virus serait responsable de 60 à 70 % des BPIE (Valarcher et Taylor, 2007). Son impact est lié à la densité de population dans l'élevage : plus elle est élevée, plus le virus aura un effet important. Ceci s'explique par le mode de transmission de la maladie : les sécrétions nasales sont transmises d'un animal à l'autre sous forme d'aérosol. Bien que le VRSB puisse toucher des animaux de tous âges, on note une prévalence plus forte chez les animaux de moins de douze mois.

Les symptômes observés sont les symptômes classiques de BPIE, après une incubation de 2 à 5 jours.

1.2.2.2 *Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR)*

Cette seconde entité pathologique virale des voies respiratoires des bovins est due à l'Herpèsvirus bovin de type 1 (BoHV-1). Il s'agit d'un virus enveloppé à ADN de la famille des *Herpesviridae* (Delost, 2011).

Le virus infecte son hôte par voie respiratoire ou génitale. La transmission se fait préférentiellement par contact « mufle à mufle ». On estime qu'un animal contaminé peut en contaminer sept en moyenne, une fois qu'il excrète le virus. La transmission du virus est aussi possible par des aérosols sur de courtes distances (Mars *et al.*, 2000) ou encore par voie vénérienne et même lors d'une insémination artificielle.

Le virus a un tropisme pour les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur et pour celle de l'épithélium des voies génitales. Cela explique qu'il provoque des BPIE mais aussi des atteintes génitales telles que des vulvovaginites, balanoposthites, une mortalité embryonnaire et des métrites. Une fois le virus entré dans l'organisme de l'hôte, il se réplique massivement dans les cellules épithéliales. Il est excrété par voie nasale et peut atteindre le reste de l'organisme de l'hôte par voie systémique (Muylkens *et al.*, 2007 ; Nandi *et al.*, 2009). Le virus n'est jamais complètement éliminé de l'organisme de l'hôte : cette persistance induit une infection latente. BoHV-1 migre dans l'organisme par voie sanguine et dans les cellules nerveuses. Ainsi, après une réplication massive dans les cellules

épithéliales, il colonise les cellules de neurones sensitifs périphériques où il entre en latence. Les individus déjà contaminés sont donc susceptibles d'exprimer de nouveau la maladie et ré-excréter le virus (Winkler *et al.*, 2000).

En cas d'atteinte respiratoire, les symptômes observés sont ceux que l'on observe lors de BPIE. L'atteinte est plus ou moins importante selon les facteurs de virulence du virus. Les infections sub-cliniques sont communes.

Notons que depuis 1996, une qualification des cheptels indemne d'IBR a été mise en place. De plus, l'arrêté du 22 mars 2017 classe cette maladie parmi les dangers sanitaires de deuxième catégorie rendant son dépistage et sa déclaration obligatoire (*Arrêté du 22 mars 2017 modifiant l'arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de 1re et 2e catégorie pour les espèces animales* | Legifrance, s. d.).

1.2.2.3 Parainfluenza type 3 (Pi-3)

Il s'agit, comme le VRSB, d'un virus à ARN de la famille des *Paramyxoviridae*, mais du genre *Respirovirus* (Ellis, 2010). Seul, le virus infecte les cellules épithéliales des voies respiratoires, ce qui provoque une pneumonie interstitielle avec une destruction de l'épithélium ciliaire. Dans ce cas, les symptômes sont frustes, l'infection par Pi-3 seul peut même être asymptomatique. Cependant, comme dans la plupart des BPIE, une surinfection bactérienne se met en place. C'est alors qu'apparaissent des symptômes classiques, plus prononcés, d'atteinte respiratoire (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

1.2.2.4 Coronavirus

Dans la famille des *Coronaviridae*, on trouve le coronavirus bovin (BCoV) (« *Coronaviridae* », 2017). Usuellement rapporté lors de diarrhées néonatales, ce virus a aussi été isolé chez des animaux ayant une maladie respiratoire. Aucun symptôme spécifique n'est exprimé, on retrouve les atteintes classiques des BPIE (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

1.2.2.5 Adénovirus type 3

De la famille des *Adenoviridae*, il s'agit d'un virus à ADN dont le pouvoir pathogène s'exerce en particulier sur l'appareil respiratoire (Zhu *et al.*, 2011). La transmission se fait par voie directe par contact « nez à nez » ou aérosols. L'adénovirus de type 3 est un agent de zoonose (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

Ces virus, présentés ci-dessus, du VRSB à l'Adénovirus, se transmettent par voie aérogène et infectent les animaux par voie descendante. Ce sont des agents primaires possibles lors de BPIE. En effet, même si leur cytopathogénie directe est faible, ils favorisent une éventuelle surinfection bactérienne conduisant à une atteinte respiratoire plus prononcée.

1.2.2.6 Diarrhée Virale Bovine (BVD)

Cette maladie a une prévalence importante dans les élevages européens et français. Sans recherche du virus ni prévention, dans les années 1970, il était estimé qu'environ 90% des animaux auraient un contact avec le virus au cours de leur vie (Lindberg *et al.*, 2006). Des campagnes de détection et d'élimination sont en cours dans les différents départements. Il s'agit d'un virus enveloppé à ARN de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Pestivirus*.

Les symptômes caractéristiques de cette maladie ne sont pas respiratoires. Cependant, elle provoque une baisse d'immunité (Peterhans *et al.*, 2003). Or, nous avons vu qu'à la faveur d'une baisse d'immunité dans les poumons, les bactéries commensales sont susceptibles d'infecter les poumons. Or les *Pestivirus* ont un tropisme large qui concerne aussi les poumons. Il faut donc garder ce virus à l'esprit lors d'une pneumonie comme agent favorisant l'infection pulmonaire.

1.3 Les pneumonies interstitielles

Certains virus comme le VRSB ou Pi-3 engendrent des lésions de pneumonie interstitielle. Cependant, il existe deux autres maladies non virales qui provoquent une pneumonie interstitielle. Il s'agit de l'emphysème des regains et de l'alvéolite allergique extrinsèque. La première est due à une atteinte des pneumocytes de type I par effet du produit de dégradation du D,L-tryptophane. Ce dernier est consommé en grande quantité quand les vaches passent d'une pâture de mauvaise qualité à une autre où se trouvent de jeunes pousses d'herbe. Elle est donc plus courante en fin d'été ou d'automne lorsque l'herbe repousse. Tandis que la deuxième apparaît plutôt en hiver lorsque les vaches inhalent en grande quantité des champignons actinomycètes présents dans du foin mal conservé.

Les étiologies des maladies respiratoires sont nombreuses et variées chez les bovins, des animaux très sensibles au niveau pulmonaire. La plus commune est la broncho-pneumonie interstitielle qui a une origine le plus souvent virale ou bactérienne. Lors de cette atteinte, les complications bactériennes sont quasi systématiques. Afin d'adapter au mieux les traitements et surtout la prévention en élevage, un diagnostic précis est indispensable.

2. Diagnostic des broncho-pneumonies infectieuses enzootiques

Cette thèse a pour but d'étudier l'effet d'un extrait phytothérapeutique sur les virus bovins. Or les maladies respiratoires lors desquelles des virus sont en jeu sont les BPIE. C'est pourquoi nous allons nous intéresser ici à la mise en évidence de l'étiologie lors d'une BPIE.

2.1 Diagnostic clinique

Comme vu précédemment, les symptômes de BPIE sont identiques quelle qu'en soit l'étiologie. Il faut noter que ces symptômes sont bien plus dus à la réaction inflammatoire de l'individu qu'au pouvoir pathogène direct des agents primaires (Institut de l'Elevage (Paris), 2008).

Le signe clinique le plus précoce est l'hyperthermie qui peut atteindre 40 à 41°C. C'est grâce à cela que dans un lot où l'on trouve des animaux malades, on peut facilement détecter les animaux qui vont très prochainement déclarer des symptômes respiratoires. D'autres signes généraux, non spécifiques, sont observés comme l'abattement et la dysorexie voire l'anorexie.

Ensuite, les symptômes respiratoires sont variés : de la dyspnée à la toux en passant par le jetage nasal. L'auscultation pulmonaire est modifiée. On peut constater une augmentation de l'intensité des bruits pulmonaires et parfois l'apparition de bruits surajoutés. Les BPIE étant des atteintes du tractus respiratoire profond, les bruits entendus à l'auscultation pulmonaire sont surtout présents à l'expiration.

2.2 Diagnostic en laboratoire

La mise en évidence de l'agent primaire responsable de la BPIE n'est pas évidente. En effet, comme il a été répété plusieurs fois, suite à une atteinte primaire, quelle que soit l'étiologie primaire, la surinfection des poumons par des bactéries est quasi systématique. Ainsi, pour déterminer l'étiologie il faut effectuer des prélèvements très précocement en tenant compte de l'évolution de la flore microbienne présente dans les poumons au cours du temps (Figure 7).

Sur cette figure, on observe que les virus ne sont présents que dans les huit premiers jours de l'infection, à l'exception du BVDV (virus de la BVD). En effet, même si l'infection est transitoire, le virus est détectable par méthode directe jusqu'à 21 jours après infection. Chez un individu IPI (Infecté Permanent Immunotolérant), le virus est présent tout au long de sa vie.

En ce qui concerne les bactéries, elles colonisent rapidement les poumons infectés, de nouvelles bactéries peuvent donc s'y multiplier en moins de 8 jours. Après 21 jours, on observe le développement de bactéries qui ne sont en fait jamais des agents primaires de BPIE.

L'évolution rapide des BPIE rend plus compliquée l'identification de l'agent primaire de la maladie.

Il existe plusieurs façons de mettre en évidence un agent infectieux. La méthode peut être directe ou indirecte. C'est-à-dire que l'on recherche soit directement l'agent (bactérie, virus...) ou ses acides nucléiques et ses antigènes, soit indirectement l'indice du passage d'un agent infectieux par mise en évidence d'anticorps dirigés contre ce dernier.

Figure 7 : Evolution de la flore microbienne pulmonaire au cours d'une BPIE (source : Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

Virus			
VRSB			
Pi3V			
BoHV-1			
Coronavirus			
BVDV – IPI	BVDV - IPI	BVDV - IPI	
BVDV - IT	(BVDV – IT)		
Bactéries			
<i>M. haemolytica</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellaceae +/-	
<i>P. multocida</i>			
<i>H. somni</i>			
<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp. +/-	
	<i>Trueperella pyogenes</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>	
		<i>E. coli, Streptococcus, ...</i>	
Initialement	8 jours	> 21 jours	Evolution après début de l'infection

2.2.1 Prélèvements réalisables

Lorsque l'on veut réaliser un diagnostic en laboratoire, l'important est de bien choisir le prélèvement à réaliser. Avant de détailler quel est le prélèvement à utiliser en fonction de l'animal ou du lot que l'on souhaite étudier, voyons les différents moyens d'obtenir des échantillons adaptés (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

2.2.1.1 La prise de sang

L'échantillon obtenu permet d'obtenir sang, plasma et/ou sérum. En effet, certains pathogènes peuvent se trouver dans le sang et il est aussi possible de trouver des anticorps révélant le passage d'un agent microbien. Chez les bovins adultes, on réalise généralement ce prélèvement à la queue en piquant dans la veine caudale. Chez les veaux, elle peut également être réalisée par prélèvement dans la veine jugulaire. Le choix du tube dépend du produit que l'on veut analyser. Pour obtenir du sang total, un tube contenant un anticoagulant doit être utilisé. Si l'on souhaite analyser du sérum, pour la recherche d'anticorps par exemple, un tube sec est nécessaire.

2.2.1.2 Le lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Il consiste en l'injection de liquide physiologique stérile dans les poumons, suivie de sa récupération afin de rechercher d'éventuels agents pathogènes présents. Pour cela, on utilise une sonde stérile de calibre adapté à l'animal à prélever. A l'aide d'un mandrin, on introduit la sonde dans l'un des naseaux de l'animal, en tirant sa langue du côté opposé. Il faut ensuite s'assurer que la sonde est bien passée dans la trachée et non dans l'œsophage : l'animal tousse alors et n'a pas dégluti par exemple. Lorsque la sonde bloque dans les poumons, le mandrin est retiré. On injecte ensuite 50 millilitres de sérum physiologique de façon stérile puis on les aspire directement. Le liquide obtenu est alors susceptible de contenir les pathogènes présents à la surface des muqueuses pulmonaires. Il peut être analysé pour une mise en évidence directe.

2.2.1.3 L'aspiration trans-trachéale (ATT)

Cette technique repose également sur l'injection de liquide stérile dans les poumons. Cependant la voie d'abord des poumons est différente. Le principe, cette fois, est de passer directement dans la trachée en utilisant une sonde montée sur un trocart. On pique perpendiculairement à la trachée face à l'animal au milieu de l'encolure environ. En passant entre deux disques cartilagineux, il est possible de passer dans la trachée. Une fois dans la trachée, l'aiguille est réorientée vers le bas. La sonde est alors poussée dans la trachée en passant dans le trocart. Une fois dans les poumons, on injecte 20 à 50 millilitres de sérum physiologique stérile en fonction de la taille de l'animal. Le sérum physiologique est aussitôt ré-aspiré. Comme lors d'un lavage broncho-alvéolaire, les pathogènes présents sur les muqueuses pulmonaires peuvent être aspirés avec le liquide injecté. Une mise en évidence directe peut donc être réalisée.

Le choix entre ces deux derniers prélèvements repose d'abord sur la taille de l'animal : il est bien plus aisé de réaliser une aspiration trans-trachéale chez un veau plutôt que chez un bovin adulte. Chez l'adulte, on préférera donc le lavage broncho-alvéolaire.

Lors d'aspiration trans-trachéale, du sang iatrogène peut être présent dans le prélèvement suite à la ponction de la trachée. Quant au lavage broncho-alvéolaire, puisque la sonde passe par les voies aériennes supérieures, elle peut être contaminée mais cette contamination est limitée par la présence du mandrin (qui aide à l'introduction de la sonde).

2.2.1.4 L'écouvillon nasal profond (ENP)

Le but est de prélever les cellules du mucus nasal. Pour cela, il faut frotter vigoureusement la muqueuse pendant une dizaine de secondes (jusqu'à la rosée sanguine). Certains virus se trouvent dans la muqueuse nasale, ce sont ceux-ci que l'on peut identifier par mise en évidence directe sur ce type de prélèvement.

2.2.2 Mise en évidence indirecte

La mise en évidence indirecte se fait par recherche d'anticorps présents dans le sérum, c'est-à-dire une sérologie. Cette méthode permet de mettre en évidence le passage d'une maladie dans un organisme en recherchant la réponse immunitaire spécifique qu'il a provoquée.

Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, elle ne peut pas être utilisée trop précocement puisqu'il faut plusieurs jours à l'organisme pour produire des anticorps contre un nouvel agent infectieux. Pour l'IBR par exemple, les premiers anticorps ne sont produits qu'après cinq jours d'infection et ne sont détectables que dix jours après l'infection (Muylkens *et al.*, 2007). A l'inverse, la quantité d'anticorps libres diminue au cours du temps. Ainsi, une analyse sérologique peut être négative si l'animal a été infecté longtemps auparavant.

Lorsque l'on est face à un animal malade depuis suffisamment longtemps pour qu'il ait séroconverti (c'est-à-dire qu'il ait produit des anticorps contre l'agent infectieux actuel), on peut envisager de réaliser une analyse sérologique. Cependant, seule, cette analyse ne donne que peu d'indications car, comme nous l'avons vu, les anticorps persistent dans l'organisme même après disparition de l'infection. Dans le cas d'un résultat négatif, on peut exclure l'agent infectieux recherché si l'on est sûr que la séroconversion aurait déjà eu lieu. Dans le cas d'un résultat positif, on ne peut pas conclure. Cependant, il est possible d'effectuer la même analyse deux à trois semaines plus tard. Si c'est bien cet épisode infectieux qui a induit la production des anticorps présents et que l'animal est malade alors le taux d'anticorps est amené à augmenter. Ainsi, avec une analyse sérologique, on recherche soit un résultat négatif pour s'assurer qu'un agent pathogène n'est pas impliqué dans la

maladie observée, soit une augmentation du titre en anticorps qui se produit au cours de la réponse inflammatoire spécifique.

La sérologie ne semble donc pas être l'outil idéal pour un diagnostic rapide et exact. L'idéal est de parvenir à mettre l'agent infectieux directement en évidence.

2.2.3 Mise en évidence directe

2.2.3.1 Animal présentant des symptômes respiratoires

Comme nous l'avons vu, les agents infectieux responsables de BPIE évoluent très vite dans les poumons. Ainsi, lorsque l'on est face à ce type de maladie et que l'on veut en connaître l'étiologie, il faut procéder de manière méthodique. En général, lorsque le vétérinaire est contacté pour un cas de BPIE, l'animal est atteint depuis plusieurs jours puisque les symptômes ont eu le temps de se développer. On peut donc supposer que l'animal est touché depuis plus de 8 jours. La plupart des agents viraux ne sont alors plus présents et des surinfections bactériennes se sont développées.

A ce stade, seuls quelques tests présentent un intérêt pour le diagnostic étiologique.

- Virus

Le seul virus qui persiste chez l'animal au-delà de 8 jours est celui de la BVD. Un test rapide peut-être effectué sur un morceau de cartilage (morceau d'oreille en pratique). Ce « snap test » se base sur une recherche d'antigènes E0 présents sur la surface du virus. Ce test est proposé par le laboratoire IDEXX qui annonce une sensibilité et spécificité de 100% lors de l'utilisation d'un morceau d'oreille suffisamment petit (« IDEXX SNAP BVDV Antigen Test », s. d.). Il faut rester humble face à cette annonce car aucun test n'est parfait... Il peut être réalisé au chevet du patient et se base sur une réaction immunologique colorée.

Si le test est positif alors le virus de la BVD est présent chez l'animal testé. Deux cas de figure sont possibles : soit l'animal est un IPI, soit il est infecté transitoire (IT). Pour les différencier, on peut réaliser de nouveau un test de mise en évidence directe trois semaines après le premier puisque l'infection transitoire dure trois semaines maximum. Sinon, il est possible de réaliser une recherche d'anticorps sur sérum. Si l'animal ne possède aucun anticorps contre la BVD, alors il est probablement immunotolérant, il s'agit d'un IPI. Sinon, il est certainement infecté transitoire sauf s'il s'agit d'un veau. En effet, les veaux présentent des anticorps maternels jusqu'à trois mois d'âge en moyenne. Ainsi, un veau IPI peut présenter des anticorps de sa mère contre le virus de la BVD mais ne pas en produire lui-même. On considère que l'hypothèse d'être IPI ne peut pas être exclue pour un veau de moins de six mois dont l'antigénémie et la sérologie sont positives. Sur un tel veau, il faut rechercher le virus de manière directe environ trois semaines après la première analyse. S'il est toujours présent alors le veau est un IPI.

- Bactéries

La seule bactérie qui peut être un agent primaire de BPIE et dont la colonisation reste présente dans les poumons tout au long de l'infection est *Mycoplasma bovis* (Maunsell *et al.*, 2011). Cependant, le diagnostic direct de cette bactérie est compliqué, en particulier à cause du manque de sensibilité des tests. Si l'on veut la mettre en évidence, il faut la cultiver. Or cela demande du matériel spécifique et des compétences pour cette technique particulière. Si elle est présente, *M. bovis* peut pousser après 48 heures d'incubation mais cela peut être bien plus long et il faut compter sept à dix jours pour déclarer qu'un échantillon est négatif. De plus, comme la sensibilité de la mise en évidence par culture bactérienne est faible, la négativité d'un échantillon donne peu d'information. La sensibilité du test n'est pas connue pour tous les matériels biologiques mais pour détecter les mammites dues à *M. bovis* sur le lait, elle est de 30 à 50%. Cela s'explique par le fait que la présence de mycoplasmes dans les

tissus ou le matériel biologique est faible et intermittente, ce qui rend difficile le prélèvement d'un échantillon représentatif.

Si l'on veut rechercher *M. bovis* lors d'une BPIE, le prélèvement idéal est le lavage broncho-alvéolaire en comparaison à l'écouvillonnage nasal profond ou la section pulmonaire à l'autopsie (Thomas *et al.*, 2003). La bactérie est viable pendant quelques jours si elle est conservée à quatre degrés Celsius dans le liquide issu du lavage broncho-alvéolaire. Lorsque l'on réalise un écouvillonnage profond, il doit être vigoureux puisque *M. bovis* est présent à la surface des cellules. Il faut éviter les écouvillons avec un manche en bois qui inhiberait la croissance de *M. bovis* et les conserver dans un milieu aérobie (Maunsell *et al.*, 2011).

Une fois le prélèvement correctement réalisé et conservé, *M. bovis* peut être identifiée par culture bactérienne (difficile comme nous l'avons vu) ou par PCR (Polymerase Chain Reaction). La PCR est une technique d'amplification de séquences d'ADN connues (ou ARN pour la RT-PCR) afin d'identifier leur présence. Il s'agit d'une technique très sensible qui permet d'identifier un agent pathogène même s'il est présent en très faible quantité dans l'échantillon.

Ces deux étiologies sont les seules qui peuvent être confirmées sur un animal présentant des symptômes avancés de BPIE. Si les tests sont négatifs, on ne peut pas conclure. Ainsi, si l'on veut augmenter nos chances de connaître l'étiologie de la maladie, il faut tester des animaux en tout début d'infection. C'est pourquoi, dans un lot d'animaux, lorsque plusieurs présentent des signes respiratoires, il faut surveiller la température de l'ensemble des animaux du lot, l'hyperthermie étant le signe le plus précoce lors d'atteinte respiratoire. Les animaux en début d'hyperthermie sont les meilleurs candidats pour les prélèvements.

2.2.3.2 Animaux en début d'infection

Dans les premiers jours de l'infection (avant 5 jours), les symptômes sont frustes mais l'agent primaire est encore présent dans l'organisme de l'animal malade. Il s'agit donc du moment idéal pour réaliser des prélèvements à analyser. Comme les symptômes sont frustes, il n'est pas évident d'identifier les bons candidats pour les analyses. L'idéal est d'identifier le lot à risque, où se trouvait le premier animal malade (et les suivants éventuellement). Ensuite, il faut relever quotidiennement la température de tous les animaux du lot. En effet, l'hyperthermie est le premier symptôme observable lors de BPIE. Les animaux hyperthermes sont ceux qu'il faut prélever car ils sont en tout début d'infection, les surinfections sont donc évitées (Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

Si l'on souhaite rechercher une bactérie, les prélèvements idéaux sont l'ATT ou le LBA. Il est alors possible d'utiliser deux techniques différentes. D'abord, le prélèvement peut être mis en culture sur différents milieux en laboratoire. Si des colonies poussent, elles sont identifiées. Si un agent infectieux primaire potentiel est mis en évidence, on peut penser avec certitude qu'il est celui qui est responsable de la maladie. Il faut cependant prendre garde aux contaminations lors du prélèvement. L'avantage de cette technique est qu'il est ensuite possible de réaliser un antibiogramme. Cet antibiogramme permet de déterminer les antibiotiques efficaces contre la bactérie isolée. Il existe une autre technique plus sensible pour l'identification des bactéries : la PCR (réaction en chaîne par polymérase). Comme nous l'avons vu il s'agit d'une technique se basant sur la mise en évidence du matériel génétique de l'agent que l'on veut identifier. Elle ne permet pas de réaliser d'antibiogramme ensuite mais elle est plus sensible, en particulier pour *H. somni* qui est difficile à cultiver en laboratoire.

Pour la recherche de virus, la PCR est une méthode de choix. Le prélèvement idéal est variable selon le virus. Le LBA ou l'ATT sont en général les prélèvements de choix (VRSB et Pi3). Cependant,

pour mettre en évidence le BoHV-1 responsable de l'IBR, on préfère l'ENP. La culture virale puis l'isolement de la souche ne sont plus beaucoup pratiqués, il s'agit de techniques compliquées et moins sensibles que de nouvelles techniques telles que la PCR.

2.2.3.3 Autopsie

Tout d'abord, lors de l'examen nécropsique des poumons, on recherche une modification de taille, de couleur et surtout de consistance de l'organe. Ensuite, on réalise des coupes dans les différents lobes (Institut de l'Elevage (Paris), 2008 ; Unité pédagogique des animaux de production ENVA, 2017). On peut alors observer des écoulements des bronches et bronchioles ou des épaississements des septums inter-alvéolaires, des foyers de nécroses, des abcès, etc...

L'emphysème est une lésion commune des poumons. Il s'agit d'air emprisonné dans les poumons. On note une augmentation de taille et une consistance anormale. L'emphysème est dû soit à l'agonie, soit à une obstruction en amont de la lésion. Il est souvent observé en zone caudale des poumons, mais il est rarement informatif.

De manière générale, les atteintes pulmonaires ayant contaminé l'animal par voie haute provoquent des lésions dans la partie ventrale des lobes les plus crâniens. Les lésions de BPIE sont très rarement spécifiques du fait de la surinfection bactérienne. Cependant, certains signes caractéristiques des agents infectieux sont parfois observés.

Lors d'une infection par le VRSB seul, on observe une broncho-pneumonie interstitielle (Durand, 2002). Les parties crâniennes sont souvent consolidées et un contenu muco-purulent s'écoule des bronches et bronchioles à la coupe. Les nœuds lymphatiques trachéo-bronchiaux et médiastinaux sont aussi touchés du fait de l'inflammation prononcée, ils sont œdémateux et parfois hémorragiques. Au contraire, en cas d'atteinte par le BoHV-1 seul, les voies respiratoires sont les seules atteintes avec une forte inflammation de la trachée.

Les lésions dues aux bactéries sont presque toujours observées. Ces lésions sont quasiment toujours associées à une pleurésie. Quand il s'agit de *P. multocida* ou *M. haemolytica*, on observe une couleur rouge sombre à noirâtre, une forte augmentation de consistance liée à une consolidation des lobes atteints et un épanchement séro-fibrineux. Les seules bactéries présentant des signes spécifiques sont les Mycoplasmes et *M. haemolytica*. Cette dernière entraîne une nécrose de coagulation et une extension des lésions caudo-dorsalement tandis que les Mycoplasmes conduisent à la formation de foyers de nécrose contenant un matériel caséux blanc à jaune (Rice *et al.*, 2007).

Il semble donc difficile d'établir un diagnostic étiologique sur la simple base des lésions macroscopiques. Cependant, il est possible d'obtenir de plus amples informations grâce à des analyses histologiques ou encore des analyses immunologiques, comme l'immunofluorescence sur coupe de poumon pour VRSB et BoHV-1 par exemple. Bio-X diagnostics par exemple propose un test d'immunofluorescence en kit pour rechercher la présence de BoHV-1 dans un broyat de poumons (Bio-X Diagnostics, 2016).

Le diagnostic de l'étiologie d'une BPIE n'est pas évident et demande une certaine réflexion. Avec une méthode correcte, les chances d'identifier l'agent responsable sont optimisées. Cette recherche d'agent pathogène n'arrive souvent qu'en seconde intention puisque l'on cherche d'abord à traiter l'animal atteint présenté par l'éleveur.

Le diagnostic d'une atteinte respiratoire repose sur des signes cliniques que sont l'hyperthermie, la toux, une anomalie à l'auscultation respiratoire ainsi qu'une baisse du gain moyen quotidien. Des examens complémentaires sont réalisables pour définir l'étiologie exacte de l'atteinte respiratoire.

3. Lutte contre les BPIE

3.1 Traitement

Le traitement des BPIE doit être vu sous trois angles : une prise en charge symptomatique qui vise à limiter l'inflammation et la douleur ainsi qu'un traitement du ou des agent(s) responsable(s) de cette inflammation qu'ils soient primaires ou secondaires.

Des recommandations de traitement existent. Elles sont résumées dans le Tableau 1 ci-dessous (Coghe *et al.*, 2000 ; Unité pédagogique des animaux des production ENVA, 2017).

Tableau 1 : Classification de Lekeux selon les symptômes et le taux sanguin de L-lactate, recommandations de traitement

Classification de Lekeux	Stade 1	Stade 2	Stade 3	Stade 4
Manifestations cliniques associées	Maladie subclinique, guérison spontanée, FR < 40 mpm, appétit, température rectale et muqueuses normaux	Maladie clinique compensée, FR comprise entre 40 et 60 mpm, hyperthermie (>39,5°C), appétit diminué	Maladie clinique décompensée, FR élevée (>60 mpm), muqueuses congestionnées, anorexie, abattement, décubitus	Maladie irréversible, FR > 100 mpm, muqueuses cyanosées, prostration, température basse ou élevée, dyspnée, bouche ouverte
Concentrations en L-lactate associées	< 1mmol/l	Entre 1 et 2 mmol/l	Entre 2 et 4 mmol/l	> 4 mmol/l
Conduite thérapeutique	Pas de traitement particulier. Eventuellement, vitamine C et aspirine	Antibiothérapie et éventuellement anti-inflammatoires non stéroïdiens	Antibiothérapie, anti-inflammatoires (stéroïdiens ou non stéroïdiens)	Euthanasie recommandée, ou traitement après consentement éclairé de l'éleveur

3.1.1 Gestion de l'inflammation et de la douleur

Comme il a déjà été mentionné, le facteur le plus pénalisant pour l'animal est l'inflammation résultant de l'action des agents pathogènes (Francoz *et al.*, 2012). Lors du traitement, il faut avant tout limiter l'inflammation pulmonaire et l'hyperthermie. Pour cela, plusieurs possibilités existent en fonction du stade d'atteinte de l'animal. Ainsi, on peut utiliser des anti-inflammatoires stéroïdiens ou non et des molécules diurétiques si nécessaire.

Le choix de l'anti-inflammatoire le plus pertinent n'est pas toujours évident. On peut les classer en fonction de la gravité de l'atteinte. Si l'animal est peu atteint, bruits respiratoires légèrement

augmentés par exemple, un anti-inflammatoire non stéroïdien peut suffire. En cas d'atteinte plus grave, un anti-inflammatoire stéroïdien peut s'avérer nécessaire. Ces deux anti-inflammatoires peuvent éventuellement être associés sur des cas critiques. On notera l'intérêt de leur effet antipyrétique en plus de leur rôle anti-inflammatoire. Si l'auscultation révèle la présence de liquide dans les poumons, par des râles par exemple, il est possible d'ajouter des molécules diurétiques au traitement.

Il n'est pas toujours possible de traiter l'agent primaire. S'il s'agit d'un virus, il n'existe pas de traitement curatif, la gestion de l'inflammation est le seul traitement possible afin d'aider l'animal en attendant l'effet de la réaction immunitaire.

3.1.2 Antibiothérapie

Puisque la surinfection bactérienne est quasi systématique, l'utilisation d'antibiotiques est pertinente. Pour s'assurer de l'efficacité du traitement et éviter la sélection de souches bactériennes, on préconisait dans les années 90 de traiter précocement, à une dose suffisante et assez longtemps (Schelcher, 1999). Cette théorie est aujourd'hui en cours de révision. On cherche à éliminer les bactéries à tropisme respiratoire qui sont à Gram négatif et les mycoplasmes qui ne sont sensibles qu'à peu de molécules. L'antibiotique choisi doit diffuser dans les poumons, il faut donc qu'il soit lipophile. Il faut ainsi choisir un antibiotique lipophile actif contre les bactéries à Gram négatif et éventuellement contre les mycoplasmes, si l'on soupçonne leur présence (Périé *et al.*, 2007).

Plusieurs familles de molécules antibiotiques correspondent à ce profil :

- Les macrolides sont des bactériostatiques au spectre dirigé contre les bactéries à Gram positif, certaines à Gram négatif dont les bactéries de l'appareil respiratoire (pasteurelles) et les mycoplasmes. Ils agissent sur la sous-unité 50S du ribosome des bactéries, ce qui inhibe leur synthèse protéique (Canu et Leclercq, 2002). Il s'agit de molécules lipophiles métabolisées par le foie. Des spécialités à visée respiratoire contenant des macrolides existent (« Med'Vet », s. d.) : l'érythromycine dans l'ÉRYTHROCINE 200 et plus récemment, le gamithromycine dans le ZACTRAN®, et la tulathromycine dans le DRAXXIN® par exemple.
- Les tétracyclines sont bactériostatiques. Leur large spectre leur permet d'avoir une action contre toutes les bactéries provoquant des maladies respiratoires, sauf apparition de résistance bactérienne. Les tétracyclines présentent une forme lipophile donc une bonne diffusion dans les poumons.

Contrairement aux macrolides qui agissent sur la sous-unité 50S, les tétracyclines agissent sur la sous-unité 30S du ribosome bactérien, ce qui inhibe également la synthèse protéique de la bactérie (Chopra *et al.*, 1992). L'OXYTETRACYCLINE 10%® est une spécialité contenant de l'oxytétracycline (famille des tétracyclines) à visée respiratoire (« Med'Vet », s. d.).

Il faut noter que ces deux familles de molécules antibiotiques agissent toutes les deux sur le ribosome, mais chacune sur une sous-unité différente. Leur association est donc synergique.

- Les phénicolés sont des antibiotiques bactériostatiques. Ils agissent comme les macrolides sur la sous-unité 50S du ribosome. Il est donc possible de les associer aux tétracyclines mais pas aux macrolides. Il s'agit de molécules lipophiles agissant sur les bactéries à Gram négatif mais pas contre les mycoplasmes.
- Les associations synergiques sulfamides (bactériostatique) et triméthoprine (bactéricide) sont liposolubles avec un spectre large. Le SEPTOTRYL® (Sulfaméthoxypyridazine et

Triméthoprim) est une spécialité indiquée lors d'infections respiratoires. (« Med'Vet », s. d.). Ils n'ont cependant pas d'action contre les mycoplasmes.

- Les fluoroquinolones sont des antibiotiques bactéricides avec une indication contre les bactéries responsables de BPIE du fait de leur large spectre et de leur liposolubilité. Il faut noter que ces molécules sont à proscrire en première intention, en effet elles font partie des antibiotiques « critiques » (ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé), 2013). Cette classification en antibiotique critique repose en partie sur le fait qu'il s'agit de molécules puissantes que l'on cherche à préserver des résistances bactériennes afin de pouvoir les utiliser en dernier recours, dans les hôpitaux par exemple. On retrouve comme spécialité le BAYTRIL® (enrofloxacin) par exemple (« Med'Vet », s. d.).

Le choix de l'antibiotique est large. Les macrolides et tétracyclines sont souvent utilisés en première intention. L'idéal serait de réaliser un prélèvement avant toute administration d'antibiotique à l'animal. En effet, il permettrait d'identifier le pathogène responsable de la maladie et en cas d'atteinte bactérienne, il serait possible de réaliser un antibiogramme afin d'utiliser l'antibiotique le plus approprié pour l'animal. Cela n'est pas évident sur le terrain. En cas d'échec de traitement, si d'autres animaux sont atteints, il est souhaitable de prélever les animaux en début d'atteinte (hyperthermes) pour une réalisation d'antibiogramme afin de choisir l'antibiotique le plus adapté.

3.2 Gestion des facteurs de risque

Un stress, qu'il soit physique ou psychologique, entraîne une modification de l'organisme qui a des conséquences sur le cerveau. Or les systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire sont liés (Glaser et Kiecolt-Glaser, 2005). Le stress entraîne une adaptation de l'organisme par une action sur le système hypothalamo-hypophysaire et/ou sur le système orthosympathique. Il a été montré chez des souris infectées avec un influenza-virus qu'un stress altérait à la fois la réponse inflammatoire, la cinétique de synthèse des anticorps et supprimait les réponses inflammatoires aux cytokines (Konstantinos et Sheridan, 2001). Le stress a donc un effet néfaste sur la réponse immunitaire aux virus. Il est possible que le cortisol ait un rôle dans cette sensibilisation due au stress puisque le blocage des récepteurs aux glucocorticoïdes supprime l'effet du stress sur le système immunitaire. Bien que le mécanisme ne soit pas exactement connu, un stress peut sensibiliser les animaux aux maladies infectieuses. Il s'agit donc d'un facteur de risque pour les BPIE, en particulier chez les jeunes bovins allant en atelier d'engraissement : lors de la mise en lot, ils subissent un stress important non seulement par leur sevrage brutal, mais également en raison du départ de leur élevage d'origine et enfin du transport. On observe effectivement une prévalence importante des BPIE chez ces animaux.

Les agents responsables de BPIE se transmettent par contact direct « nez à nez » ou parfois par aérosols sur des distances plus ou moins importantes. Ainsi, les risques de transmission sont augmentés lorsque la densité de population augmente. L'air stagnant dans les bâtiments aggrave ce facteur, d'autant plus que dans cet air se trouvent, en plus des agents pathogènes, des gaz irritants, tels que l'ammoniac, qui endommagent l'épithélium respiratoire. Les variations de température et l'humidité sont des facteurs favorisant tout autant la maladie. Ce facteur de risque lié au logement est exacerbé lorsque des animaux d'âges différents et/ou provenant d'élevages différents sont mélangés. En effet, les animaux développent une immunité spécifique à leur élevage et les jeunes animaux n'ont pas eu le temps de développer une immunité acquise forte. Ainsi, les mélanges de lots d'âge et d'origine différents accentuent le risque d'apparition de BPIE (Taylor *et al.*, 2010 ; Unité pédagogique

des animaux des production ENVA, 2017). On remarque que toutes ces conditions sont parfaitement réunies lorsque les jeunes bovins entrent en station d'engraissement. Cela rend ce type d'élevage très sensible aux BPIE.

L'impact de la maladie peut être limité par la gestion de ces facteurs de risque. Cependant cela n'est pas toujours compatible avec les contraintes liées à l'élevage. Dans le cas où des BPIE se développent, il faut traiter les animaux. Or, nous avons vu que le traitement repose sur des anti-inflammatoires mais sur des antibiotiques également. Dans le contexte actuel où le plan EcoAntibio appelle à un raisonnement de l'usage de ces molécules, il serait intéressant de prévenir au mieux cette maladie très consommatrice d'antibiotiques. Une première piste repose sur la vaccination.

3.3 Vaccination

En stimulant l'immunité des animaux, les vaccins sont un atout majeur dans la prévention. L'objectif de la vaccination est de limiter le développement des maladies chez les individus sensibles. Les protocoles de vaccination sont à réfléchir pour chaque élevage. Souvent, on cherche à protéger les veaux en particulier puisqu'ils sont les plus fragiles et naïfs.

Il est d'abord important de limiter les probabilités de contact avec les agents pathogènes, la limitation des facteurs de risque est indispensable à cela et la vaccination peut aider à réduire la pression infectieuse. Le vaccin BOVILIS® BOVIGRIP, par exemple, est souvent utilisé pour vacciner les mères quelques temps avant le part. Dans le résumé des caractéristiques du produit, ce vaccin propose une « immunisation active afin de réduire l'excrétion virale du virus Parainfluenza – 3 bovin, de réduire l'excrétion virale [...] du virus respiratoire syncytial bovin, de réduire l'excrétion [...] de *M. haemolytica* » (Intervet, 2018) par injection sous-cutanée. Ainsi, les mères vaccinées excrètent moins d'éléments pathogènes ce qui réduit leur éventuelle transmission aux veaux.

Ensuite, il est possible d'aider le système immunitaire du veau par la vaccination, en premier lieu, en lui apportant des anticorps d'origine maternelle *via* le colostrum. Les mères sont vaccinées avant vêlage afin d'orienter la concentration en anticorps dans le colostrum : les immunoglobulines sont « sélectionnées » pour être efficaces contre certaines maladies. Les différentes études réalisées ne permettent pas d'affirmer que la concentration totale en anticorps est augmentée grâce aux vaccins (Cortese, 2009). Les études sur l'intérêt des anticorps d'origine maternelle contre les maladies respiratoires sont nombreuses. Contre le virus respiratoire syncytial bovin, par exemple, une étude rapporte que le transfert d'anticorps maternels ne présente pas d'intérêt (Kimman *et al.*, 1987) mais une autre, plus récente, démontre qu'ils pourraient limiter les effets néfastes du virus (Belknap *et al.*, 1991). Selon certaines études, il pourrait également y avoir un bénéfice de la vaccination des mères contre *M. haemolytica* (Hodgins et Shewen, 1996 ; Prado *et al.*, 2006). Aussi, des anticorps contre *P. multocida* ont été retrouvés dans le colostrum des vaches ; cependant, rien n'indique qu'ils ont eu un effet contre ces pathogènes chez les veaux nouveau-nés.

Les anticorps d'origine maternelle ont une durée de vie limitée et la réponse immunitaire primaire diffère selon les agents pathogènes. Cette réponse primaire peut-être d'abord cellulaire, reposant sur les cellules de l'immunité, en particulier les lymphocytes T ; ou bien elle est d'abord humorale, reposant sur l'action des anticorps. Une stimulation de la réponse cellulaire par un vaccin est donc intéressante. Il est donc vivement conseillé de vacciner ensuite les veaux. D'autant plus que pour certains vaccins, la présence d'anticorps d'origine maternelle peut interférer avec la synthèse d'anticorps propres au veau (Cortese, 2009). Le vaccin le plus précoce est le vaccin intranasal RISPOVAL® RS+PI3 Intranasal. Il peut être administré à partir de neuf jours. L'immunité se met en place

en cinq jours pour le VRSB et dix jours pour Pi-3. L'immunité dure douze semaines après l'injection. Cela permet une protection en attendant de pouvoir vacciner par voie parentérale à douze semaines.

La vaccination semble être la seule solution médicale préventive contre les maladies respiratoires, d'abord en réduisant la pression infectieuse puis en améliorant le transfert d'immunité passive et enfin en augmentant les défenses immunitaires des veaux. Il est indispensable d'y associer une réduction des facteurs de risque dans l'élevage sans quoi la vaccination ne peut être vraiment efficace. Une nouvelle technique de protection et/ou de traitement serait intéressante, non seulement pour le bien-être animal en limitant les maladies respiratoires en élevage mais également pour tenter de limiter l'usage des antibiotiques.

La gestion médicale des maladies respiratoires chez les bovins repose d'abord sur la gestion de l'inflammation qui provoque les symptômes. Ensuite, puisque les complications bactériennes sont très fréquentes, le traitement de l'étiologie de l'atteinte est avant tout basé sur une antibiothérapie. Or nous l'avons vu avec le plan EcoAntibio, l'objectif actuel est de raisonner et réduire l'usage des antibiotiques. Une évolution de la prise en charge des broncho-pneumonies enzootiques pourrait nettement influencer sur l'usage des antibiotiques.

Troisième partie :
La phytothérapie et l'utilisation de *Cupressus*
***sempervirens* ou Cyprès toujours vert.**

Les résistances apparaissent comme des limites à l'utilisation de certains médicaments allopathiques, en particulier pour les antibiotiques qui sont au centre du plan EcoAntibio. Or, comme nous l'avons vu, les antibiotiques sont très souvent utilisés dans le traitement des maladies respiratoires bovines. Il s'agit aujourd'hui d'étudier de nouvelles méthodes de soin afin d'enrichir l'arsenal thérapeutique du vétérinaire et pour qu'il puisse réduire sa prescription d'antibiotiques. La phytothérapie pourrait faire partie de la réponse à ce besoin croissant de nouvelles thérapeutiques, d'autant plus que les propriétaires d'animaux de compagnie, les éleveurs et les consommateurs ont un intérêt grandissant pour les médecines dites « douces ».

1. La phytothérapie, principe et généralités

Les médecines « douces », « complémentaires » ou encore « alternatives » (Mercan, 2014), sont en pleine expansion depuis quelques années (« Les médecines douces séduisent de plus en plus de Français », 2016). Parmi celles-ci, les médecines à base de plantes sont souvent citées, comme l'aromathérapie et la phytothérapie à laquelle nous allons nous intéresser.

1.1 Histoire et principe

1.1.1 La phytothérapie au cours du temps

Un texte rédigé par les Sumériens 3000 ans avant J.-C. révèle qu'ils utilisaient des décoctions de plantes comme médicaments (« Phytothérapie — Wikipédia », s. d.). Il s'agit là des premiers signes d'utilisation de la phytothérapie qui signifie en grec « soigner par les plantes ». Il existe d'ailleurs des preuves d'utilisation de plantes comme remèdes en Chine ou en Égypte autour de 2000 ans avant J.-C. ou même par les hommes de Néandertal (Clément, 2005 ; Barthélémy, 2012). L'utilisation des plantes en médecine est donc très ancienne.

La médecine « occidentale » s'est réellement développée durant l'Antiquité (400 avant J.-C.) grâce à Hippocrate. Ce médecin antique parlait déjà de décoction de racine de saule, utilisée pour soigner les rhumatismes et la fièvre (Pelt, 2002). Et si durant le Moyen-Age, la médecine par les plantes a peu évolué, l'étude des plantes s'est développée au XIX^{ème} siècle. C'est ainsi qu'en 1829, la salicine fut extraite de l'écorce de saule par un pharmacien français. La substance avait bien les propriétés qu'on lui attribuait dans l'Antiquité mais elle provoquait cependant de nombreux effets secondaires (bourdonnement d'oreilles et douleurs gastriques). C'est pourquoi un pharmacien, allemand cette fois, a cherché à synthétiser l'acide acétylsalicylique, principe actif de l'Aspirine® connue aujourd'hui. C'est seulement en 1970 que l'on a cherché à connaître les modes d'action de cette molécule (Pelt, 2002). La phytothérapie évolue depuis l'Antiquité en se basant sur une expérience ancienne, cependant, elle est tombée en désuétude avec l'apparition des médicaments allopathiques. Ceux-ci sont, à l'origine, des principes actifs végétaux, améliorés ou non. Ils sont aujourd'hui obtenus sans avoir besoin de les extraire des plantes grâce aux progrès de la chimie. Cependant, la phytothérapie qui utilise directement les substances issues des plantes, revient au goût du jour. Il s'agit aujourd'hui de démontrer scientifiquement son innocuité et son efficacité.

1.1.2 La phytothérapie aujourd'hui

Depuis le scandale du MEDIATOR® (benfluorex, susceptible d'avoir provoqué des valvulopathies chez les usagers du traitement) dans les années 90 (Pouchard, 2012) à celui du fipronil, un anti-parasitaire retrouvé dans des œufs plus récemment (« Oeufs contaminés insecticide fipronil scandale alimentaire européen », 2017), les scandales à propos des médicaments se multiplient. Ces scandales inquiètent l'opinion publique. En y ajoutant une envie de « retour à des méthodes plus naturelles », les malades ont tendance à vouloir revenir à des médecines « douces » (Adenot, 2014 ; Cabaret, 2016). Il s'agit d'une évolution sociétale d'envie de retour à la Nature. C'est pourquoi l'industrie pharmaceutique recherche une meilleure connaissance des plantes afin de prouver leur innocuité et leur efficacité pour pouvoir les utiliser de nouveau comme traitement.

Le statut des plantes dans la médecine est difficile à déterminer. Comment faire la différence entre ce qui relève de l'alimentation ou de la médecine ? Il existe deux façon de concevoir l'utilisation des plantes médicinales : soit comme des compléments alimentaires, qui malgré la façon de les présenter se veulent thérapeutiques ; soit comme un médicament dont on devrait pouvoir certifier la qualité (Clément, 2005). La phytothérapie semble actuellement être à la frontière de ces deux définitions.

La qualité des plantes médicinales utilisées tend vers une standardisation et à être démontrée. Aujourd'hui, plus de 1200 plantes sont recensées dans la Pharmacopée française (800 dans la Pharmacopée européenne). La Pharmacopée est « un ouvrage réglementaire destiné aux professionnels de santé qui définit : les critères de pureté des matières premières ou des préparations entrant dans la fabrication des médicaments (à usage humain et vétérinaire) voire leur contenant et les méthodes d'analyses à utiliser pour en assurer leur contrôle » (« Qu'est-ce que la Pharmacopée ? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé », s. d.). On y trouve donc des monographies, textes référençant les plantes utilisables en phytothérapie, leur classification, la ou les partie(s) de la plante utilisée(s), les modalités de récoltes et les garanties minimales de principes actifs à assurer (Grosmond, 2012 ; ANSM, 2012). La Pharmacopée Française en vigueur est la 11^{ème} édition rédigée en 2012 (ANSM, 2012). Les monographies des plantes médicinales sont regroupées en deux parties :

- la liste A : « des plantes médicinales utilisées traditionnellement »,
- la liste B : « des plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu ».

Ces textes permettent de connaître les plantes utilisables en phytothérapie et surtout de savoir comment garantir leur qualité. Même si les produits phytothérapeutiques sont issus des plantes et donc de la « Nature », leur innocuité n'est pas assurée. Les plantes que l'on trouve dans la nature sont parfois toxiques. L'ingestion de ciguë, par exemple, est fatale sans traitement. Elle provoque des symptômes neurologiques qui entraînent une paralysie respiratoire et donc la mort. C'est ainsi que mourut Socrate (Flesch, 2005). La digitale, elle, contient de la digitaline, qui provoque des troubles cardiovasculaires. Pourtant, utilisée correctement, il s'agit d'un bon traitement contre l'insuffisance cardiaque (Flesch, 2005). Il en est de même pour les produits phytothérapeutiques. C'est pourquoi l'usage des produits présents sur la liste B est à proscrire. Pour les produits n'étant inscrits sur aucune des listes, la prudence est de rigueur.

La phytothérapie est une médecine dite « alternative », sa philosophie est différente de celle de la médecine « conventionnelle » ou allopathique.

1.1.3 L'approche phytothérapeutique

La phytothérapie fait parties des médecines appelées « non conventionnelles » par la Commission Européenne ou médecines alternatives et complémentaires (MAC). Il existe plusieurs formes de phytothérapie qui n'ont en commun que le sens littéral du terme : « médecine à base de plantes » (Mercan, 2014). On peut citer :

- la phytothérapie « scientifique » qui tend à prouver par des études l'efficacité des produits utilisés,
- l'endobiogénie associant holisme², plantes et système hormonal,
- l'aromathérapie utilisant les huiles essentielles,
- la gemmothérapie se basant sur l'usage de tissus végétaux embryonnaires, et beaucoup d'autres.

Nous nous intéresserons à la première forme listée ici, la plus commune et appelée par abus de langage « phytothérapie ».

Comme les autres MAC, l'objectif de la phytothérapie est (en plus de soigner) d'assurer un retour à la Nature et à la tradition (Pelt, 2002 ; Grosmond, 2012). Le « naturel » est vu par opposition aux traitements allopathiques, créés par l'Homme, pourtant souvent à base de principes actifs issus des plantes. Les traitements « naturels » sont alors perçus comme un gage de qualité et de sûreté. Pourtant, tous les produits issus de plantes ne sont pas destinés à soigner, ils peuvent même parfois être dangereux. La tradition revendiquée repose sur l'expérience ancienne voire très ancienne. Il s'agit là du côté empiriste de la phytothérapie.

Enfin, la phytothérapie revendique une philosophie dite « intégrative ». C'est-à-dire qu'elle a pour objectif de prendre en compte à la fois les différentes méthodes de soin : scientifique, traditionnelle et naturelle, ainsi que de considérer le patient comme un être entier (Pélissier-Simard et Xhignesse, 2008). Contrairement à la médecine conventionnelle qui s'intéresse avant tout à la maladie dans le but de la guérir, la médecine intégrative cherche un « retour à l'équilibre » de l'individu. La maladie est vue comme une rupture de cet équilibre. Cette vision du patient et de la maladie est intéressante mais n'est pas adaptée à la production de preuves scientifiques d'une efficacité des produits utilisés. Il faut noter que face à un individu malade, l'objectif principal sera tout de même de traiter les symptômes présents afin de retrouver cet équilibre. L'intégration n'est évidemment pas parfaite.

Malgré des efforts de standardisation des traitements, il faut être conscient que la phytothérapie, telle qu'elle existe aujourd'hui, n'est pas faite pour être utilisée comme un médicament allopathique (Mercan, 2014). Les plantes sont changeantes par nature. Les concentrations en principes actifs ne sont pas constantes puisque les facteurs entrant en compte sont très nombreux, de la méthode de culture à la conservation en passant par la technique de récolte (Tobler *et al.*, 1994 ; Dessouroux *et al.*, 2011 ; Guilbot *et al.*, 2013). La concentration en principe(s) actif(s) des traitements allopathiques est, elle, au contraire parfaitement connue et maîtrisée. Leur utilisation est ainsi simplifiée et les études pour la délivrance d'autorisation de mise sur le marché (AMM) sont plus aisées.

En plus de leur composition, la pharmacocinétique et le mécanisme d'action de ces traitements conventionnels sont bien connus, tandis que les extraits de plantes sont formés de nombreuses molécules dont on ne connaît pas forcément tous les effets ni toutes les interactions

² Le holisme est un courant philosophique selon lequel les choses forment un tout plus important que leur somme (Larousse, s. d.). D'un point de vue de la médecine, cela consiste à prendre en compte tout le patient et pas uniquement ses symptômes ou sa maladie, tout en utilisant toutes les formes de médecine.

possibles entre elles et avec l'organisme, qui est un système compliqué soumis à de nombreux facteurs.

L'approche phytothérapeutique est donc particulière mais l'objectif reste de soigner les êtres vivants. Il faut aussi garder en tête que de nombreux médicaments allopathiques ont pour principe actif une molécule issue des plantes, comme l'aspirine dont nous avons parlé précédemment. Il est donc certainement possible d'associer les différentes médecines afin d'obtenir des résultats intéressants en terme de santé, que cela soit par la prévention, dans un but curatif ou encore pour un soutien des organismes.

La phytothérapie, « soigner par les plantes », est pratiquée depuis des millénaires. Délaissée pour les traitements allopathiques, elle semble revenir au goût du jour depuis quelques années. Elle prône une approche intégrative, c'est-à-dire qu'elle prend en compte l'intégrité du patient et des médecines existantes. Si les débuts de cette médecine étaient empiriques, les chercheurs cherchent aujourd'hui à prouver scientifiquement ses effets sur les organismes. Malgré des efforts de standardisation, l'inconstance des concentrations en principes actifs dans les produits phytothérapeutiques rend leur étude plus compliquée.

1.2 Les produits phytothérapeutiques

1.2.1 Définitions

Les substances utilisées en phytothérapie sont obtenues à partir des plantes. Elles peuvent parfois être utilisées directement ou après préparation par le praticien.

Les **drogues végétales** sont des parties de végétaux, essentiellement des plantes ou des algues (parfois des champignons ou de lichens). Elles sont utilisées fraîches ou séchées (Christophe, 2014). Lorsque ces drogues possèdent une ou plusieurs propriétés médicinales, on les appelle « **plantes médicinales** ».

Les **préparations à base de plantes** sont « obtenues par traitements de substances végétales, tels que l'extraction, la distillation, l'expression, le fractionnement, la purification, la concentration ou la fermentation ; elles comprennent les substances végétales concassées ou pulvérisées, les teintures, les extraits, les huiles essentielles, les jus obtenus par pression et les exsudats traités. » (« Glossaire - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé », s. d.).

Selon le Code de la Santé publique, un **médicament à base de plante** est « tout médicament dont les substances actives sont exclusivement une ou plusieurs substances végétales ou préparations à base de plantes ou une association de plusieurs substances végétales ou préparations à base de plantes » (*Code de la santé publique - Article L5121-1, s. d.*).

Ces médicaments sont délivrés au patient sous différentes formes galéniques. Toutes visent à extraire le « totum » de la plante, c'est-à-dire l'ensemble des principes actifs qu'elle contient. Cependant, il faut bien noter que contrairement à celle des médicaments allopathiques, la composition chimique des médicaments à base de plantes n'est pas parfaitement définie ni qualitativement, ni quantitativement. La quantité de l'un ou l'autre des composés chimiques peut varier d'un lot à l'autre (voir partie 2.1).

1.2.2 Formes galéniques utilisées en phytothérapie

Les plantes peuvent être utilisées sous diverses formes (Grosmond, 2012). L'objectif des préparations est d'utiliser le *totum* de la plante choisie, c'est-à-dire la totalité des substances actives présentes dans une plante. Cet objectif est impossible à réaliser parfaitement puisque les plantes sont des systèmes très complexes. Il existe des techniques très différentes de préparation des plantes dont les résultats sont tout autant variables.

Les propriétés d'une plante peuvent dépendre de la partie utilisée. Toutes les parties d'une plante peuvent être exploitées, des racines et autres organes souterrains aux parties aériennes (fleurs, graines et feuilles) en passant par l'écorce. Ces matières premières sont parfois utilisées fraîches mais elles sont souvent séchées afin d'améliorer leur conservation. Le Tableau 2 donne un aperçu des différentes formes galéniques utilisées en phytothérapie.

Tableau 2 : Résumé des différentes formes galéniques utilisées en phytothérapie d'après (Christophe, 2014 ; Létard et al., 2015).

Forme utilisée	Préparation		Partie de plante utilisée	Avantages et inconvénients
Plantes en vrac	Tisanes	Infusion : drogue recouverte d’eau bouillante pendant 5 à 15 minutes		Possibilité de les utiliser pour des fumigations
		Décoction : drogue recouverte d’eau froide puis mélange porté à ébullition pendant 15 à 30 minutes	Parties fibreuses difficilement pénétrables par l’eau (racine, écorce,...)	Ne permettent pas d’extraire tous les principes actifs seulement : sels minéraux, pectines, mucilages et alcaloïdes sous forme de sels
		Macération : drogue recouverte d’eau à température ambiante pendant 30 minutes à 4 heures		
		Digestion : drogue recouverte d’eau froide et mélange réchauffé (sans ébullition) pendant 1 à 5 heures		
Poudre : obtenue à partir de plantes séchées	Teinture : dissolution de plantes sèches par l’éthanol durant plusieurs semaines		Teinture mère/alcoolat : dissolution par l’éthanol sur plantes fraîches	Les gélules et comprimés sont des présentations aisées à administrer <i>per os</i>
	Gélules			
	Comprimés			
Macérât glyciné	Drogues fraîches, broyées et macérées dans un mélange eau, alcool et glycérine.		Bourgeons, jeunes pousses, tissus végétaux fins	
Extrait végétal fluide	Définis dans la Pharmacopée, obtenus par extraction de drogues sèches par l’éthanol ou un mélange eau/éthanol, parfois remis en solution dans de la glycérine			
Suspension intégrale de plantes fraîches (SIPF)	Plantes congelées dans l’azote liquide, broyées et mises en suspension dans l’éthanol à 30°C			Conservation de l’intégralité des principes actifs

L'administration de ces formes galéniques se fait par voie interne ou externe. Pour la première, elle se fait essentiellement par prise *per os*, parfois par gargarisme ou bains de bouche. Par voie externe, il s'agit de fumigation ou application de cataplasmes, lotion...

Les extraits fluides semblent permettre une meilleure extraction du totum de la plante que les teintures mères (Guilbot *et al.*, 2013). Ces présentations sont stables mais il faut s'assurer de la qualité du produit obtenu. La garantie d'une concentration minimale en principe(s) actif(s) est indispensable à l'utilisation d'un tel produit comme un traitement médical.

1.2.2.1 Les extraits de plantes standardisés, une catégorie de SIPF (suspension intégrale de plantes fraîches)

Il existe aujourd'hui une présentation d'extraits fluides plus fiables : les extraits fluides glycinés de plantes fraîches standardisés (EPS). Ces extraits fluides particuliers sont obtenus suite à un procédé d'extraction phytostandard breveté (EP 1253927) (Dessouroux *et al.*, 2011, Figure 8).

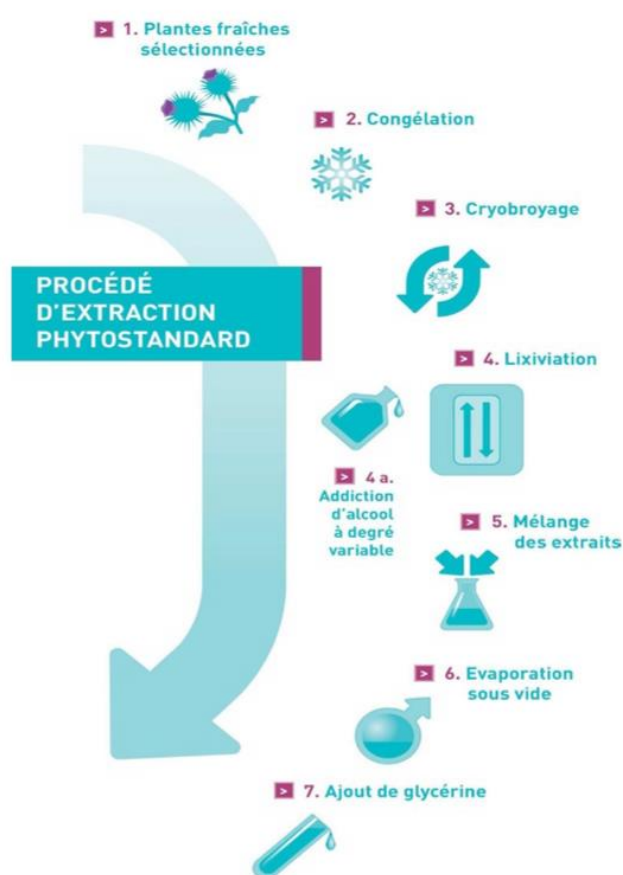
Des plantes fraîches sont choisies puis congelées. Malgré des efforts pour la standardisation de la récolte (notamment dans les mêmes endroits et à des saisons particulières), la concentration en principe actif dans les plantes n'est pas constante.

Une fois récoltées, les plantes congelées sont ensuite broyées afin de permettre l'extraction. Cette dernière se fait par lixiviation, c'est-à-dire l'extraction de composés solubles par un solvant, sur le broyat décongelé par trempage. Ici, le solvant est l'alcool qui est ajouté progressivement afin d'extraire des substances de plus en plus hydrophobes. Le volume reste constant dans la cuve d'extraction puisque l'extrait est soutiré au même débit que celui de l'ajout d'alcool. L'extrait est ensuite concentré par évaporation de l'alcool sous pression réduite. L'alcool est finalement remplacé par la glycérine, meilleur agent de conservation pour ces extraits de plantes.

A noter que dans le cas de l'EPS de Cypres, la concentration en éthanol est stable tout au long de l'extraction afin d'optimiser la concentration de l'extrait en tanins qui sont plus facilement extraits à 60% d'éthanol.

Afin de garantir une concentration suffisante en molécules d'intérêt dans les extraits, des traceurs sont utilisés. Il s'agit selon Dessouroux, « d'une molécule ou famille de molécules dosées dans l'extrait, qui permet de standardiser chaque lot fabriqué » (Dessouroux *et al.*, 2011). Ce traceur est connu pour être présente en grande quantité dans

Figure 8 : Procédé d'extraction phytostandard
Source : "point sur la qualité des EPS..." - A. Dessouroux



l'extrait de la plante et que l'on peut doser. Cette molécule ou famille de molécule est définie lors de la création de l'EPS, une fois la composition chimique connue. En effet, il est compliqué de doser toutes les molécules connues pour être présentes dans l'extrait à chaque extraction. L'extraction est validée par sa concentration en traceur. Si cette concentration est inférieure à un certain seuil, des extraits plus concentrés sont mélangés avec les moins concentrés afin de garantir une concentration minimale en traceur. Par extension, on considère que l'extraction des molécules d'intérêt se fait de façon équivalente à celle du traceur. Cela n'a pas été démontré. C'est pour cette raison qu'il est important de choisir un traceur pertinent afin qu'il représente au mieux l'extraction des molécules considérées comme les plus importantes. Cependant, même si le traceur est très bien choisi, il ne peut garantir que tous les lots soient identiques, seulement une molécule parmi toutes celles de l'extrait est dosée.

Avec cette méthode d'extraction, un maximum de moyens sont mis en œuvre pour obtenir le « totum » de la plante dans le mélange final mais aussi pour assurer une concentration minimale en principe actif recherché dans chaque extrait. Elle permet de progresser vers une meilleure uniformité des lots mais ne la garantit pas.

Dans le cas de l'EPS de Cyprès, le traceur utilisé correspond aux polyphénols totaux dont la concentration est calculée à partir du dosage de la catéchine, une proanthocyanidine donc de la famille des polyphénols (Dixon *et al.*, 2005). La molécule qui semble présenter le plus d'intérêt dans l'EPS de Cyprès fait partie de la famille des polyphénols. Ce traceur semble donc parfaitement adapté pour valider la présence suffisante de principe actif dans l'extrait.

La « médecine par les plantes » se décompose en plusieurs courants (aromathérapie, homéopathie...). La phytothérapie peut être pratiquée avec différentes formes galéniques. La plus étudiée aujourd'hui est l'extrait de plantes. Une méthode d'extraction a été brevetée : l'extraction phytostandard. L'objectif de cette méthode est de garantir une concentration minimale en principes actifs.

1.3 La phytothérapie en médecine vétérinaire

1.3.1 Le renouveau de la phytothérapie, pour les animaux aussi

Comme nous l'avons vu, la phytothérapie fait partie des premiers traitements médicaux utilisés. Les médecines complémentaires sont aujourd'hui devenues un phénomène de société et le grand public est de plus en plus demandeur de ces médecines « douces » (Adenot, 2014 ; Cabaret, 2016). Un sondage TNS Sofres de 2011 a révélé que 63% des Français font confiance à la phytothérapie, 45% y avait alors recours (TNS Sofres pour Les entreprises du médicament, 2011). La plupart des propriétaires d'animaux s'intéressent donc à ces médecines, d'abord pour se traiter eux même. Ils s'approprient cette médecine en se renseignant sur internet ou grâce à des conseils recueillis auprès d'interlocuteurs plus ou moins qualifiés (Adenot, 2014). Or, le propriétaire souhaite offrir à son animal

des soins en accord avec ses convictions. C'est ainsi que, naturellement, ces médecines se sont développées en médecine vétérinaire (Cabaret, 2016).

Aujourd'hui, des gammes de produits phytothérapeutiques se sont développées pour les animaux de compagnie mais tout autant pour les animaux d'élevage. De nombreuses préparations à base de plantes se sont ajoutées à l'arsenal thérapeutique des vétérinaires ces dernières années. Le laboratoire Wamine propose une cinquantaine d'EPS différents afin d'être prescrits sous forme de « préparations magistrales » par le vétérinaire (« Les Extraits de Plantes fraîches Standardisés et les aliments complémentaires (...) - Wamine », s. d.).

Comme nous l'avons vu, l'affect des propriétaires joue un rôle important sur la demande d'utilisation de la phytothérapie. Un propriétaire « canin » aura tendance à mettre en avant le bien-être de son animal et l'utilisation de produits naturels, perçus comme moins dangereux, comme il pourrait le faire pour lui-même. Mais ces traitements ne semblent pas nécessairement répondre aux exigences d'efficacité et de productivité que l'on attend souvent en élevage.

Cependant, la demande d'utilisation de médecines complémentaires, de phytothérapie par exemple, est croissante en élevage et pas seulement en élevage certifié biologique. En effet, ces derniers sont très demandeurs de tels traitements puisque les traitements allopathiques sont très réglementés, mais les élevages traditionnels ne sont pas en reste. Un rapport de l'Académie Vétérinaire de France de 2010 indique plusieurs raisons qui expliquent l'intérêt des éleveurs pour la phytothérapie : ils utilisent parfois ces produits en « auto-prescription » puisque la réglementation appliquée à ces produits est en pleine évolution donc assez floue, on voit aussi apparaître des prescriptions lors de maladies rares contre lesquelles aucun traitement allopathique n'est disponible, enfin lorsque les médicaments allopathiques sont proscrits (élevage biologique, médicaments interdits pour les vaches laitières...) (Académie Vétérinaire de France, 2010).

La phytothérapie est présente dans les élevages et son importance grandit au fil des années. Le vétérinaire doit se tenir informé sur cette évolution et éventuellement adapter son offre thérapeutique pour répondre aux demandes de ses clients.

1.3.2 Formation des vétérinaires à la phytothérapie

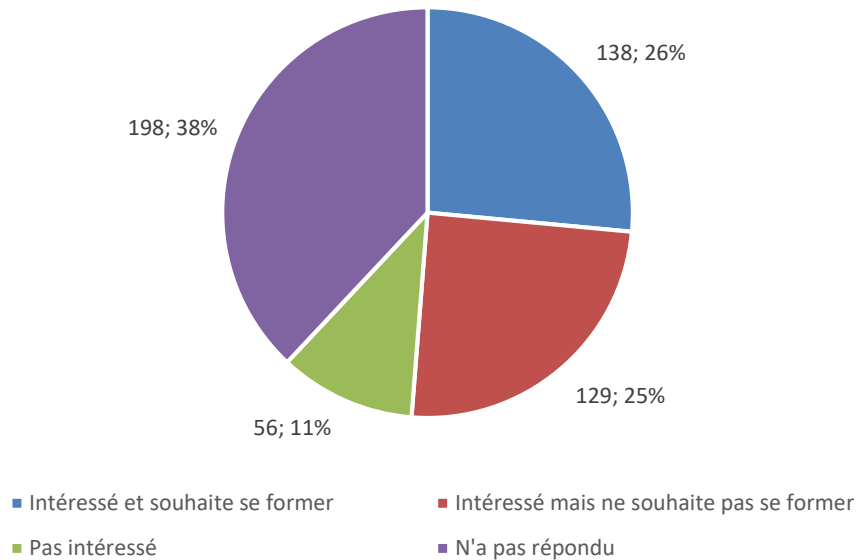
Lors d'un cursus classique d'un étudiant dans les Ecoles Nationales Vétérinaires (ENV), aucune formation en phytothérapie n'est obligatoire. Il semble pourtant que de plus en plus de jeunes vétérinaires s'intéressent aux médecines complémentaires et alternatives dont fait partie la phytothérapie. Un sondage rapide a été réalisé auprès des étudiants à l'ENV d'Alfort de première, deuxième, quatrième et cinquième années. Les résultats se trouvent en Annexe 1 : Réponses des étudiants au questionnaire ». Parmi les élèves sondés, 61% ont répondu au questionnaire qui proposait trois réponses :

- Je suis intéressé par la phytothérapie,
- Si oui, je souhaite me former par la suite,
- Je ne suis pas intéressé(e) par la phytothérapie.

Les résultats globaux sont présentés sur la Figure 9 : Les étudiants ayant répondu sont pour la grande majorité intéressés par la phytothérapie et une partie non négligeable d'entre eux envisage de se former dans les années à venir (Figure 9).

Figure 9 : Bilan des réponses au questionnaire rapide sur l'intérêt que portent les étudiants de 1^{ère}, 2^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} années de l'ENVA à la phytothérapie.

Les pourcentages sont calculés par rapport au nombre d'étudiants sondés.



L'enseignement de cette méthode thérapeutique dès l'école vétérinaire pourrait donc avoir un intérêt dans les années futures. En attendant, il faut rester méfiant car les conseils erronés et les risques de mauvais usage sont très courants (Adenot, 2014). Les informations facilement disponibles (sur internet en particulier) sont souvent insuffisantes. Malgré sa réputation « naturelle », la phytothérapie est une méthode médicale qui peut présenter des risques, une formation sérieuse est donc fortement indiquée. Des formations complémentaires en phytothérapie sont proposées par des organismes spécialisés ou encore les laboratoires. Les formations les plus connues sont celles qui sont dispensées par des organismes privés tels que l'AVETAO (Formation vétérinaire en acupuncture et ostéopathie) ou l'IMAOV (Institut des Médecines Alternatives et Ostéopathie Vétérinaire). D'autres sont proposées par des associations ou les groupements techniques vétérinaires. Enfin, plusieurs vétérinaires sont formés lors de DU (Diplômes Universitaires) pluridisciplinaires (médecins, pharmaciens, vétérinaires...). Récemment, une formation a été mise en place dans les écoles vétérinaires : un diplôme inter-écoles (DIE) de phytothérapie vétérinaire sous l'égide des quatre écoles vétérinaires françaises et de l'AFVP (Associations Française des Vétérinaires Phytothérapeutes). Ces différentes formations sont très inégales en termes de qualité et les risques de conflits d'intérêt sont fréquents. Elles abordent le sujet avec des points de vue différents. Il appartient à chaque vétérinaire souhaitant se former de se renseigner afin de choisir la formation la plus en accord avec ses attentes. Pour le moment, les vétérinaires semblent se baser sur les conseils d'utilisation donnés par les laboratoires et faire évoluer leur prescription au fur et à mesure de leurs expériences. Nous verrons ce qu'il en est réellement grâce à un questionnaire dans la suite de cette thèse.

1.3.3 Bilan sur la phytothérapie en médecine vétérinaire aujourd'hui

La phytothérapie est une médecine très ancienne qui connaît une réémergence en médecine vétérinaire, depuis une dizaine d'années, pour répondre à la demande des clients et aux nouvelles problématiques vétérinaires. Il s'agit d'une médecine différente de la médecine allopathique mais qui peut tout à fait s'y associer. La nature complexe des plantes utilisées en phytothérapie en rend l'étude compliquée si l'on utilise les techniques usuelles adaptées aux traitements allopathiques. Les recherches aujourd'hui tentent de trouver des solutions à ce problème et aujourd'hui l'EPS semble être une préparation qui normalise la concentration des principes actifs du produit administré au patient.

Il est important d'expliquer aux éleveurs que, quelle que soit la méthode de traitement (alternative ou allopathique), son efficacité est dépendante d'une bonne conduite d'élevage. Il est nécessaire de raisonner tous les traitements utilisés en élevage, d'abord par rapport au risque que cela peut représenter pour les animaux, aucune substance administrée à un animal n'étant anodine, mais aussi vis-à-vis du consommateur par les résidus que les traitements peuvent engendrer. C'est pourquoi, comme tout traitement médical, la phytothérapie est réglementée.

La médecine vétérinaire n'échappe pas au renouveau de la phytothérapie. Pourtant aujourd'hui, si les futurs vétérinaires semblent s'intéresser à la phytothérapie, aucune formation obligatoire n'est dispensée dans les ENV lors du cursus classique. Cependant, une nouvelle formation continue a été mise en place depuis cette année dans les écoles vétérinaires.

1.4 La réglementation sur l'utilisation de la phytothérapie

Selon les Pharmacopées européenne et française, les extraits de plantes sont définis comme des « préparations liquides [...], obtenues à partir de drogues végétales ou de matières animales généralement à l'état sec », les drogues étant « des plantes [...] utilisées en l'état, soit le plus souvent sous forme desséchée, soit à l'état frais » (Anses - Service Affaires Juridiques et Contentieux, 2013). Il est noté que certains extraits ont une composition ajustée selon la concentration en principe(s) actif(s) connu(s). Les extraits de plantes sont donc bien définis dans la Pharmacopée, même d'un point de vue international et leur usage est réglementé.

1.4.1 Réglementation sur l'usage des médicaments vétérinaires

En 2013, une note de l'Anses - ANMV donnait la position de l'organisme de contrôle vis-à-vis de ces produits (Anses - Service Affaires Juridiques et Contentieux, 2013). Les produits phytothérapeutiques sont présentés comme ayant des propriétés curatives ou préventives contre des maladies. Il s'agit donc de **médicaments par présentation**, c'est-à-dire qu'ils revendiquent des propriétés curatives ou préventives. On les oppose aux **médicaments par fonction** qui, eux, permettent d'établir un diagnostic. Cette définition confirme que les substances phytothérapeutiques sont bien des médicaments (par présentation). Pour être commercialisés, les médicaments doivent bénéficier d'un dossier d'AMM.

1.4.2 Obtention d'un dossier d'AMM

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il doit obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) octroyée par les autorités compétentes, c'est-à-dire l'Anses – ANMV (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Agence nationale du médicament vétérinaire), le laboratoire basé à Fougère plus précisément, pour les médicaments vétérinaires. Pour cela, de nombreuses études sont réalisées afin d'assurer la qualité, l'efficacité et l'innocuité du produit (Aussavy, 2016). Le dossier d'AMM se compose de quatre points :

- 1- Une partie administrative ;
- 2- Une partie traitant de la qualité du produit, de la description des substances actives, du procédé de fabrication et du contrôle du procédé et du produit ;
- 3- Une partie assurant de l'innocuité du produit et renseignant sur d'éventuels résidus du produit ;
- 4- Une dernière partie visant à montrer l'efficacité du produit.

Une fois les démonstrations et essais validés, l'AMM est accordée pour une utilisation très précise concernant la ou les espèces auxquelles sont destinées le médicament et les modalités d'emploi (voie d'administration, posologie...).

Le cas particulier des médicaments à destination des animaux d'élevage est que les produits, dont la viande, issus des animaux sont destinés à la consommation humaine. Il est donc nécessaire de s'assurer de l'innocuité des produits non seulement pour les animaux traités mais également pour les consommateurs. Cette assurance repose sur la définition de limites maximales de résidus (LMR).

1.4.3 Cas des médicaments à destination des animaux d'élevage

Nous nous intéressons ici à l'obtention d'une AMM pour un médicament destiné à un usage sur les animaux « dont la chair et les produits sont destinés à la consommation humaine ». Pour protéger les consommateurs, des limites maximales de résidus (LMR) sont définies. Il s'agit de s'assurer qu'en consommant des produits issus d'animaux traités, les consommateurs n'ingéreront pas de résidus médicamenteux. Il existe deux tableaux se rapportant aux résidus des produits dans les denrées destinées à la consommation humaine. Le premier tableau, appelé « tableau 1 » (substances autorisées) correspond aux produits dont les limites maximales de résidus autorisés ont été fixées, ceux pour lesquels ces limites n'ont pas besoin d'être fixées ou ceux pour lesquels des limites provisoires ont été fixées (Anses - ANMV, 2018). Le second tableau (« tableau 2 » des substances interdites) correspond aux produits pour lesquels aucune limite maximale n'est fixée car les résidus du produit dans les denrées alimentaires n'ont pas été évalués ou constituent un risque pour la santé humaine (Anses - ANMV, 2017). Dans le cas du Cyprès par exemple, l'huile essentielle de Cyprès (*Cupressi aetheroleum*) est inscrite au tableau 1 car aucune LMR n'est requise. L'usage doit être uniquement topique. Par contre, l'EPS de *Cupressus sempervirens*, n'est pas encore inscrit au tableau 1 et ne peut donc pas être utilisé comme principe actif chez les animaux producteurs de denrée.

1.4.4 Problématique de la phytothérapie

D'abord, malgré un usage historique, les laboratoires se heurtent à la réglementation actuelle puisque très peu de substances aromathérapeutiques ou phytothérapeutiques sont inscrites au tableau 1. Par exemple, l'extrait de Cyprès est inscrit à la liste A de la Pharmacopée française des « plantes médicinales utilisées traditionnellement » chez l'homme et pourtant il n'est pas inscrit au tableau 1 des LMR.

Nous avons abordé le problème financier qui retient les laboratoires de mettre en place des études pour un coûteux dossier d'AMM, puisque les produits phytothérapeutiques ne sont pas brevetables. De plus, les études seraient bien plus compliquées que pour des médicaments allopathiques comme cela a été mis en évidence dans la partie précédente : nombre important de molécules présentes dans le produit, méconnaissance de toutes ces molécules et de leur(s) effet(s) sur l'organisme...

La réglementation concernant les médicaments allopathiques ne semble pas adaptée à la phytothérapie, or la demande des vétérinaires et des éleveurs est croissante.

1.4.5 Position actuelle de l'Anses - ANMV

L'usage de la phytothérapie étant en pleine évolution, la position de l'organisme de contrôle qu'est l'Anses - ANMV évolue. En février 2016, une auto-saisine de l'Anses - ANMV visait à évaluer la possibilité de mise en place d'une AMM allégée pour les traitements phytothérapeutiques (Dambrine *et al.*, 2016).

L'avis issu de cette auto-saisine se base sur le décret n°2013-752 du 16 août 2013 qui propose un dossier d'AMM allégé pour les médicaments à base de plantes : il est possible de s'appuyer sur les données de la littérature française et européenne pour démontrer l'innocuité et l'efficacité du produit plutôt que sur des études spécifiques.

Dans le rapport de l'Anses - ANMV, on note une prise de conscience des problématiques spécifiques à la phytothérapie. Les experts proposent de dresser une liste des substances ayant un usage intéressant en phytothérapie afin de déterminer en priorité leurs LMR. Ils suggèrent aussi d'autoriser l'usage des plantes dont la teinture mère est inscrite au tableau 1 des LMR. Pour les LMR, ils proposent qu'elles puissent être évaluées indépendamment des dossiers d'AMM. Enfin, des lignes directrices de la phytothérapie devraient être décidées sur le modèle de ce qui existe déjà en médecine humaine.

Si cette simplification semble rendre plus facile l'élaboration d'un dossier d'AMM pour les produits à base de plantes, il reste la problématique des LMR et des temps d'attente chez les animaux de rente. En effet, si les experts suggèrent de donner un temps d'attente nul pour les substances inscrites au tableau 1, les substances non inscrites sont pour le moment interdites.

Si l'on prend l'exemple du Cyprès, l'extrait phytothérapeutique n'est pas inscrit au tableau alors que l'huile essentielle l'est, ainsi que les préparations homéopathiques. L'extrait de Cyprès n'étant pas inscrit au tableau 1, son administration aux animaux de rente est donc interdite. À l'inverse, l'utilisation de l'huile essentielle de la même plante ne nécessite pas de temps d'attente. Bien que l'on ne connaisse pas la métabolisation du produit chez les animaux et en particulier sur les bovins, le paradoxe des LMR pour certains produits phytothérapeutiques est bien présent...

1.4.6 Commercialisation des produits à base de plantes

L'obtention d'un dossier d'AMM pour les médicaments à base de plantes est coûteuse et compliquée. L'un des rares traitements à base de plantes ayant une AMM est le COTHIVET®, un mélange de différentes huiles essentielles et teintures mères (Vetoquinol, 1980). Pourtant, de nombreux produits à base de plantes sont commercialisés, mais pas sous la dénomination de « médicament ».

1.4.6.1 Les compléments alimentaires

Certains produits sont commercialisés sous la dénomination d'« aliments complémentaires ». Ils sont considérés comme des aliments destinés aux animaux de rente. Ils sont définis par la directive

2002/46/CE du Parlement européen, transposée par le décret du 20 mars 2006 comme : « des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés » (Anses, s. d.).

S'agissant d'aliments, la réglementation de leur usage dépend de l'EFSA (European Food Safety Authority) (EFSA, s. d.). Il n'est alors pas question de LMR. Les composés de ces compléments alimentaires sont analysés par l'organisme européen afin de s'assurer de l'innocuité pour les animaux et les consommateurs. Pour pouvoir être utilisées, les matières premières doivent être inscrites sur la liste des substances autorisées définie par l'EFSA.

1.4.6.2 Les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP)

Il s'agit de matières premières mises à disposition des vétérinaires afin de pouvoir réaliser des préparations magistrales. Ces préparations peuvent être prescrites par le vétérinaire dans le cadre de la cascade. La cascade est un principe selon lequel un vétérinaire peut, si aucun médicament vétérinaire autorisé n'est disponible dans l'indication pour une espèce, prescrire un autre produit (*Code de la santé publique - Article L5143-4*, s. d.). Cet autre produit peut être, en dernier recours, une préparation magistrale vétérinaire. Le terme « approprié » laisse le vétérinaire responsable de sa prescription. Par exemple, puisqu'il n'existe que très peu de médicaments phytothérapeutiques, si le traitement approprié est la phytothérapie, le principe de la cascade peut justifier l'usage d'une préparation magistrale. Dans ce cadre, l'usage des MPUP sont tout à fait légitime pour les animaux de rente.

Cependant, si le dossier d'AMM n'est pas nécessaire, il est indispensable que des LMR soient définies pour ces MPUP. C'est le cas pour celles qui sont inscrites au tableau 1. Mais pour le Cyprès par exemple, puisqu'aucune LMR n'existe et que l'extrait n'est pas inscrit au tableau 1, l'usage est réglementairement interdit.

La réglementation et la pratique ne progressent pas à la même vitesse. Le retard de la réglementation par rapport à la pratique des vétérinaires est important aujourd'hui. Les vétérinaires se trouvent dans une position compliquée entre les éleveurs demandeurs, les laboratoires proposant des solutions pas toujours idéales et une réglementation inadaptée comme l'a souligné M. DASPET aux Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires de mai 2018 (Daspet, 2018).

La phytothérapie est considérée comme une médecine « douce ». Cependant, l'administration d'une substance à un patient, en particulier aux animaux de rente destinés à la consommation humaine, n'est jamais anodine. L'Anses - ANMV, chargée de superviser les risques sanitaires en France, considère les substances phytothérapeutiques comme des médicaments. Elles devraient donc bénéficier d'une AMM. Cependant, les laboratoires ne souhaitent pas investir pour ces autorisations. Les produits phytothérapeutiques sont commercialisés soit comme des compléments alimentaires, soit comme des MPUP. Le flou juridique existant ne facilite pas l'utilisation de la phytothérapie par les vétérinaires.

2. L'étude de la phytothérapie

La phytothérapie est utilisée depuis des millénaires en se basant sur des connaissances historiques et l'expérience. Aujourd'hui, les scientifiques et les laboratoires tentent d'expliquer les effets qui sont attribués aux plantes. Cependant, ces études sont compliquées puisque cette médecine diffère en de nombreux points de la médecine allopathique. L'empirisme satisfait très peu les vétérinaires, c'est pourquoi des démonstrations scientifiques sont indispensables pour permettre la démocratisation de l'usage de la phytothérapie.

2.1 Une méthode utilisée pour l'allopathie non applicable à la phytothérapie

La méthode analytique utilisée pour étudier et décrire les médicaments allopathiques n'est pas adaptée lorsque l'on s'intéresse à la phytothérapie. Cela explique la difficulté de démonstration d'efficacité des traitements phytothérapeutiques si elles doivent être les mêmes que pour un traitement allopathique. Les études, très chères, sont rarement financées par les laboratoires. La justification proposée est que le marché ne permet pas de déposer des brevets qui assureraient la rentabilité du produit. En effet, un produit issu de la nature ne peut pas être breveté, financer une étude servirait alors l'intérêt de tous les laboratoires. Cela peut être amené à changer avec le plan EcoAntibio. Un autre frein au développement est que le traitement phytothérapeutique est obtenu d'une plante médicinale qui est changeante par nature. Enfin, cet objet complexe qu'est la plante interagit avec un organisme (humain ou animal) qui est très complexe lui aussi. Or, pour le moment, aucune méthode reconnue ne permet de décrire la phytothérapie. On s'attache donc à reproduire la méthode analytique communément appliquée pour l'étude d'un médicament allopathique en recherchant les principes actifs qui existent dans les plantes et en les extrayant au mieux afin d'obtenir, pour les EPS, des solutions ayant une concentration minimale assurée en principe actif choisi. Il est juste nécessaire de garder à l'esprit que le principe actif recherché dans une solution n'est pas le seul présent et donc pas le seul à agir sur l'organisme (Darnault, 2008). Il semble donc pertinent aujourd'hui d'envisager de tenter de mettre au point une méthode d'étude scientifique propre aux produits phytothérapeutiques.

Contrairement au cas des médicaments allopathiques, les molécules composant un traitement phytothérapeutique sont très nombreuses. La plupart des compositions chimiques exactes et quantitatives des plantes ne sont pas encore connues, ce à quoi s'ajoute la variabilité de ces compositions (en fonction de la méthode de récoltes, etc...). Une étude a tenté d'isoler les composés chimiques du fruit de *Cupressus sempervirens*. Ils seraient au nombre de seize, et ce, seulement dans le fruit (Rawat *et al.*, 2010). Malgré cette complexité, depuis de nombreuses années, les scientifiques recherchent la composition chimique des plantes utilisées en phytothérapie et les principes actifs présents dans les plantes jouant un rôle pour la santé.

Une fois la composition exacte connue, il faut être conscient des interactions que peuvent avoir les composés entre eux. L'évaluation de ces interactions est plus aisée pour les traitements allopathiques qui comptent une seule molécule active (parfois plusieurs mais en nombre raisonnable).

Cette connaissance de la composition chimique et des concentrations des différents composants d'un extrait pourrait permettre de démontrer la qualité des produits phytothérapeutiques. Elle pourrait aussi aider à la démonstration de l'efficacité et de l'innocuité des

produits. Cependant, il s'agit d'études laborieuses pour des produits utilisés depuis des dizaines d'années. C'est pourquoi les méthodes de détermination de l'innocuité et de l'efficacité appliquées aux traitements allopathiques sont difficilement transposables aux traitements phytothérapeutiques.

En attendant de pouvoir se baser sur une technique adaptée, l'Anses - ANMV a publié en décembre 2017 un « état des lieux des alternatives aux antibiotiques en vue de diminuer leur usage en élevage » avec « l'élaboration d'une méthode d'évaluation des publications scientifiques et résultats » (Schmidely *et al.*, 2017).

2.2 Une étude basée sur les données bibliographiques existantes

Le groupe de travail « Alternatives aux antibiotiques » de Anses - ANMV a mis en place une méthodologie afin de déterminer, grâce aux données bibliographiques, l'efficacité et l'innocuité des « alternatives aux antibiotiques dans le but de réduire leur usage en élevage » (Schmidely *et al.*, 2017).

Chaque alternative a été listée avec son utilisation précise pour une espèce donnée. Pour rendre compte de l'efficacité des produits, les publications en rapport avec l'alternative définie étaient listées puis notée de 1 à 4. Cette notation correspond à une évaluation de la méthodologie de la publication : est-elle scientifiquement acceptable ? Ensuite, les données pertinentes des publications étaient résumées. Enfin, si la méthodologie est satisfaisante, des conclusions étaient rédigées grâce aux informations récoltées.

Cette méthodologie a été appliquée aux substances pour lesquelles l'innocuité avait été démontrée. Cette innocuité était déterminée par le groupe de travail en se basant sur les données de l'EFSA (European Food Safety Authority). Si l'EFSA ne fournissait pas les données nécessaires pour montrer l'innocuité, des recherches étaient faites au cas par cas *via* des publications sur internet, des résultats référencés (LMR définies, publications scientifiques...).

Le groupe de travail a ainsi pu rédiger une synthèse des alternatives aux antibiotiques existantes qui sont abordées dans des publications scientifiques. Chaque substance est définie selon une espèce de destination, une indication précise et l'effet recherché.

Si l'analyse bibliographique n'est pas parfaite, elle permet de faire un état des lieux des publications scientifiques autour des méthodes alternatives, tout en donnant un crédit plus ou moins grand à chaque étude selon des critères objectifs. Cependant, ces preuves ne sont pas suffisantes à l'obtention d'une AMM dans le cadre de la réglementation actuelle.

Malgré une nécessité de preuves scientifiques, les laboratoires ne présentent pas de dossier d'AMM pour le moment pour une raison avant tout financière. La procédure d'obtention d'un dossier d'AMM est longue et très coûteuse. Les plantes et leurs extraits ne sont pas brevetables contrairement aux molécules de synthèse des médicaments allopathiques. Or un brevet assure une rente financière si la preuve de l'efficacité est faite ce qui finance largement le dossier d'AMM. Pour le moment aucun laboratoire ne souhaite entreprendre ces études qui pourraient servir les intérêts de ses concurrents.

La réglementation actuelle concernant la phytothérapie semble donc être un frein à son utilisation malgré une demande croissante de la part des vétérinaires et surtout de leur clientèle.

La méconnaissance des plantes et la complexité de leur composition rend compliquée leur étude. Pourtant les produits à base de plante sont utilisés en médecine, la preuve de leur innocuité et de leur efficacité serait très intéressante. Les publications se multiplient à propos de la phytothérapie, un rapport récemment publié par l'ANSES vise à évaluer ces publications et en tirer les conclusions sur l'efficacité des traitements phytothérapeutiques.

3. La phytothérapie et la pathologie respiratoire en médecine vétérinaire

Les indications de la phytothérapie sont multiples. Elle peut présenter un intérêt lors de pathologie respiratoire chez les animaux. Des solutions sont proposées à la fois pour les animaux de compagnie et les animaux de rente, nous nous concentrerons plus particulièrement sur les bovins.

Lors d'une atteinte respiratoire, plusieurs symptômes doivent être traités. En élevage, on se concentre sur l'hyperthermie, la baisse de la prise alimentaire (et donc des productions, dont le gain moyen quotidien), le jetage et enfin la toux (Dujon, 1993). Il s'agit donc de choisir des substances agissant sur ces différents symptômes. Les deux objectifs sont de supprimer la cause de l'atteinte respiratoire et de limiter l'inflammation au maximum puisque c'est elle qui provoque les symptômes et peut entraîner des lésions irréversibles.

3.1 Intérêt et limites de la phytothérapie en pathologie respiratoire

Quel que soit l'animal concerné, il faut s'assurer que la méthode phytothérapeutique est adaptée. Elle doit être réfléchie, avec une personne formée à la phytothérapie. En effet, il est tentant d'utiliser seul les « recettes » que l'on peut trouver dans des livres ou sur internet, mais une évaluation préalable de la situation doit confirmer ou non l'intérêt de la phytothérapie.

3.1.1 Gravité de la maladie

Les atteintes respiratoires peuvent avoir de graves conséquences. Lorsque l'état général est très dégradé lors d'une affection très aiguë, par exemple, il est indispensable de mettre en place un traitement allopathique (Labre, 2017). De même, lors d'une infection bactérienne prononcée, les antibiotiques sont indispensables, aucune molécule pouvant possiblement les remplacer n'existe pour le moment.

3.1.2 Importance des paramètres d'ambiance

Quel que soient les traitements entrepris, il faut noter l'importance de la prévention des maladies respiratoires. Cette prévention repose avant tout sur une bonne gestion d'élevage. La pathologie respiratoire survient surtout en hiver, lorsque les animaux sont en bâtiment. L'ambiance des bâtiments est donc prioritaire. Il faut assurer une bonne aération tout en évitant les courants d'air, maîtriser l'hygrométrie et la température et ce, avec une densité animale adaptée (surtout pas trop élevée). Dans de mauvaises conditions d'élevage, la phytothérapie (tout comme l'allopathie) ne peut pas avoir les effets escomptés. Avant d'entreprendre un traitement, en particulier phytothérapeutique, il faut s'assurer de la réussite potentielle de ce traitement.

Dans de bonnes conditions d'élevage, la phytothérapie peut être une médecine présentant de bons résultats mais elle ne peut complètement remplacer les traitements allopathiques (Ayrle <i>et al.</i> , 2016).
--

3.2 Les solutions proposées dans la littérature

Dans la littérature ou sur internet, il est possible de trouver les plantes qui peuvent avoir un effet bénéfique lors d'une atteinte respiratoire. Les formes utilisées sont souvent les huiles essentielles et la phytothérapie sous forme de tisanes, de plantes séchées ou d'extraits de plantes. Diverses voies d'administration sont possibles et résumées dans le Tableau 3 (Pelt, 2002 ; Ventéjou, 2016 ; Labre, 2017).

Tableau 3 : Voies d'administration possibles pour la phyto-aromathérapie en cas d'atteinte respiratoire (Pelt, 2002 ; Ventéjou, 2016 ; Labre, 2017).

Huiles essentielles	Phytothérapie
<i>Per os</i>	<i>Per os</i>
Voie respiratoire : aérosol	Tisane
Voie transcutanée : application sur la ligne du dos	Plante séchée
Voie rectale : passerait par la veine cave, le cœur droit puis les poumons	Extrait fluide

Les huiles essentielles ayant un effet sur l'appareil respiratoires sont nombreuses. Nous ne les détaillerons pas ici. Concentrons-nous sur les plantes utilisées en phytothérapie. Ci-dessous, le Tableau 4 résume les différentes plantes traditionnellement utilisées en phytothérapie pour les atteintes respiratoires. Les extraits de plantes sont utilisés en mélange. Les symptômes de l'animal sont analysés. Quatre ou cinq symptômes sont déterminés pour décrire la maladie et les plantes susceptibles d'agir sur ceux-ci sont listées. Ensuite, en général, quatre à cinq extraits sont choisis pour faire la préparation magistrale destinée aux animaux. Aucun extrait ne dispose d'un essai clinique démontrant son innocuité et son efficacité. Cependant, certaines publications tendent à démontrer l'effet des extraits de plantes ou de leurs composés sur les organismes ou sur des micro-organismes *in vitro*. L'efficacité des produits à base de plantes se base avant tout sur l'histoire de la phytothérapie et l'expérience des praticiens.

*Tableau 4 : Quelques plantes utilisées en phytothérapie lors d'atteinte respiratoire et leurs propriétés
(d'après Ventéjou, 2016 ; Labre, 2017).*

Propriété recherchée	Extraits fluides conseillés
Anti-infectieux	Pin sylvestre (antiviral et antiseptique des voies respiratoires) Cyprès toujours vert (antiviral) Échinacée Plantain lancéolé (antiviral) Régλισse Sureau (antiviral)
Immuno-modulateur	Pin sylvestre Cyprès toujours vert (immunostimulant et protecteur du tissu conjonctif) Plantain lancéolé (immunostimulant) Échinacée (immunostimulant)
Anti-inflammatoire (tropisme respiratoire)	Pin sylvestre Échinacée Régλισse Sureau (protecteur des tissus pulmonaires)
Antitussif (en cas de toux sèche)	Plantain lancéolé Tussilage Guimauve ou mauve
Mucolytique/Expectorant (en cas de toux grasse)	Radis noir Échinacée Pin sylvestre (asséchant des voies respiratoires) Régλισse Tussilage Thym à thymol Sureau

3.3 Les preuves scientifiques

Si les « recettes naturelles » sont nombreuses pour lutter contre les atteintes respiratoires, les preuves scientifiques de leur efficacité sont rares. Dans une revue bibliographique de (Ayrle *et al.*, 2016) plusieurs plantes sont citées pour leurs effets contre les maladies respiratoires (Tableau 5). Dans chacun des cas, des preuves *in vitro* et *in vivo* existent dans la littérature scientifique (Ayrle *et al.*, 2016). Cependant, aucune posologie n'est précisée, pas plus que la forme (huile essentielle, extrait...) ou la voie d'administration.

Aussi, aucune étude spécifique aux maladies respiratoires des bovins n'a été trouvée.

Tableau 5 : Propriétés démontrées des plantes (Ayrle et al., 2016).

	Plantes	Propriétés
Plantes à propriétés pour l'appareil respiratoire	<i>Thymus vulgaris</i> = Thym vulgaire	Antitussif et mucolytique Antibactérien et anti-inflammatoire
	<i>Althaea officinalis</i>	
	<i>Echinacea purpurea</i> = Échinacée	Prévient les maladies respiratoires
Plantes immunostimulantes		Utilisé comme immunostimulant en médecine humaine
	<i>Camelia sinensis</i>	
	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Immunostimulant et antitussif

Si la phytothérapie est utilisée contre les atteintes respiratoires et que la littérature regorge de conseils sur les plantes à utiliser, les démonstrations scientifiques de leur efficacité et de leur innocuité sont rares. Les scientifiques cherchent aujourd'hui à prouver les effets des plantes et des leurs composés.

Le Cyprès semble présenter des propriétés intéressantes pour le traitement des atteintes respiratoires : effet protecteur des tissus conjonctifs et antiviral. Cela pourrait être utile lors d'atteintes respiratoires chez les bovins dans le but de limiter le recours aux antibiotiques. Dans la partie suivante, nous étudierons cette plante et ses propriétés qui ont été démontrées, en particulier son effet antiviral.

4. Le Cyprès toujours vert (*Cupressus sempervirens*) et son utilisation en phytothérapie

Le Cyprès toujours vert (*Cupressus sempervirens*) fait partie des plantes historiquement utilisées pour leur effet sur l'appareil respiratoire. Il s'agit d'un conifère buissonnant pouvant atteindre une hauteur d'environ vingt-cinq mètres (Figure 10). Originaire de l'Est méditerranéen et de l'Iran, ce conifère est souvent utilisé pour l'ornement des cimetières. En effet, il est traditionnellement associé au culte des morts car il est symbole de vie éternelle : il est toujours vert, porte toujours des fruits et son bois est presque imputrescible. Il est même utilisé pour fabriquer les cercueils des papes (Navarro, 2016). En dehors de ces représentations symboliques, le Cyprès présente un intérêt phytothérapeutique que nous allons développer.

Si pour certains arbres, le bois et les racines sont exploités pour la phytothérapie, dans le cas du Cyprès, seules les parties hautes de la plante sont utilisées. Les feuilles sont petites et fines, elles sont utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle de Cyprès. La galbule ou noix de Cyprès est le cône formé par les fleurs femelles (Figure 11) qui, plus tôt, sont regroupées sous forme de chatons. Ce fruit est aussi utilisé pour l'huile essentielle. Il est cueilli juste avant sa maturité pour procéder à l'extraction des molécules d'intérêt afin de créer un EPS.

Figure 10 : Cyprès toujours vert, parc Lecoq, Clermont-Ferrand.



Figure 11 : Partie haute du Cyprès (source : Wikipédia).



4.1 Effets recherchés historiquement

Depuis des siècles, le Cyprès est utilisé sous différentes formes. Les plus courantes sont l'huile essentielle extraite des feuilles de Cyprès et l'extrait liquide à l'éthanol des fruits. L'huile essentielle de Cyprès (*Cupressi aetheroleum*) est inscrite sur la liste A des plantes médicinales utilisées historiquement dans la Pharmacopée française.

Lorsque l'on recherche sur internet, sur le célèbre site *doctissimo.fr* par exemple, de nombreuses propriétés sont attribuées au Cyprès pour l'homme. La décoction est conseillée comme tonique veineux, vasoconstricteur, « rééquilibrant nerveux », fébrifuge, antitussif et antispasmodique. Il est également conseillé sous forme d'huile essentielle à appliquer sur les peaux grasses ou contre les hémorroïdes. Enfin, l'huile essentielle en inhalation soignerait rhume et toux (Doctissimo, s. d.).

Les différents effets du Cyprès lui sont pour la plupart attribués par expérience. Cependant, les publications visant à prouver scientifiquement les effets de la phytothérapie se font de plus en plus nombreuses, il est donc possible que des résultats soient démontrés prochainement pour le Cyprès.

L'utilisation des médecines alternatives se démocratisant en médecine vétérinaire, on trouve facilement des indications pour le Cyprès chez les animaux. Dans son livre, Philippe Labre indique que l'huile essentielle de Cyprès a un effet sur le système circulatoire en agissant contre la mauvaise circulation et les œdèmes de la mamelle et des parties génitales. Elle aiderait aussi les animaux présentant une toux spasmodique ou une pathologie infectieuse bronchique. Enfin, elle aurait une action contre les germes paratuberculeux (Labre, 2017). Cependant, aucune étude le démontrant n'a été publiée pour prouver ces effets.

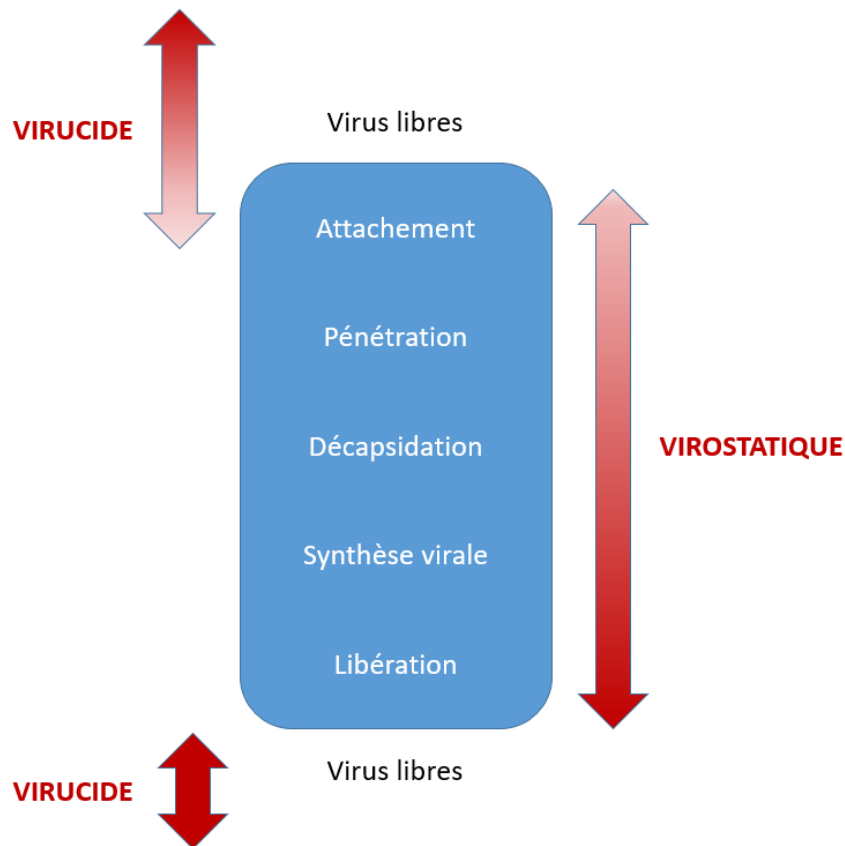
Cependant, les publications scientifiques étant rares, les usages préconisés le sont surtout par empirisme. Il s'agit aujourd'hui de chercher à démontrer l'intérêt de l'usage des extraits de cette plante en médecine vétérinaire. Or le Cyprès pourrait avoir un effet antiviral, c'est ce à quoi nous nous intéresserons dans la suite de ce travail.

4.2 Rapide rappel : mode d'action des virus

Les virus sont des micro-organismes, parasites absolus (voir 1.2.2 : Les virus, page 37). Pour se répliquer, ils dépendent d'une cellule hôte. Ils détournent la machinerie cellulaire en libérant leur génome dans la cellule afin d'utiliser les ressources à disposition pour synthétiser les molécules nécessaires à leur réplication. L'infection d'une cellule par un virus repose sur six étapes (Le Poder, 2017, Figure 12) :

- Le virus libre dans l'organisme commence par se lier à la surface de la future cellule hôte, c'est l'**attachement**.
- Ensuite, il pénètre à l'intérieur de la cellule : la **pénétration**.
- Puis le matériel génétique du virus est libéré lors de la **décapsidation**, il peut s'agir d'ADN ou d'ARN.
- C'est alors que les enzymes de la cellule hôte sont détournées pour participer à la **réplication** du matériel génétique du virus et à la **synthèse** des protéines nécessaires à la formation de nouveaux virus.
- Une fois les molécules nécessaires produites, c'est l'**assemblage** qui conduit à la formation de nouveaux virus.
- Enfin, les virus nouvellement formés sortent de la cellule hôte lors de la **libération**. Le plus souvent, cette libération provoque la mort de la cellule hôte.

Figure 12 : Effet d'un antiviral selon le stade du cycle de répllication virale
(inspiré de Clément, 1993).



Pour évaluer l'activité d'un antiviral, les tests se basent sur la capacité des virus vivants à détruire les cellules qu'ils infectent. Il existe deux tests, l'un mettant en évidence une activité virucide, l'autre une activité virostatique (Figure 12). Les virucides agissant sur des virus libres, le principe du test est de mettre en contact l'antiviral à tester et une solution virale. Le produit à tester est ensuite filtré puis l'effet de la solution virale restante sur les cellules est observé. A l'inverse, pour mettre en évidence un effet virostatique, le virus et les cellules sont mis en contact puis le produit à tester est directement ajouté. L'effet virostatique est normalement réversible lorsque l'on retire l'antiviral.

Voyons maintenant quelle est la composition de l'EPS de Cyprès et ses éventuelles actions sur l'organisme.

4.3 Composition chimique de l'extrait de Cyprès et molécules d'intérêt

4.3.1 Etude de la composition chimique

Bien que plusieurs études visent à déterminer la composition du Cyprès, il faut être conscient qu'elle dépend de nombreux facteurs. D'abord tout dépend de la partie de la plante qui est étudiée : intuitivement, il est facile d'imaginer que la composition de la galbule n'est pas identique à celle des feuilles ou des racines. C'est la composition de l'huile essentielle qui est la plus étudiée puisque qu'il s'agit de la forme sous laquelle le Cyprès est le plus souvent utilisé. Cette huile est extraite des « parties aériennes » de l'arbre. Une étude montre que la composition chimique de cette huile est

quantitativement différente selon la zone géographique où se trouve l'arbre (Boukhris *et al.*, 2012). Les conditions climatiques sont donc certainement un facteur de variation de la composition chimique de l'huile essentielle.

Les recherches sur la composition chimique du Cyprès ont révélé que la plante contenait des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins (dont des proanthocyanidines), des saponines et des phénols. Le tout dans des proportions inférieures à 2%. Ces molécules naturellement présentes dans la plante possèdent différentes propriétés chimiques. Les alcaloïdes ont un caractère alcalin comme leur nom l'indique et un intérêt thérapeutique historique. Les tanins sont des polyphénols dont une propriété est de faire précipiter les protéines, ils sont utilisés pour tanner le cuir. Les saponines sont des hétérosides issus des plantes (Rawat *et al.*, 2010 ; Al-Snafi Ali Esmail, 2016). Une analyse des tanins d'un extrait de Cyprès a révélé que les tanins présents dans la noix de Cyprès sont des proanthocyanidines (PAC) (Clément, 1993). Ces analyses ont été récemment confirmées par une étude menée par le laboratoire PiLeJe (Guinobert *et al.*, 2018a). Une HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography) a été réalisée sur un extrait hydro-alcoolique de cônes de Cyprès. Cette technique de chromatographie sur couche mince est précise mais pas quantitative ((HPTLC - *High Performance Thin-Layer Chromatography*, 2011). Cette chromatographie a révélé la présence d'acides aminés, de polysaccharides, de flavonoïdes et surtout de catéchine et de ses dérivés qui sont des polyphénols. Parmi ces polyphénols, certains sont des tanins condensés autrement appelés des proanthocyanidines (Guinobert *et al.*, 2018b).

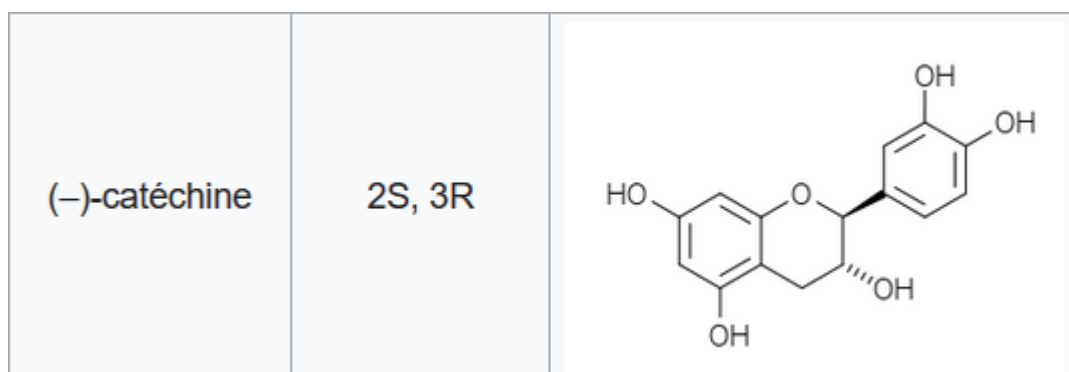
Les effets conférés à la plante ne sont certainement pas dus uniquement à une substance mais à plusieurs des composants présents. De plus, il est possible qu'une synergie existe entre ces composants ou encore un antagonisme. Il faut cependant garder à l'esprit qu'une même molécule a un effet variable sur l'organisme en fonction de sa concentration. Il en est de même avec les composés extraits des plantes. Les études menées confirment néanmoins la présence de tanins et en particulier de proanthocyanidines dans l'extrait. Or ce sont ces molécules qui semblent avoir un effet intéressant sur l'organisme.

4.3.2 Famille des tanins

Les tanins sont des molécules de la famille des polyphénols. Historiquement, ils étaient extraits des plantes et utilisés pour aider au tannage du cuir. Ils ont aussi un usage médical en Asie par exemple comme astringent, contre la diarrhée, comme diurétique, contre les douleurs abdominales... Les tanins précipitent certaines protéines, les métaux lourds et quelques alcaloïdes (Khanbabaee et Ree, 2001).

Les tanins comptent quatre sous familles : gallotanins, ellagitanins, tanins complexes, tanins condensés (Khanbabaee et Ree, 2001). Nous nous intéresserons par la suite aux tanins condensés. Les tanins condensés sont également appelés proanthocyanidines (PAC). Il s'agit d'oligomères ou de polymères de catéchine (ou flavanol). La catéchine (Figure 13) est retrouvée en quantité dans les pommes par exemple.

Figure 13 : Structure chimique de la catéchine (source Wikipédia, « Catéchine », 2018).



Il existe plusieurs publications scientifiques à propos des PAC, il semblerait qu'elles aient un intérêt pour la santé (Santos-Buelga et Scalbert, 2000). Avant de s'intéresser à leurs effets sur l'organisme, voyons dans quelles mesures elles peuvent être administrées.

4.3.3 Absorption des proanthocyanidines (PAC) par l'organisme

Les PAC sont des molécules semblant avoir un intérêt en phytothérapie, cependant pour qu'elles agissent sur un organisme après une administration *per os*, il faut qu'elles soient absorbées par cet organisme. En effet, l'extrait de Cyprès qui contient des PAC est formulé pour être administré en solution *per os*.

Ces molécules partagent des propriétés physico-chimiques, elles forment des complexes stables avec les ions métalliques et avec les protéines. Comme les autres polyphénols, il s'agit de bons agents réducteurs (Santos-Buelga et Scalbert, 2000). La plupart de leurs effets sur la santé découlent de ces propriétés physico-chimiques. Les polyphénols sont absorbés par les êtres vivants *via* leur alimentation. Cependant, la quantité de proanthocyanidines présentes dans l'alimentation n'est pas connue, mais on en trouve dans le cacao, les pommes, le vin...

Les proanthocyanidines sont les polyphénols qui sont le moins bien absorbés par l'intestin, elles diffusent donc mal dans le plasma humain lors de leur ingestion. L'absorption intestinale est altérée par la polymérisation de la molécule. Les dimères, jusqu'aux tétramères, sont absorbés intacts en faible quantité (10% environ) dans l'intestin grêle mais les polymères de plus grande taille ne sont pas absorbés (Ou et Gu, 2014). Ainsi, la majorité des proanthocyanidines ingérées sont seulement polymérisées à leur arrivée dans le colon et non absorbées. Elles sont alors dégradées par le microbiote du colon en phénylvalérolactones et acides phénoliques (Ou et Gu, 2014). Ces métabolites pourraient avoir un rôle dans les effets bénéfiques pour la santé que l'on attribue aux proanthocyanidines.

L'absorption de la molécule est donc très faible chez l'homme mais elle n'a pas été étudiée chez les bovins. On pourrait envisager de faire un parallèle entre l'absorption intestinale chez l'homme et chez les bovins. Cependant, il ne faut pas oublier que les estomacs des bovins et des humains sont très différents. Avant de passer dans l'estomac *sensu stricto*, appelé la caillette, le bol alimentaire des ruminants transite par trois pré-estomacs (réseau, feuillet et rumen). Ce qu'ingèrent les ruminants est, en particulier dans le rumen, soumis à l'action de nombreux micro-organismes et ce avant de passer dans l'intestin. Trois hypothèses sont envisageables : soit les proanthocyanidines sont altérées dans le rumen et leur absorption intestinale est d'autant plus limitée ; soit les molécules sont dépolymérisées, ce qui facilite leur absorption intestinale ; soit le passage dans l'estomac des bovins n'a aucun effet sur

les PAC. Or il semblerait que les effets attribués aux proanthocyanidines soit surtout dus à l’actions de leurs métabolites qui eux sont mieux absorbés. Mais s’il a été démontré par Spencer *et al* que les proanthocyanidines sont dépolymérisées sous un pH très acide (pH = 2) *in vitro*, Rios *et al.* n’ont observé aucune modification des proanthocyanidines dans l’estomac de l’homme dans lequel le pH varie de 1,5 à 5 environ (Spencer *et al.*, 2000 ; Rios *et al.*, 2002). Comme le pH du rumen est d’environ 6, l’hypothèse d’une dépolymérisation par l’acidité est très peu probable chez les bovins. L’action des micro-organismes peut, en revanche, peut-être conduire à cette dépolymérisation.

Concernant les veaux qui, avant quatre à huit semaines, sont des monogastriques, l’absorption du produit est différente. En effet, un produit administré *per os* se trouvera directement dans la caillette plutôt que de passer par le rumen. Dans la caillette, le pH est très acide, entre 2 et 4, ce qui se rapproche du pH observé dans l’estomac humain. L’absorption de proanthocyanidines chez les veaux pourrait donc être proche de l’absorption chez l’homme. Lors d’administration de proanthocyanidines *per os*, on retrouve donc certainement ces molécules en grande quantité dans l’intestin grêle (Rios *et al.*, 2002) puis dans le colon.

Ainsi, seuls les petits polymères de PAC sont absorbés. L’acidité de l’estomac, même chez l’homme ou le veau semble cependant ne pas être suffisante pour conduire à cette dépolymérisation. L’absorption des PAC est faible dans l’intestin grêle chez l’homme, donc on peut supposer que chez les monogastriques en général, la plupart des PAC ingérées sont retrouvées intactes dans le colon. C’est alors que la flore du gros intestin agit sur les PAC, dépolymérise et produit des métabolites. Ce sont ces métabolites qui semblent avoir un effet sur l’organisme. Ainsi, chez le bovin adulte, le passage des PAC dans le rumen avant l’intestin pourrait éventuellement augmenter leur absorption...

Les mécanismes d’absorption des PAC sont méconnus chez l’homme et n’ont jamais été étudiés chez les bovins. Seules des suppositions peuvent être faites pour ces animaux pour le moment.

Le Cyprès est un conifère traditionnellement utilisé en phytothérapie. Les principes actifs extraits de ses galbules (fruits) sont essentiellement des tanins. Parmi ces tanins, ce sont les proanthocyanidines (PAC) qui sont majoritaires. Ces molécules sont courantes dans les végétaux. Leur absorption digestive est méconnue ; chez l’homme, il semblerait qu’elle soit très limitée.

4.4 Effet de l’extrait de Cyprès sur les organismes vivants

Les rares études traitant du Cyprès en phytothérapie s’intéressent surtout à son effet antiviral. Cette partie est destinée à faire l’état des connaissances actuelles sur les effets de l’extrait de Cyprès sur les micro-organismes, cellules et organismes.

4.4.1 Cytotoxicité du Cyprès

Lorsque l’on souhaite tester l’effet d’une substance sur un virus, en particulier sa capacité à tuer les virus, des tests de cytotoxicité sont réalisés. En effet, il est indispensable de s’assurer que lors du test, la mort des cellules est bien liée à la présence de virus plutôt qu’à l’action de la substance testée. C’est la CMNT (concentration maximale non cytotoxique) qui est recherchée. C’est cette concentration qui est utilisée pour le test de virucidie en général, puisqu’elle permet d’avoir une plus

grande quantité de substances actives mais n'a pas d'effet sur les cellules utilisées pour l'étude. Dans ses travaux, Clément a recherché la CMNT d'extraits de Cyprès à différentes concentrations, tandis qu'Amouroux l'a fait pour une solution de PAC (Clément, 1993 ; Amouroux, 1998). Il faut noter que la cytotoxicité de l'extrait de Cyprès augmente lorsque sa concentration en tanins (dont les PAC) augmente.

Les études *in vivo* sont rares, l'administration d'une solution de PAC à des souris a été réalisée afin d'observer l'effet virucide de ces molécules. Dans le lot témoin (dix individus) n'ayant reçu qu'une solution de PAC, la mortalité a été nulle. Ainsi, l'administration *per os* d'une solution de PAC concentrée à 0,5% administrée à hauteur de 300 mg/kg/j pendant 21 jours (Amouroux, 1998) semble ne présenter aucune toxicité pour la souris.

4.4.2 Activité protectrice du tissu conjonctif

Les atteintes respiratoires peuvent provoquer des lésions dégradant le tissu conjonctif pulmonaire. Le tissu conjonctif étant composé en majeure partie de collagène et d'élastine, une protection de ces molécules pourrait permettre de préserver le tissu. Sous l'effet d'agressions extérieures et du vieillissement, le collagène est dégradé sous l'action d'enzymes : les collagénases. L'élastine est dégradée par l'élastase.

Dans sa thèse, Amouroux a d'abord testé l'effet d'une solution de PAC (molécules majoritaires dans l'extrait de Cyprès) sur le couple collagène/collagénase *in vitro*. Il s'est avéré que la dégradation des fibres de collagène par action de la collagénase était limitée par la présence de cette solution de PAC (Amouroux, 1998). Selon cette étude, les PAC ont un effet protecteur du tissu conjonctif en protégeant le collagène de l'action de la collagénase. Le même test a été réalisé sur le couple élastine/élastase. Les résultats étaient comparables à ceux du couple collagène/collagénase. Les PAC ont, selon cette étude, un effet protecteur pour deux protéines majeures du tissu conjonctif.

Dans le même ouvrage, une étude *ex vivo* a été menée sur des lames de tissu conjonctif humain. Les lames ayant été traitées avec une solution de PAC avant d'être en contact avec les enzymes dégradant le tissu conjonctif, ont présenté des faisceaux de collagène plutôt organisés. Au contraire, les lames n'ayant pas été préalablement traitées avec une solution de PAC ont révélé des fibres de collagène désorganisées ne fixant plus le colorant. L'effet protecteur du tissu conjonctif de l'action des enzymes le dégradant semble être confirmé par ces observations microscopiques. On note une affinité particulière des PAC pour le tissu conjonctif (Amouroux, 1998).

4.4.3 Activité antivirale *in vitro*

Dans la partie précédente, nous avons abordé les propriétés protectrices que peuvent avoir les PAC sur le tissu conjonctif. Cela peut s'expliquer par certaines propriétés de ces molécules. En effet, les tanins dont les PAC en particulier, ont la propriété de se fixer aux protéines. Clément a montré que les PAC se fixent au VHS-1 (Virus de l'Herpès Simplex - 1) (Clément, 1993). Or l'extrait de Cyprès contient ces tanins en grande proportion. C'est pourquoi l'effet antiviral de l'extrait de Cyprès a été étudié.

Des tests de virucidie *in vitro* ont été réalisés dans plusieurs études, sur des virus humains essentiellement. Le détail de ce test sera expliqué dans la partie « tests de virucidie » de la partie expérimentale de cette thèse. En 1998, l'activité antivirale de PAC extraites de Cyprès a été démontrée contre deux rétrovirus humains : HIV (virus de l'immunodéficiência humaine) et HTLV (virus T-lymphotropique humain) (Amouroux *et al.*, 1998). Cette activité antivirale est comparable à celle de l'AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine, un anti-rétroviral) mais avec des concentrations plus élevées. Lors

de cette étude, l'absence de cytotoxicité d'une solution de PAC extraites du Cyprès a aussi été démontrée alors que l'AZT est cytotoxique même à de faibles concentrations.

Un effet virucide de l'extrait de Cyprès a été montré contre sept autres virus humains : des Herpesviridae (VHS-1, VHS-2, virus varicelle-zona), un Adénoviridae (Adénovirus 5), un Picornaviridae (Polyovirus 1 Sabin), un Orthomyxoviridae (Virus de la grippe A Texas) et un Poxviridae (virus de la vaccine). L'infection des cellules, *in vitro*, par ces sept virus a été inhibée par la présence d'extrait de Cyprès à des doses sub-cytotoxiques. Une action supérieure à celle d'un antiseptique connu, le chlorure de benzalkonium, a même été montrée (Clément, 1993).

Une activité antivirale d'une solution de PAC extraites du Cyprès ou d'un extrait de Cyprès a été démontrée contre plusieurs virus humains. Nous avons vu que les PAC ont pour propriété de se fixer aux protéines. Voyons si cela peut permettre d'expliquer le mécanisme de cette action antivirale.

4.4.4 Activité antivirale *in vivo*

L'effet d'une solution de PAC extraite du Cyprès a été expérimenté sur des lots de souris infectées par différents virus (Amouroux, 1998). D'abord, des souris infectées par le virus HIV ont été gavées avec la solution de PAC. L'analyse des nœuds lymphatiques a révélé un très faible effet protecteur de la solution et ce, à forte dose : 400 mg/kg/jour (Amouroux, 1998). Ensuite, la solution a été administrée à des souris pendant douze jours. Au septième jour, un virus leur était inoculé, soit celui de la grippe de type A « Texas » (Influenza virus), soit un Coronavirus de type MHV3 (Murine Hepatitis Virus 3). Dans les deux cas, une protection contre l'effet létal de ces deux virus a été observée. Les groupes de souris ayant reçu la solution de PAC ont présenté une plus faible mortalité que les groupes témoins ayant été aussi infectés par un virus. Cependant, cet effet protecteur existe à une forte dose (300 mg/kg/jour d'une solution de PAC à 0,5%). L'effet de l'organisme sur le produit n'est pas connu donc la biodisponibilité du produit ne peut pas être déterminée.

La différence d'effet de la solution contre le VIH et les deux autres virus peut s'expliquer par la localisation de ces virus dans l'organisme : le premier se trouve dans les lymphocytes, les deux autres dans le tissu conjonctif. Or les PAC semblent avoir une affinité particulière pour le tissu conjonctif plutôt que pour les lymphocytes. Ces molécules pourraient donc être présentes en plus grande quantité dans le tissu conjonctif que dans d'autres parties de l'organisme (Amouroux, 1998).

Des tests *in vitro* ont prouvé l'efficacité de l'extrait de Cyprès ou d'une solution de PAC issu du Cyprès comme antiviral sur plusieurs virus humains. Or aujourd'hui la phytothérapie se développant en médecine vétérinaire, des études ont été réalisées sur des virus animaux, nous les aborderont dans la suite de ce travail.

Il faut noter que la biodisponibilité des PAC semble très faible dans les organismes vivants (du moins chez la souris) et les études sont très rares. L'effet virucide *in vitro* de l'extrait de Cyprès ou d'une solution de PAC ne démontre pas qu'ils pourraient avoir le même effet *in vivo*. Cependant, il s'agit d'un premier pas dans l'étude des propriétés pharmaceutiques de l'extrait de Cyprès.

4.4.5 Activité des proanthocyanidines sur les organismes biologiques

Chez l'Homme, il a été montré différents effets de cette famille de molécules comme une augmentation de la capacité antioxydante du sang, un effet positif sur la fonction vasculaire et une diminution de l'activité plaquettaire. Cette famille de molécules semble donc avoir un effet bénéfique sur la santé tout en présentant une faible cytotoxicité (Kolodziej *et al.*, 1995).

Dans ses travaux, Amouroux a mis en évidence un effet des PAC sur le tissu conjonctif (Amouroux, 1998). La première expérience consistait en l'observation de l'effet des PAC de Cyprès sur le couple collagène/collagénase sur gélose. Il a été mis en évidence que si l'on augmentait la concentration en PAC au contact du collagène, la synthèse augmentait malgré la présence de collagénase. Des tests ont également été réalisés sur des lames histologiques de tissu conjonctif humain. L'incubation préalable des lames dans une solution de PAC aurait un effet protecteur des fibres tissulaires. En effet, un maintien de la colorabilité et de l'organisation des fibres a été observé malgré l'incubation dans une solution enzymatique. Les PAC de Cyprès auraient ainsi une activité protectrice du tissu conjonctif (Amouroux, 1998).

Dans son mémoire, Christelle Clément a étudié un effet important des tanins : leur capacité à se fixer aux protéines (Clément, 1993). Grâce à une chromatographie sur couche mince, elle a démontré que les tanins présents dans l'extrait de Cyprès sont des procyanidols de la famille des PAC. Ensuite, des électrophorèses dénaturantes ou non et des électrofocalisations ont été réalisées sur des protéines en contact avec l'extrait. La conclusion de ces tests est que les tanins (dans ce cas, des PAC) ont pour propriété de se fixer aux protéines, ce qui augmente leur poids moléculaire ou les fait précipiter et modifie leur point isoélectrique (Clément, 1993).

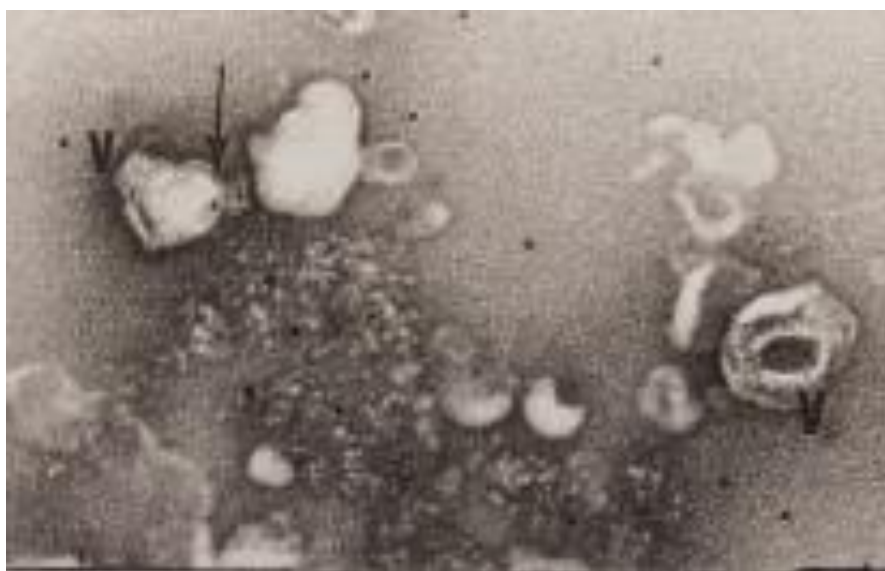
Grâce à une observation en microscopie électronique, une fixation des PAC d'un extrait de Cyprès à un virus (le VHS-1 responsable de l'herpès labial chez l'homme) a été mise en évidence (Clément, 1993, Figure 14). Les tanins sont marqués à la protéine A or³ puisqu'ils fixent les protéines puis sont mis en contact avec le virus, le témoin ne contient que virus et protéine A or. Il a été observé que les virus présentaient presque cinq fois plus de billes d'or autour d'eux lorsque l'extrait est présent. Les tanins se fixent donc très certainement aux protéines des virus.

Les tanins, et ici les PAC en particulier, présentent des propriétés intéressantes qui leur confèrent une action probable sur les virus.

Figure 14 : Fixation des tanins sur le virus VHS-1 (source : Clément, 1993)

V : virus VHS-1

→ : bille d'or.



³ La protéine A-or est une protéine de surface d'une bactérie (*Staphylococcus aureus*) qui se lie facilement aux anticorps. Elle peut ainsi être marquée avec des billes d'or et visible en microscopie électronique (« Protein A », 2018).

4.4.6 Mécanisme de la propriété antivirale des PAC

En 1991, une équipe japonaise a montré un effet des tanins sur la reverse transcriptase (Kakiuchi *et al.*, 1991). Cette enzyme est utilisée par les rétrovirus afin de se répliquer. En effet, elle transforme l'information génétique du virus, portée par un brin d'ARN, en ADN qui est alors intégré au génome de la cellule hôte. Il s'agit d'une caractéristique des rétrovirus. L'inhibition de cette protéine conduit ainsi à l'impossibilité de se répliquer pour le virus.

Cet effet des tanins sur les virus n'est certainement pas le seul puisqu'une activité virucide a été montrée pour des virus qui ne sont pas des rétrovirus. Le mécanisme de l'action de l'extrait de Cyprès a été étudié par Clément (Clément, 1993). Le virus utilisé est le VHS-1. Tout d'abord, la virucidie a été observée après différents temps de contact entre le virus et l'extrait de Cyprès. Cela a permis de confirmer l'hypothèse avancée par Amouroux et collaborateurs (Amouroux *et al.*, 1998) : les PAC de l'extrait de Cyprès agissent dans les premiers stades de l'infection virale, c'est-à-dire lors de l'attachement et/ou la pénétration du virus dans la cellule. L'infection virale a alors été observée par microscopie électronique, d'abord sans ajout d'extrait de Cyprès (témoin), puis avec l'extrait de noix de Cyprès. L'observation du témoin montre un attachement des virus en moins de trente minutes puis les virus pénètrent dans la cellule. Enfin, en une heure environ, le virus se trouve dans une capsule intracytoplasmique au sein de la cellule. Les étapes suivantes de décapsidation, migration du matériel génétique et formation de nouveaux virions, se déroulent rapidement. Au contraire, lorsque l'observation est faite en présence de l'extrait de Cyprès, le virus ne pénètre pas dans la cellule. Les observations après trente minutes, une ou deux heures sont semblables. Des amas de débris cellulaires se forment rapidement et même après deux heures d'évolution, des virus intacts sont toujours observés et n'ont pas pénétré dans les cellules. Il n'y a ni attachement ni pénétration des virus. L'extrait de Cyprès a un effet inhibiteur de l'attachement et de la pénétration des virus dans les cellules selon ces observations (Clément, 1993).

L'hypothèse avancée est que la fixation des PAC aux protéines des virus empêche la reconnaissance des virus par les récepteurs cellulaires. Il pourrait aussi y avoir un pontage entre les PAC et les virus ce qui expliquerait la présence d'amas cellulaires. Ces arguments expliquent l'inhibition de la phase d'attachement. L'extrait pourrait également avoir une activité inhibitrice des enzymes nécessaires à la pénétration du virus, ce qui expliquerait l'inhibition de cette seconde étape.

Ainsi, l'extrait de Cyprès, certainement par les PAC qu'il contient, aurait un effet virucide en inhibant les premières étapes de l'infection virale.

Peu de publications scientifiques traitent de l'utilisation d'extrait de Cyprès en phytothérapie. Des études *in vitro* ont permis d'observer un effet virucide des proanthocyanidines (PAC) ou d'un extrait de Cyprès. Lors d'une étude *in vivo*, une solution de PAC n'a pas présenté de toxicité chez la souris et aurait même un effet protecteur contre certains virus chez la souris. Le mécanisme de l'action des PAC sur les virus serait lié à leur capacité à se fixer sur les protéines du virus et ainsi empêcher son attachement aux cellules.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL

Première partie :
Etude *in vitro*, test de virucidie

La phytothérapie apparaît comme une piste de recherche intéressante pour enrichir l'arsenal thérapeutique du vétérinaire, en particulier dans le cadre du plan EcoAntibio. Bien que les études des produits phytothérapeutiques soient difficiles à mener comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, les laboratoires s'attellent à donner des preuves scientifiques de l'efficacité des produits qu'ils commercialisent.

Les maladies respiratoires constituent une pathologie majeure en élevage bovin en particulier chez les jeunes. Comme les surinfections bactériennes sont courantes et rapides, les vétérinaires prescrivent très souvent des antibiotiques lorsqu'ils sont face à un bovin présentant une atteinte respiratoire. D'autres traitements pourraient présenter un intérêt afin de limiter l'utilisation d'antibiotique lors de ces maladies, par exemple grâce à des antiviraux qui limiteraient le développement de surinfections ou encore des produits stimulant la réponse immunitaire de l'hôte.

Or, le Cyprès, qui a été peu étudié pour le moment, est historiquement utilisé pour un effet virucide, en particulier sur des virus respiratoires. C'est pourquoi des tests de virucidie ont été réalisés afin d'étudier l'effet antiviral de l'EPS de Cyprès sur deux virus infectant les bovins.

1. Contexte et objectif

De rares études ont été publiées sur l'effet virucide de l'extrait de Cyprès. Les seuls tests de virucidie publiés ont été réalisés sur des virus humains (Clément, 1993 ; Amouroux *et al.*, 1998).

Avant de valider l'efficacité d'un produit sur les animaux, il est possible et intéressant d'observer l'efficacité du produit sur le virus *in vitro*. Pour cela, un test de virucidie a été réalisé en laboratoire afin d'observer l'effet de l'EPS de Cyprès sur deux virus respiratoires : le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (VRSB) et l'Herpèsvirus Bovin de type 1 (BoHV-1). Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique sur les maladies respiratoires bovines, ces deux virus ont un impact important en élevage bovin en France.

Le mécanisme d'action exact des PAC du Cyprès ou de l'extrait de Cyprès total est méconnu pour le moment. Les hypothèses avancées par Clément lui donnent un effet plutôt virucide (Clément, 1993) tandis que Amouroux lui attribue un effet mixte virucide et virostatique (Amouroux, 1998).

Un test de virucidie est donc pertinent pour évaluer son activité antivirale (ou au moins une partie). L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'activité antivirale de l'EPS de Cyprès, selon la norme européenne (NF EN 14675 (Mai 2015) « Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire – Méthodes d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1).

Le principe du test est de mettre en contact le produit et la suspension d'essai du virus en présence d'une substance interférente. Le mélange est maintenu à la température d'essai pendant le temps de contact spécifié. L'activité virucide du produit est immédiatement arrêtée à la fin du temps d'essai déterminé. L'évaluation de l'effet virucide a été réalisée par la méthode de cellules en suspension (ou titrage par effet cytopathique).

La réduction de l'infectivité du virus est calculée et correspond à la différence des titres du virus (témoin viral), exprimés en logarithme, avant et après traitement par le produit. On considère le produit comme virucide si cette réduction dépasse un certain seuil.

2. Matériel et méthode

2.1 Mise en place du test

Le test de virucidie a été financé par le laboratoire Wamine, en collaboration avec le laboratoire PiLeJe. Tous deux forment le groupe PiLeJe appartenant à Larena Santé. Le laboratoire PiLeJe est destiné au développement de la phytothérapie et la micro-nutrition chez l'homme. Le laboratoire Wamine, créé en 2002, a le même objectif mais en médecine vétérinaire cette fois.

Le test a été réalisé par le laboratoire FONDEREPHAR à Toulouse (FONDation pour le DEveloppement de la Recherche PHARmaceutique). Ce laboratoire est accrédité pour les tests de virucidie selon une norme européenne : la norme NF EN 14675 (AFNOR, 2015). Cette norme, rédigée en mai 2015, valide les tests de virucidie réalisés pour les produits vétérinaires : il s'agit d'un « essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire ».

2.2 Matériel

2.2.1 Intérêt des virus testés

Les tests de virucidie ont été effectués sur trois virus bovins, deux virus touchant l'appareil respiratoire et un autre agissant sur l'appareil digestif. L'objectif initial était de tester uniquement des virus respiratoires, cependant, la banque virale ne disposait pas de toutes les souches d'intérêt.

Les virus testés sont :

- Le VRSB ou Virus Respiratoire Syncytial Bovin (cf Première partie, paragraphe 1.2.2.1) causant des pneumonies.
- Le virus BHV-1 ou BoHV-1 responsable de l'IBR (Rhinotrachéite Infectieuse Bovine). (cf Première partie, paragraphe 1.2.2.2).

Ces deux premiers virus peuvent être responsables de broncho-pneumonies enzootiques, ils sont donc pertinents pour l'étude de l'efficacité de l'EPS de Cyprès dans le traitement des maladies respiratoires bovines.

- Le rotavirus bovin provoquant des symptômes digestifs, en particulier des gastro-entérites néo-natales.

Cette thèse portant sur les maladies respiratoires bovines, nous ne nous intéresserons pas à l'étude de ce virus digestif.

2.2.2 Extrait testé

L'objectif étant de montrer l'efficacité de l'EPS de Cyprès, c'est ce dernier qui a été testé par le laboratoire. Cependant, le glycérol utilisé dans l'EPS pour la conservation pouvant interférer dans les tests *in vitro*, c'est l'extrait repris dans l'éthanol, le plus concentré en Cyprès qui a été testé (étape 6 dans le schéma de la partie 1.2.2.1).

L'extrait de Cyprès concentré envoyé au laboratoire est conservé dans un flacon de 70 mL. L'extrait de Cyprès se présentait sous la forme d'une solution brun opaque. Le produit final utilisé pour les tests est l'extrait de Cyprès concentré à 80%.

2.2.3 Virus et cellules utilisés

Les souches virales ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, Molsheim, France) et amplifiées sur des lignées cellulaires spécifiques (cellules de cornet de bovin ou BT-cell) provenant également de la collection ATCC.

Les virus respiratoires testés sont le VRSB et le BoHV-1 de la banque ATCC. Ils sont obtenus sous forme de suspension virale mère. Ces virus sont ensuite mis en contact avec des cellules afin d'obtenir une multiplication virale. Le résultat de cette multiplication est la suspension virale primaire. Une fois titrée et diluée afin d'obtenir les concentrations en virus désirées dans la suspension, on obtient la suspension virale d'essai ou suspension virale secondaire (SS). C'est cette dernière qui est utilisée pour le test de virucidie. Il s'agit d'une suspension virale concentrée donc le titre est connu.

2.3 Principe du test de virucidie

Le test se base sur la capacité d'un virus à détruire sa cellule hôte (Figure 15). Un antiviral peut avoir une effet virucide et/ou virostatique (Clément, 1993). Dans le premier cas, il tue les virus libres, c'est-à-dire ceux qui sont à l'extérieur de la cellule. Dans le second cas, il empêche la contamination de la cellule inhibant ainsi la multiplication virale. L'effet virostatique peut avoir lieu à plusieurs étapes de la contamination de la cellule par le virus (pénétration, décapsidation, synthèses et libération). Lorsqu'un produit agit sur l'étape d'attachement, l'effet peut être interprété comme virucide ou virostatique : il y a un effet sur le virus au moment où il se lie à la cellule pour y entrer, il est donc encore libre mais cela fait tout autant partie du cycle de réplication virale.

Le test utilisé ici tend à démontrer l'effet virucide du produit, donc une action sur les virus libres.

2.3.1 Le titrage viral

De nombreux titrages viraux sont réalisés tout au long du test de virucidie. Tout d'abord pour connaître la concentration virale de la suspension, puis pour connaître la nouvelle concentration suite à l'action de l'extrait de Cyprès.

Le titrage viral a été effectué en microplaques par la méthode des cellules en suspension. L'effet cytopathique a été déterminé après quatre jours d'incubation à 36 ± 1 °C. Des titrages comparatifs ont été réalisés sur les cellules en absence et en présence subcytotoxique d'extrait de Cyprès, afin de vérifier que le comportement du virus vis-à-vis des cellules réceptrices n'était pas modifié.

Le nombre d'unités infectieuses a été estimé par la méthode de Spearman-Kärber décrite en Annexe 2 : Exemple de calcul de la concentration d'une suspension virale. Des normes de référence sont définies pour une réduction logarithmique de la concentration de la suspension virale. Pour pouvoir les utiliser, on calcule le logarithme négatif du point limite 50 % ($\log\text{DICT}_{50}$) par la formule suivante :

$\log\text{DICT}_{50}$ = Logarithme négatif de la plus haute concentration de virus utilisée - [(Somme de % affecté à chaque dilution/100 - 0,5) X (log de dilution)]

Cette formule d'abord proposée par Spearman en 1908 puis par Kärber en 1931 est l'une des plus simples à utiliser tout en donnant une approximation très juste (Zhou, 2010). Elle permet d'approximer la concentration de façon précise de la suspension virale grâce à l'observation de l'effet cytopathique dans chaque puit. Le résultat de la concentration est obtenu sous forme logarithme négatif du point limite 50% ($\log\text{DICT}_{50}$). DICT_{50} signifie « Dose Infectieuse Cytopathogène à 50% ». Il

s'agit de la dose de virus qui, lorsqu'elle est injectée dans une culture cellulaire, peut détruire 50% des cellules. Les résultats sont exprimés en logarithme, ce qui simplifie la lecture des résultats. La méthode est expliquée schématiquement en Annexe 2 : Exemple de calcul de la concentration d'une suspension virale.

2.3.2 Cytotoxicité du produit à tester : extrait de Cyprès à 80%

Avant de réaliser le test, il faut s'assurer que l'extrait n'a pas d'effet cytotoxique contre les cellules réceptrices du test, en vérifiant que la concentration non cytotoxique du produit n'affecte ni la morphologie ni la croissance cellulaire afin que la mise en évidence de l'effet virucide de l'extrait ne soit pas perturbée par un effet néfaste de l'extrait sur les cellules.

2.3.2.1 Cytotoxicité directe

L'extrait de Cyprès progressivement dilué est mis en contact avec les cellules. La première concentration non cytotoxique est déterminée selon le même principe que le titrage viral. Ici, l'extrait de Cyprès à 80% est non cytotoxique après une dilution de $3,1 \cdot 10^{-4}\%$. Cette concentration est faible, ce qui peut compromettre l'effet antiviral. C'est pourquoi une cytotoxicité indirecte est évaluée.

2.3.2.2 Cytotoxicité indirecte

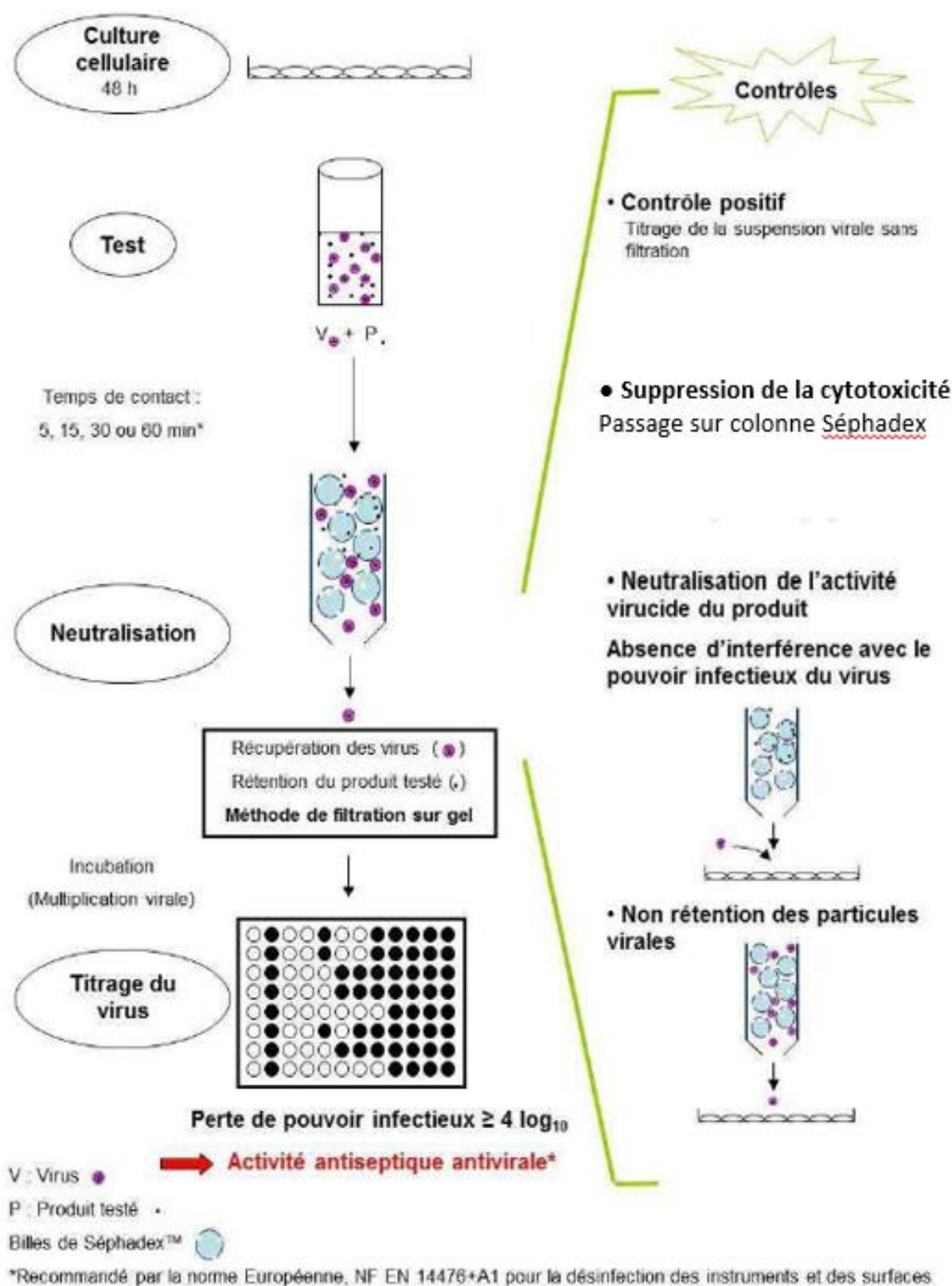
Il s'agit de s'affranchir de la cytotoxicité du produit afin qu'il n'interfère pas lors du test. La technique utilisée ici est le tamisage moléculaire sur colonne Séphadex LH20 (Geller, 2010). Ces colonnes constituent un filtre-tamis cellulaire qui retient l'extrait de Cyprès mais laisse passer les particules virales. Après tamisage moléculaire, l'extrait est non cytotoxique à partir d'une dilution à 0,5%. Ainsi, pour le test de virucidie, il est possible d'utiliser l'extrait de Cyprès à 80% dilué à 0,5% à condition de réaliser un tamisage de la solution « suspension virale + extrait de Cyprès » sur des colonnes Séphadex LH20, avant de la mettre en contact avec les cellules (Figure 15).

2.3.3 Validations du test

Afin que le test soit considéré comme valable, de nombreuses vérifications doivent être réalisées :

- Le titre de la suspension virale utilisée doit être supérieur à 10^8 virus/mL.
- Contrôle de l'efficacité à T0 : la suspension virale est titrée seule puis à T0, c'est-à-dire juste après la mise en contact avec le produit. La différence entre les deux titrages doit être inférieure à 0,5logDICT50.
- Inactivation du virus par une substance de référence : le virus utilisé doit être inactivé par une molécule de référence, ici, le formaldéhyde. Des limites de sensibilité sont définies pour le virus référent de la norme (l'entérovirus bovin de type 1). Les normes doivent être redéfinies pour chaque virus testé.
- La réduction de la concentration de la suspension virale détectable est de 4 logDICT50.

Figure 15 : Schéma du principe du test de virucidie (adapté de la thèse de Chloé Geller (Geller, 2010)).



2.4 Interférence de l'éthanol

Lors du premier test de virucidie, l'alcool avait été testé seul afin d'écarter une éventuelle interférence. Or, lors de ce test, il a été observé que l'effet virucide de l'alcool seul et celui du produit testé (extrait de Cyprès avec l'éthanol comme excipient) n'étaient pas différents.

Il a donc été décidé de faire évaporer l'éthanol du produit testé et le remplacer par de l'eau afin d'éviter toute interférence. L'effet virucide observé est donc bien uniquement celui de l'extrait de Cyprès.

3. Résultats

La norme AFNOR NF EN 14675 selon laquelle les tests de virucidie sont réalisés apporte une grande fiabilité des résultats obtenus.

3.1 Validation des tests selon la norme

Les vérifications nécessaires à la validation du test de virucidie ont été réalisées pour les deux tests. Toutes les conditions étaient remplies pour pouvoir interpréter les résultats obtenus.

Ces tests de validation ont permis de mettre en évidence une cytotoxicité directe de l'EPS de Cyprès à 80% pour les cellules en culture. Cette toxicité est supprimée après une dilution de $1,22 \cdot 10^{-3}\%$.

3.2 Impact de l'extrait sur le titre viral

Comme nous l'avons vu, l'activité virucide d'un produit est validée par la norme si la réduction de la concentration de la suspension virale est d'au moins 4 log après action du virucide supposé. Après calcul des concentrations de la suspension virale en VRSB et en BoHV-1 sans contact avec l'extrait de Cyprès et après 60 minutes de contact avec un extrait de Cyprès concentré à 80%, 40%, 20% et 1%, les résultats de l'action virucide de l'extrait sont obtenus.

3.2.1 Activité contre le VRSB

Selon la norme, la réduction logarithmique de la DICT50 est significative pour le VRSB lorsque l'extrait est concentré à 80% et 40% (Figure 16).

Figure 16 : Résultats de la réduction logarithmique de la DICT50 pour le VRSB suite à l'action de l'extrait de Cyprès.

Résultats réduction logDICT50 VRSB

Concentrations	80% (V/V)	40% (V/V)	20% (V/V)	1% (V/V)
Réduction lg	≥ 4,4	4,2	2,3	1,3

Pour reprendre la conclusion du rapport d'essai : « Selon le protocole de la norme NF EN 14675 (mai 2015) et dans les conditions de l'essai, le produit CYPRES concentré – lot n° C-15M426 à la

concentration de 80% et 40% en condition de saleté faible niveau - présente une action virucide au temps de contact 60 min +/- 10 sec vis-à-vis du VRSB à 37 °C +/- 1 °C »

3.2.2 Activité contre BoHV-1

Selon la norme, la réduction logarithmique de la DICT50 est significative pour le BoHV-1 lorsque l'extrait est concentré à 80% (Figure 17).

Figure 17 : Résultats de la réduction logarithmique de la DICT50 pour le BoHV-1 suite à l'action de l'extrait de Cyprès.

Résultats réduction logDICT50 BoHV-1

Concentrations	80% (V/V)	40% (V/V)	20% (V/V)	1% (V/V)
Réduction lg	≥ 4,2	3,4	2,5	1,0

Pour reprendre la conclusion du rapport d'essai : « Selon le protocole de la norme NF EN 14675 (mai 2015) et dans les conditions de l'essai produit CYPRES concentré – lot n° C-15M426 à la concentration de 80% en condition de saleté faible niveau - présentent une action virucide au temps de contact 60 min +/- 10 sec vis-à-vis du BoHV-1 à 37 °C +/- 1 °C »

3.2.3 Conclusion des tests de virucidie *in vitro*

Un effet virucide de l'extrait de Cyprès concentré à 80% est observé pour chacun des virus (VRSB et BoHV-1) à une température de 37° +/- 1° et après un temps de contact de 60 minutes +/- 10 secondes.

4. Discussion

Le test *in vitro* est une étape dans la démonstration de l'efficacité d'une substance. Il faut noter que les résultats sont obtenus pour un extrait hydro-alcoolique de cônes de Cyprès (Guinobert *et al.*, 2018a) et pas pour l'EPS de Cyprès tel qu'il est administré aux animaux : un extrait glyciné. La concentration de l'EPS en Cyprès (80% de glycérol) est plus faible que celle de l'extrait testé (30% d'eau). Le glycérol peut avoir un effet sur les virus dans cet extrait. La glycérine ou glycérol est un composant des triglycérides, naturellement présents chez les animaux (dont l'homme) via leur alimentation. Il se présente sous forme de liquide. Pour ce qui est d'une éventuelle toxicité, ce liquide est souvent utilisé dans des médicaments, en particulier dans des sirops, comme excipient à effet notoire (ANSM (AFSSAPS), 2009). Un effet laxatif est mis en évidence chez l'homme si le seuil d'utilisation est dépassé par voie orale ou rectale. Le glycérol est aussi inscrit au Codex Alimentarius comme épaississant ou humectant. Un effet toxique peut être écarté si les seuils de consommation ne sont pas dépassés. Le brevet « Compositions pharmaceutiques à base de gels de type glycéryl poly(méth)acrylate WO 1997047310 A1 » revendique une activité virucide de gels à base de glycérol en application locale (Greff, 1997). Le glycérol aurait donc un effet virucide propre.

Un effet cytotoxique direct de l'extrait hydro-alcoolique de cônes de Cyprès est observé aux concentrations ayant un effet virucide *in vitro*. C'est-à-dire qu'à la concentration où il est efficace contre le virus, l'extrait testé a un effet néfaste pour la culture cellulaire *in vitro*. Il faut garder à l'esprit que cet effet cytotoxique peut être largement diminué *in vivo* du fait des différents types cellulaires, en particulier des muqueuses digestives, ayant un rôle de barrière protectrice. De plus, *in vivo* le produit utilisé est beaucoup plus dilué dans le glycérol et lors de l'administration, il se mélange au bol alimentaire. La concentration directe en Cyprès est donc bien plus faible que celle qui est utilisée pour ces tests. Rappelons que lors du test *in vivo* d'Amouroux sur des souris, aucun effet toxique de la proanthocyanidine polymère concentrée n'avait été mis en évidence (Amouroux, 1998). De plus, des essais internes du laboratoire PiLeJe selon une directive EEC/93/21 montre qu'une dose aiguë d'EPS de Cyprès à 2 g/kg ne présente pas de cytotoxicité.

La température du test est proche de la température *in vivo*. Le temps de contact et d'une heure, aucune étude ne permet de valider ou de rejeter ce temps de contact. Il correspond à la norme des tests de virucidie donc permet de valider les résultats.

5. Conclusion

Ces tests de virucidie *in vitro* sont un point de départ intéressant dans la démonstration de l'effet virucide de l'EPS de Cyprès chez les bovins. Ils ont permis de mettre en évidence une action virucide contre le VRSB et le BoHV-1 *in vitro* à une température proche de la température *in vivo* avec un temps de contact de 60 minutes.

Ce test *in vitro* est un premier pas vers une démonstration de l'effet virucide de l'extrait de Cyprès chez les bovins. Il faut garder à l'esprit que l'absorption des PAC est très faible chez l'homme et n'a pas du tout été étudiée chez les bovins. Pour montrer la possibilité d'un effet virucide *in vivo* de l'EPS de Cyprès, l'étude de cette absorption serait très intéressante. Ces tests sont coûteux et ne seront certainement pas réalisés à court terme.

En attendant, la prochaine partie de cette thèse nous permettra de connaître les retours des vétérinaires utilisant l'extrait sur le terrain. S'ils sont bons, l'association de la démonstration d'un effet virucide *in vitro* et de bons résultats d'efficacité sur le terrain seraient encourageants pour poursuivre les recherches pour démontrer l'effet virucide de l'EPS de Cyprès chez les bovins.

Deuxième partie :

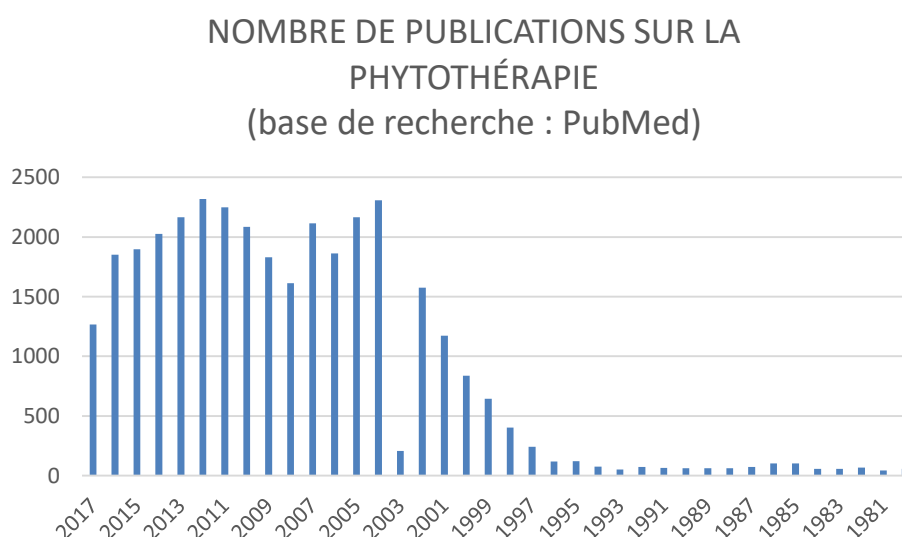
Étude terrain par questionnaire

1. Contexte et objectif

Dans le cadre du plan EcoAntibio, la phytothérapie est une thérapeutique en plein essor. Les publications à ce sujet sont en augmentation depuis les années 2000. Le graphique ci-dessous (Figure 18) montre l'évolution du nombre de publications contenant le mot « phytotherapy » (phytothérapie en anglais) dans la base de données « Pubmed » au cours des dernières années. Cette thérapeutique est de plus en plus utilisée en médecine vétérinaire. Pourtant, les données sur l'usage actuel de la phytothérapie en médecine vétérinaire sont rares. C'est pourquoi nous avons conçu ce questionnaire, avec pour premier objectif d'interroger les vétérinaires pratiquant la phytothérapie sur l'usage qu'ils en font et de leur connaissances et avis sur la réglementation actuelle.

Ensuite, nous avons vu que parmi les études traitant de la phytothérapie, le Cyprès semble présenter un intérêt dans le traitement de maladies respiratoires bovins par son activité antivirale démontrée *in vitro*. Ainsi, les vétérinaires praticiens sont aussi interrogés dans ce questionnaire, sur l'usage qu'ils ont de l'EPS de Cyprès et de leurs avis sur son efficacité.

*Figure 18 : Publications scientifiques traitant de la phytothérapie en fonction des années
(base de recherche : PubMed).*



2. Matériel et méthode

2.1 Population de l'étude

La population cible de cette étude est l'ensemble des vétérinaires pratiquant la phytothérapie en élevage bovin. Pour cela, l'échantillon a été choisi au sein de la liste des clients du laboratoire Wamine, exerçant en médecine rurale (population source). Parmi cette population source, certains ont été écartés puisqu'ils n'étaient pas concernés par le questionnaire : pas ou plus d'exercice en médecine bovine, pas d'utilisation de la phytothérapie chez les bovins... Tous les autres vétérinaires ont été contactés.

Il faut noter un biais entre la population source et la population cible. Les vétérinaires utilisant la phytothérapie et n'étant pas clients du laboratoire Wamine ont peut-être des produits différents à leur disposition, ce qui pourrait entraîner des résultats différents avec une autre source.

2.2 Élaboration du questionnaire

Les objectifs du questionnaire ont été listés afin de pouvoir ensuite suivre une ligne directrice. Ensuite, le questionnaire a été rédigé en plusieurs parties grâce au logiciel Google Forms. L'avantage était la diffusion facile du questionnaire via un lien internet ainsi qu'une mise en place aisée. Le but était de faire un questionnaire efficace mais aussi suffisamment court afin de favoriser les réponses données par les vétérinaires qui souvent ont peu de temps disponible.

L'objectif principal était de connaître le ressenti des vétérinaires par rapport à l'efficacité de l'EPS de Cyprès en médecine vétérinaire bovine. D'abord une approche plutôt « sociale » visait à en apprendre plus sur les vétérinaires qui utilisent la phytothérapie, sur leur clientèle et leur formation en phytothérapie. Ensuite, les questions s'orientaient sur l'utilisation de l'EPS de Cyprès, la raison pour laquelle il est utilisé, la façon de l'utiliser et enfin l'efficacité ressentie par le vétérinaire. Pour clôturer le questionnaire, quelques questions sur la réglementation de l'usage de la phytothérapie étaient posées afin d'évaluer la connaissance des vétérinaires sur celle-ci, mais surtout leur avis. Il s'agit en effet d'un aspect important lors de l'utilisation de traitements phytothérapeutiques. Le questionnaire complet est disponible en Annexe 3 : Questionnaire envoyé aux vétérinaires.

Une fois le questionnaire rédigé, il a été envoyé par mail fin juillet 2017 à l'ensemble des vétérinaires ruraux travaillant avec le laboratoire Wamine. Une cinquantaine de réponses ont été recensées jusqu'en septembre 2017. Puis début décembre 2017, les vétérinaires n'ayant pas encore répondu au questionnaire, soit environ 300 cliniques, ont été contactés par téléphone. Certains ont alors signalé qu'ils n'exerçaient pas en médecine bovine ou qu'ils n'utilisaient pas de phytothérapie chez les bovins. Le mail était ensuite envoyé de nouveau avec leur accord ou celui de leur assistante. Le questionnaire a été clôturé mi-janvier 2018.

2.3 Collecte des données

Les données ont été collectées *via* le site Google Forms. Les réponses au questionnaire en ligne sont enregistrées automatiquement sur le site. Elles sont ensuite disponibles sous forme d'un tableur ou mises en forme automatiquement par l'application.

2.4 Gestion des données

Les données obtenues ont été traitées sous forme de tableur Excel. Les données ont été exploitées dans le but d'apporter des informations supplémentaires aux questions soulevées dans cette thèse. Chaque item a été étudié afin d'obtenir une mise en forme des valeurs des réponses à chaque question.

3. Résultats

3.1 Taux de réponse

Au total, le questionnaire a été transmis à 369 cliniques vétérinaires. Lors du premier envoi, une cinquantaine de vétérinaires avaient répondu. Suite à la relance téléphonique, le nombre de

réponses s'élevait à 108. Parmi les vétérinaires n'ayant pas répondu, 94 vétérinaires n'étaient pas ou plus concernés par le sujet : arrêt de la médecine rurale, pas d'utilisation de la phytothérapie pour les bovins, cessation d'activité. Le taux de réponse est donc de 39,3 % sur les 275 vétérinaires ciblés.

3.2 Les vétérinaires utilisant la phytothérapie et leur clientèle

3.2.1 Région d'exercice et clientèle

Dans le questionnaire, les vétérinaires ont été interrogés sur leur région d'exercice (question 3, Figure 19) et la composition de leur clientèle : pourcentage d'exercice en médecin bovine et parmi ces élevages, pourcentage d'élevages à activité laitière (questions 4 et 5). Les résultats sont présentés dans la Figure 20 et la Figure 21.

Figure 19 : Répartition régionale des vétérinaires répondants.



La Figure 20 présente la répartition des vétérinaires répondants selon le pourcentage de leurs activités consacré à la médecine bovine. La Figure 21 présente la répartition des vétérinaires répondants selon leur pourcentage d'activité en secteur laitier par rapport au secteur allaitant.

Figure 20 : Pourcentage d'activité en médecine bovine chez les vétérinaires sondés.

PROPORTION D'ACTIVITÉ EN MÉDECINE BOVINE DANS LA CLIENTÈLE

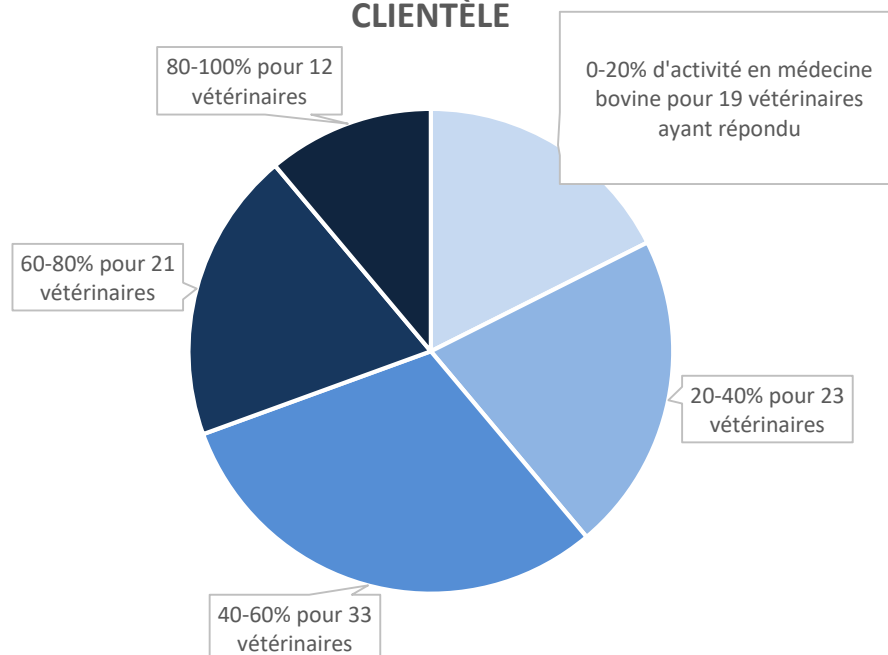
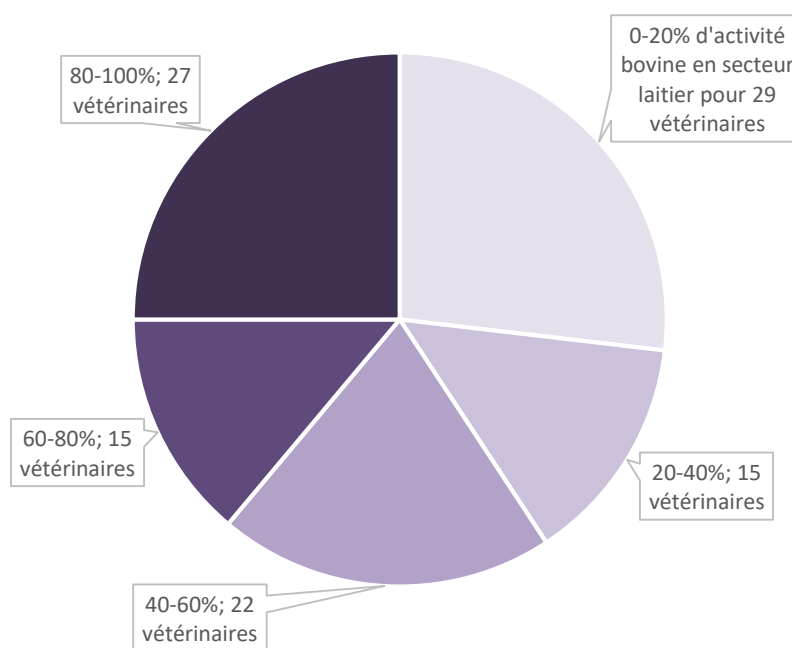


Figure 21 : Pourcentage d'activité en secteur laitier parmi la clientèle bovine des vétérinaires sondés.

PROPORTION D'ACTIVITÉ EN SECTEUR LAITIER DANS LA CLIENTÈLE DES VÉTÉRINAIRES



3.2.2 Les vétérinaires

Les vétérinaires ont été interrogés sur leur formation : leur année de sortie et l'école dans laquelle ils ont été formés à la médecine vétérinaire (questions 1 et 2, Figure 23 et Figure 22). Les années de sortie d'école variaient de 1974 à 2016. Afin de pouvoir exploiter les données les vétérinaires ont été regroupés en six groupes de sept ans, l'année de début est incluse, celle de fin exclue sauf pour le dernier groupe (un seul vétérinaire est sorti d'école en 2016).

Figure 22 : Ecole d'origine des vétérinaires sondés.

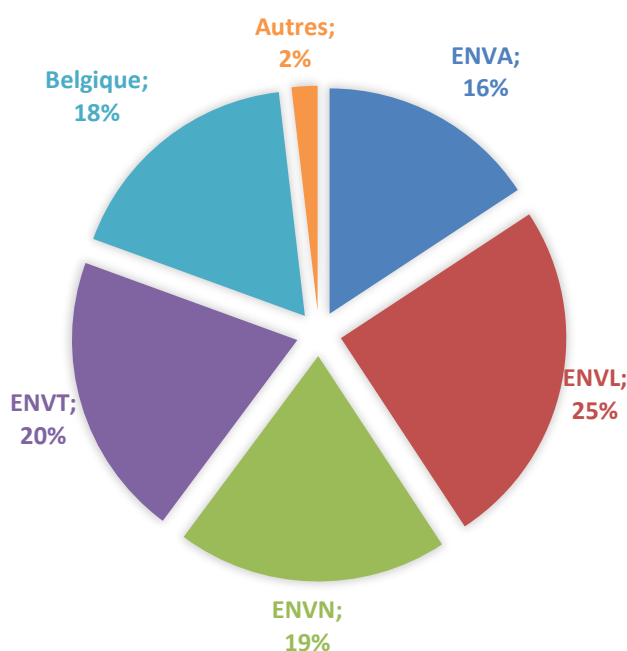
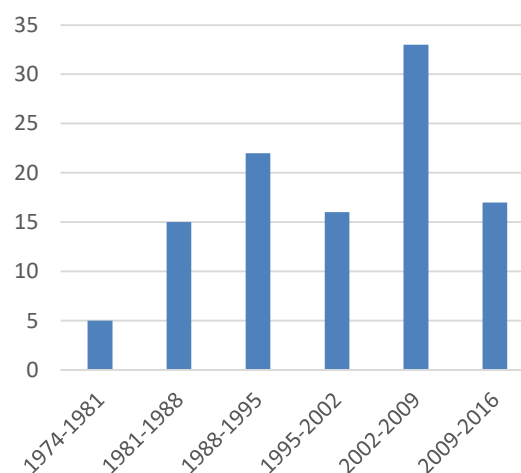


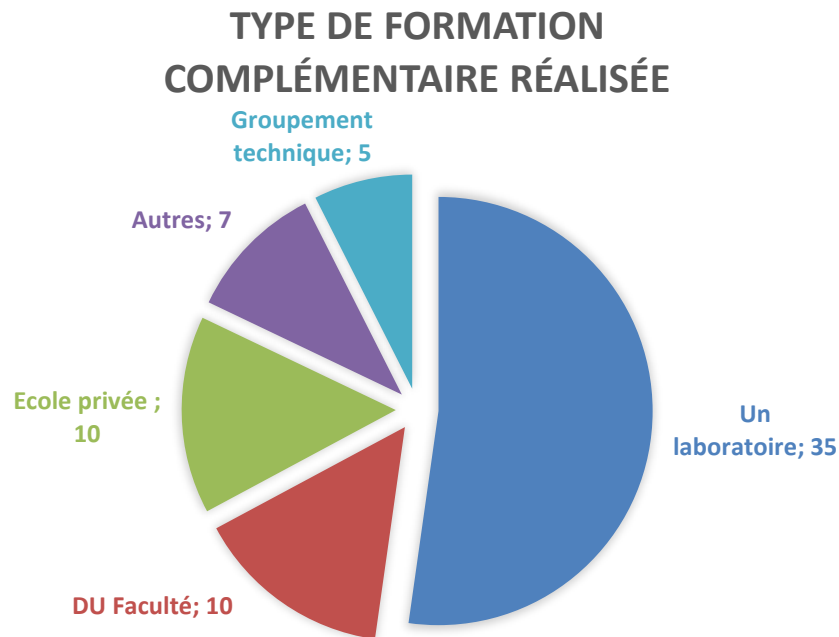
Figure 23 : Nombre de vétérinaires sortis de l'école par période.

NOMBRE DE VÉTÉRINAIRES PAR ANNÉE DE SORTIE D'ÉCOLE



Les questions 11 et 12 portaient sur la formation spécifique à la phytothérapie. Les écoles privées proposant des formations à la phytothérapie et autres médecines alternatives sont l'IMAOV (Institut des Médecines Alternatives et Ostéopathie Vétérinaire) et l'AVETAO (Formation vétérinaire en acupuncture et ostéopathie). Dans la catégorie « Autres », on trouve des formations proposées par des écoles privées de médecine humaine ou par des associations, un vétérinaire s'est formé uniquement en se basant sur la littérature et enfin des conférences de Pierre May, professeur à l'AVETAO. Parmi les vétérinaires sondés, 62% ont suivi une formation à la phytothérapie après leur scolarité. La Figure 24 présente le nombre de vétérinaires ayant suivi chaque formation.

Figure 24 : Les différentes formations suivies par les vétérinaires répondants.

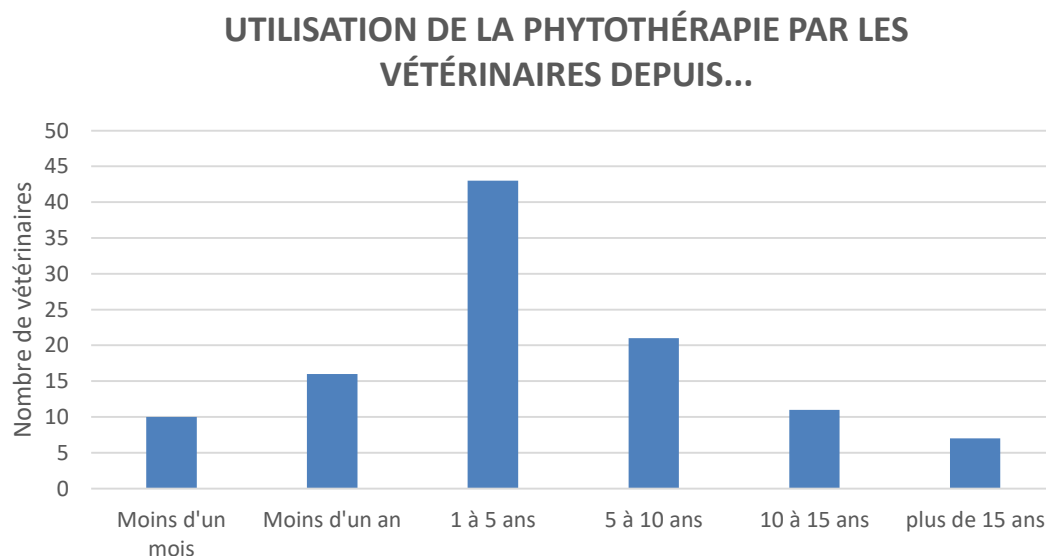


3.3 Utilisation de la phytothérapie

3.3.1 Origine de l'utilisation par la vétérinaire

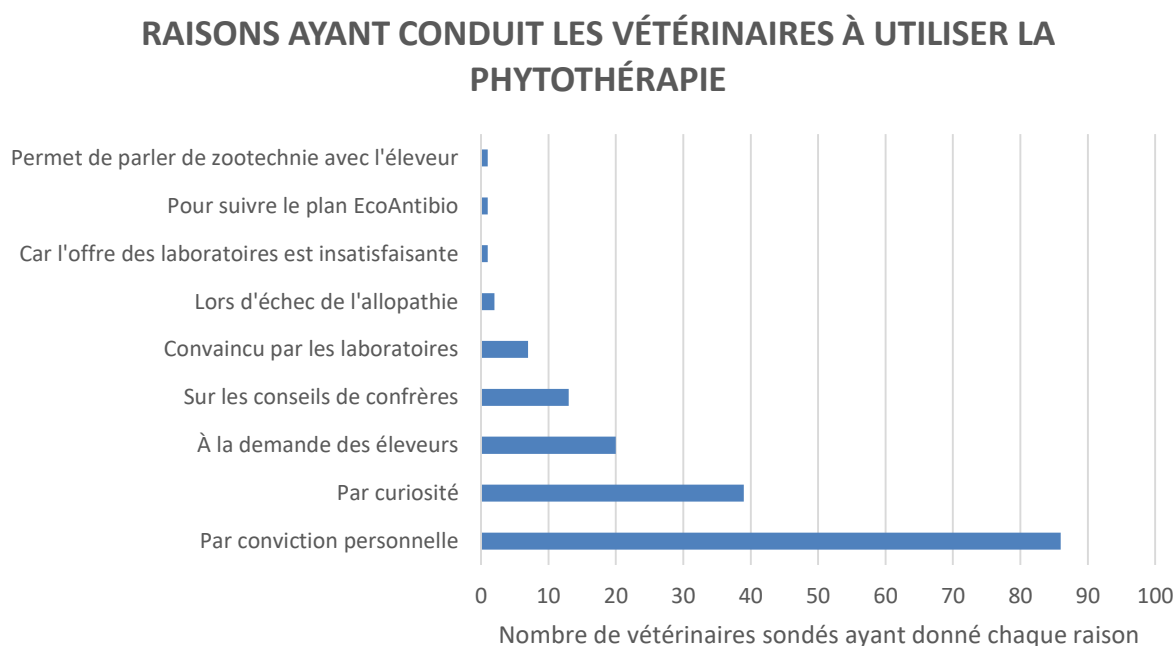
La phytothérapie connaît un renouveau auprès des consommateurs, mais depuis quand les vétérinaires sondés utilisent-ils cette thérapeutique ? (Question 9). La Figure 25 présente la répartition des vétérinaires selon la durée de leur utilisation de la phytothérapie.

Figure 25 : Répartition des vétérinaires selon leur durée de pratique de la phytothérapie.



Si les consommateurs et clients semblent chercher un retour à la Nature et une médecine ayant une base « historique », les vétérinaires ont donné les raisons qui les ont poussés à utiliser la phytothérapie dans la question 10. Plusieurs réponses étaient possibles, la Figure 26 présente la répartition des réponses, la plus fréquente étant la conviction personnelle.

Figure 26 : Raisons ayant poussé les vétérinaires à pratiquer la phytothérapie



3.3.2 Utilisation de la phytothérapie dans la clientèle

Pour que les vétérinaires puissent pratiquer la phytothérapie, leur clientèle doit être disposée à le faire. Les questions 6 et 7 portaient sur la demande des éleveurs en terme de phytothérapie (Figure 27) et ceux qui la pratiquent dans leurs élevages (Figure 28).

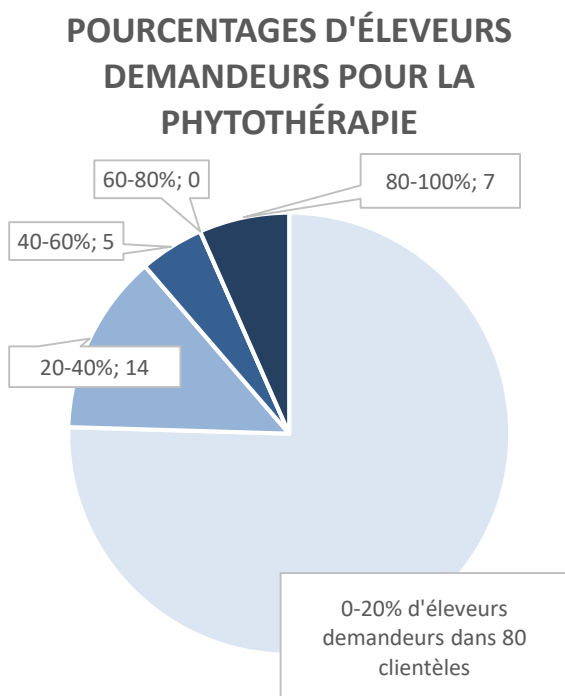


Figure 27 : Pourcentages d'éleveurs intéressés par la phytothérapie selon les vétérinaires interrogés.

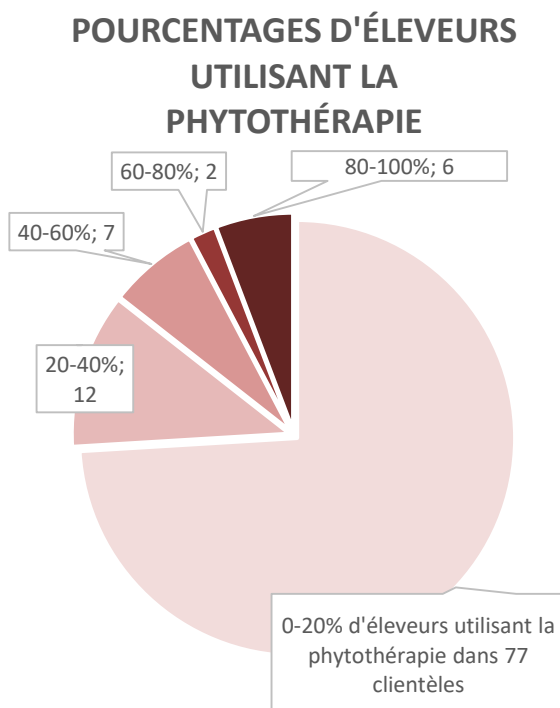
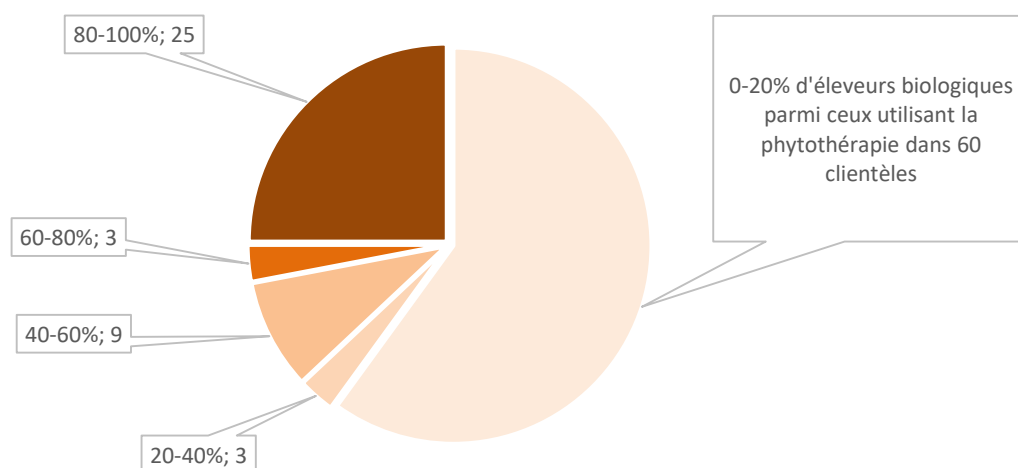


Figure 28 : Pourcentages d'éleveurs utilisant la phytothérapie dans leur élevage dans la clientèle des vétérinaires interrogés.

Comme on attribue souvent la phytothérapie aux élevages biologiques du fait de la réglementation, la question 8 s'intéressait à la proportion d'élevages certifiés biologiques parmi ceux où la phytothérapie est pratiquée (Figure 29).

Figure 29 : Proportion d'élevages biologiques parmi ceux qui utilisent la phytothérapie, dans chaque clientèle.

POURCENTAGES D'ÉLEVEURS BIOLOGIQUES PARMI CEUX QUI UTILISENT LA PHYTOTHÉRAPIE



3.3.3 Les vétérinaires et la réglementation autour de la phytothérapie

La réglementation de la phytothérapie évolue beaucoup depuis quelques années. Les vétérinaires ne sont donc pas forcément bien au courant. Il leur a été demandé quel était leur avis sur le statut réglementaire des traitements phytothérapeutiques (Figure 30 et Figure 31).

Figure 30 : Perception du statut réglementaire des traitements phytothérapeutiques par les vétérinaires.

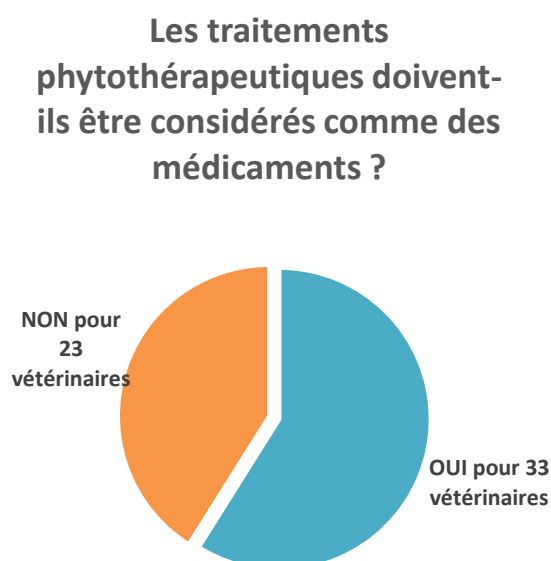
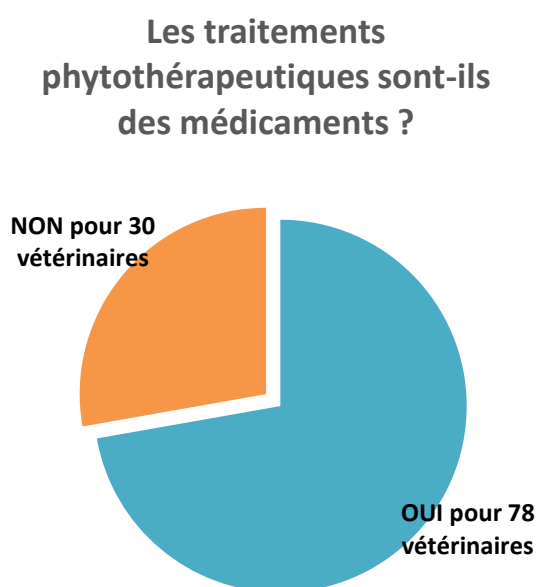
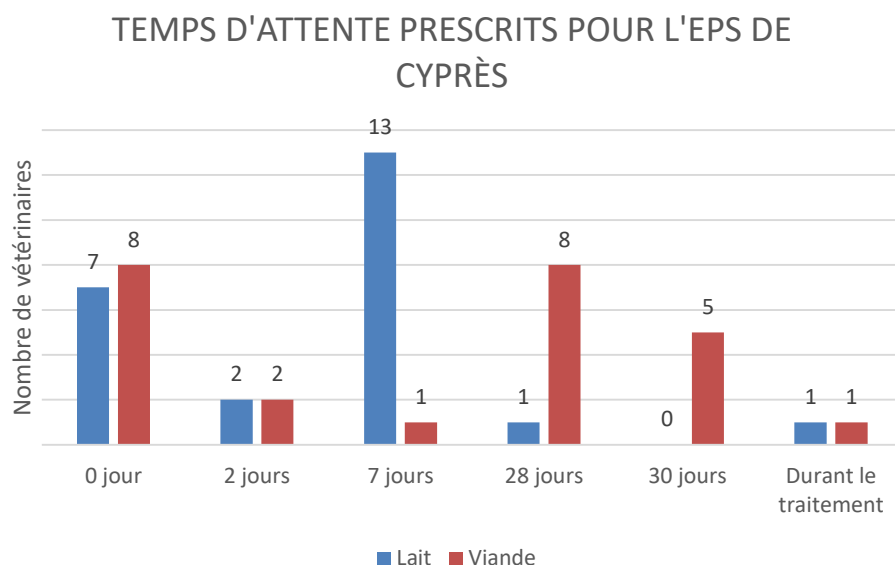


Figure 31 : Avis des vétérinaires sur le statut des traitements phytothérapeutiques.



Lors de l'usage d'un médicament pour des animaux de production, des temps d'attente sont définis en fonction des limites maximales de résidus déterminées. Pour le moment, aucune limite maximale de résidu n'est définie pour l'extrait, son utilisation comme médicament est donc réglementairement interdite. Pour un médicament dont les LMR sont connues, dans le cadre de la cascade, lorsqu'aucun temps d'attente n'est défini, des temps forfaitaires sont appliqués : 7 jours pour le lait et 28 jours pour la viande. Les réponses des vétérinaires sont rassemblées dans la Figure 32.

Figure 32 : Nombre de vétérinaires prescrivant chaque temps d'attente pour l'EPS de Cypres.



3.4 Utilisation de l'EPS Cyprès

Tous les vétérinaires pratiquant la phytothérapie n'utilisent pas les mêmes extraits de plantes. Environ la moitié des vétérinaires interrogés utilisent l'EPS de Cyprès pour soigner des bovins (question 13, Figure 33).

Figure 33 : Pourcentage de vétérinaires utilisant ou non l'EPS de Cyprès parmi les vétérinaires sondés

UTILISATION DE L'EPS DE CYPRÈS PAR LES VÉTÉRINAIRES



3.4.1 Objectif lors de l'usage de cet EPS

Lors de la prescription d'un traitement, le vétérinaire recherche un ou plusieurs effets dans une zone de l'organisme. Plusieurs réponses étaient possibles pour les questions 14 et 15 qui permettent de définir les attentes qu'ont les vétérinaires qui utilisent l'EPS de Cyprès. Pour chaque item, le résultat est donné sous forme du pourcentage de vétérinaires ayant validé cet item, parmi ceux qui utilisent le Cyprès (Figure 34 et Figure 35).

Figure 34 : Zone de l'organisme visée par le traitement.

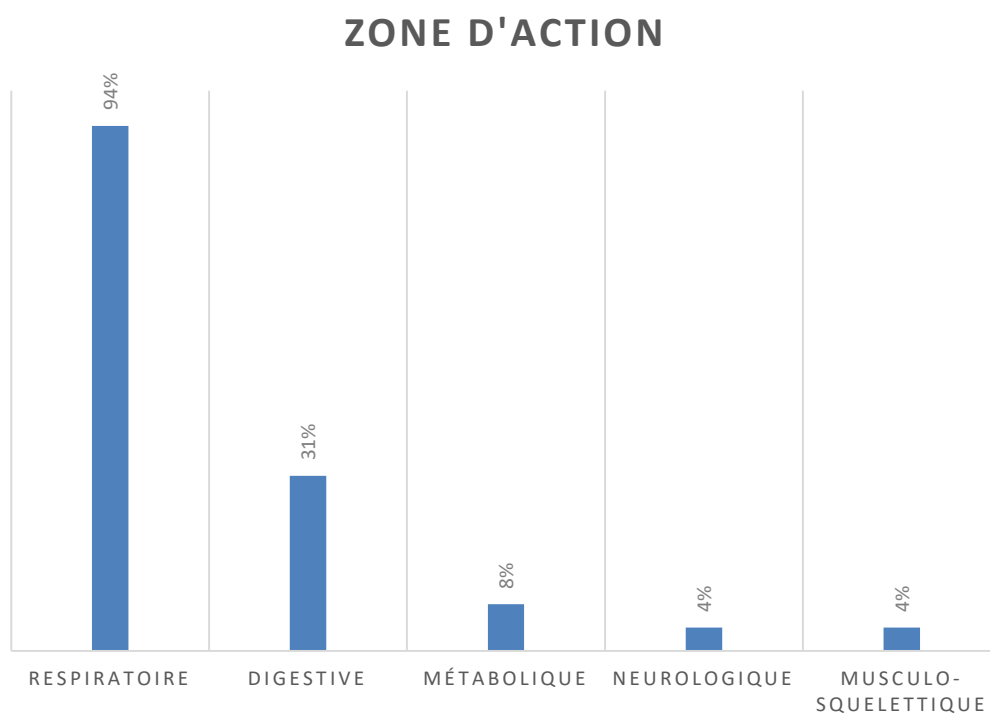
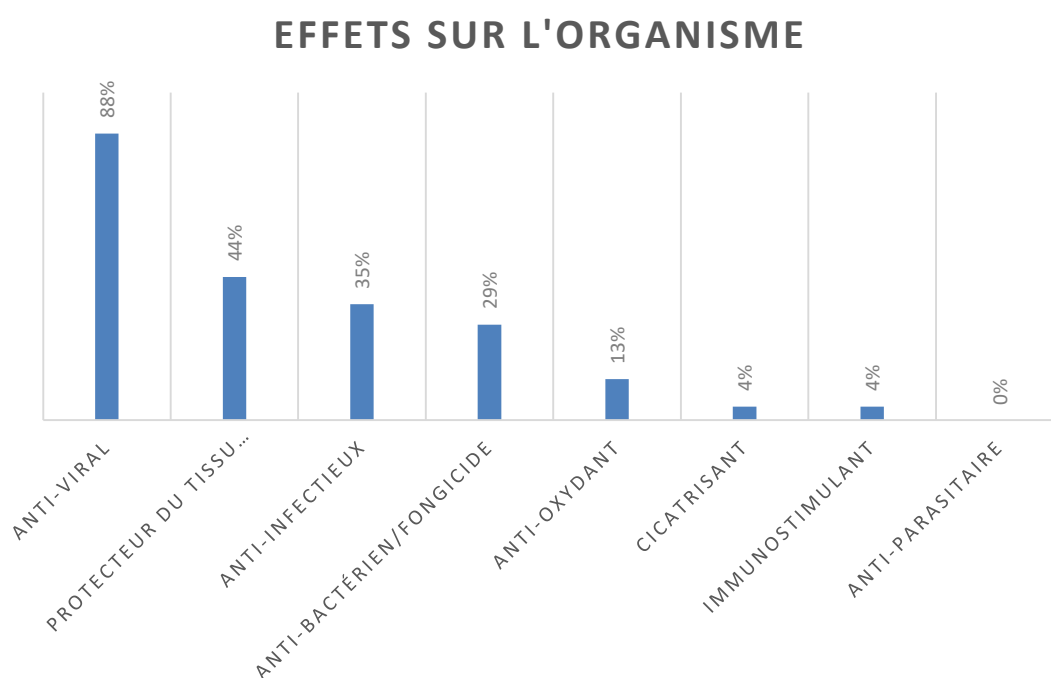
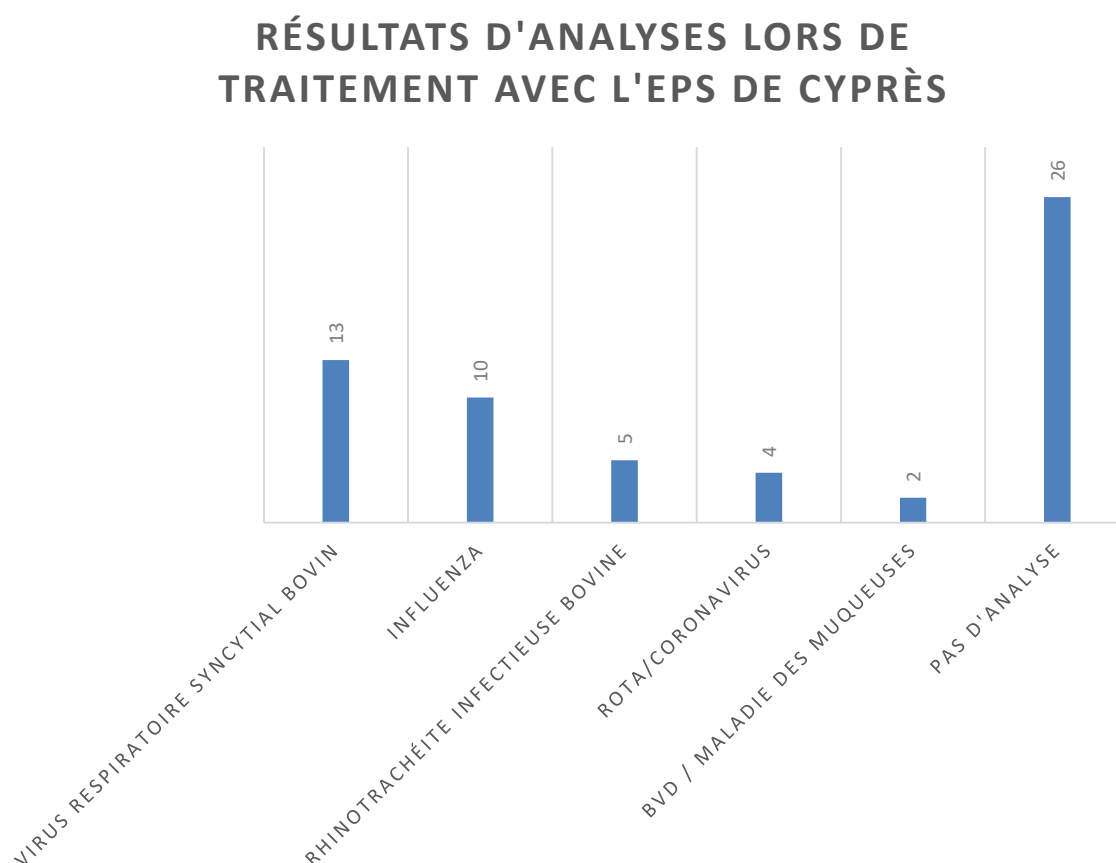


Figure 35 : Effets sur l'organisme attendus.



Les vétérinaires ont été invités à donner les résultats des analyses éventuelles qu'ils ont pu faire avant d'utiliser l'extrait de Cyprès. La nature de l'analyse n'était pas demandée Figure 36.

Figure 36 : Résultats d'analyses positives pour ces pathogènes avant un traitement avec l'EPS de Cyprès.



3.4.2 Modalités d'utilisation

3.4.2.1 Posologie

L'EPS de Cyprès n'étant pas commercialisé comme un médicament, il n'y a pas de résumé des caractéristiques du produit (RCP) qui donne les recommandations d'utilisation du produit. Dans les questions 27 à 30, les vétérinaires ont décrit la façon dont ils prescrivent cet extrait et la raison pour laquelle ils le font ainsi.

Plusieurs réponses étaient possibles. Les résultats sont exprimés en pourcentage de vétérinaires ayant choisi la réponse, parmi ceux qui utilisent l'extrait de Cyprès (Figure 37, Figure 39 et Figure 38). L'« origine » de la posologie qu'ils ont choisie est présentée sur la Figure 40. Les vétérinaires pouvaient donner plusieurs réponses.

Figure 37 : Quantité d'EPS administrée à chaque prise (en millilitre).

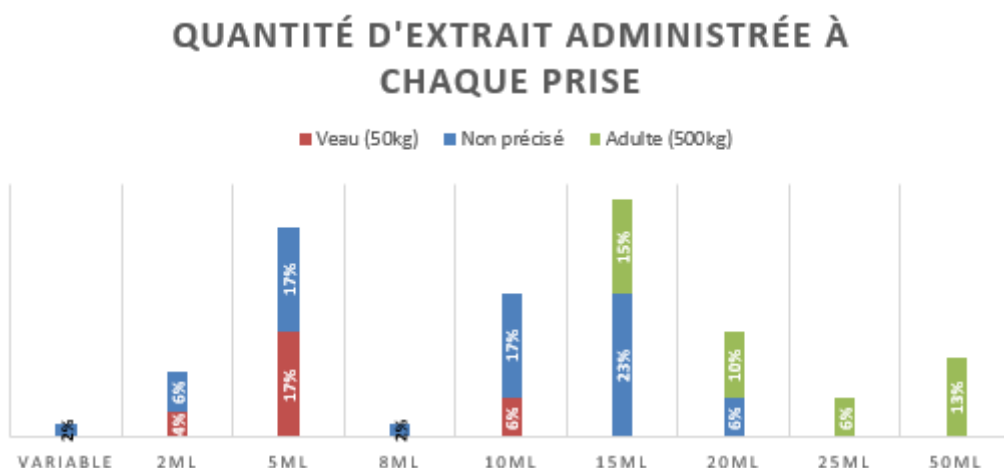


Figure 39 : Nombre d'administrations par jour.

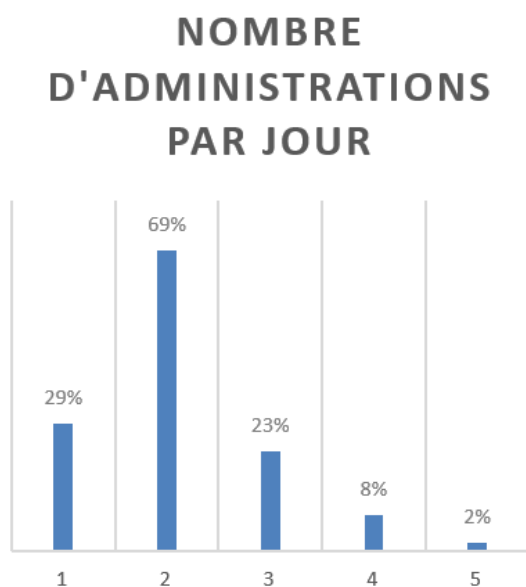


Figure 38 : Nombre de jours de traitement.

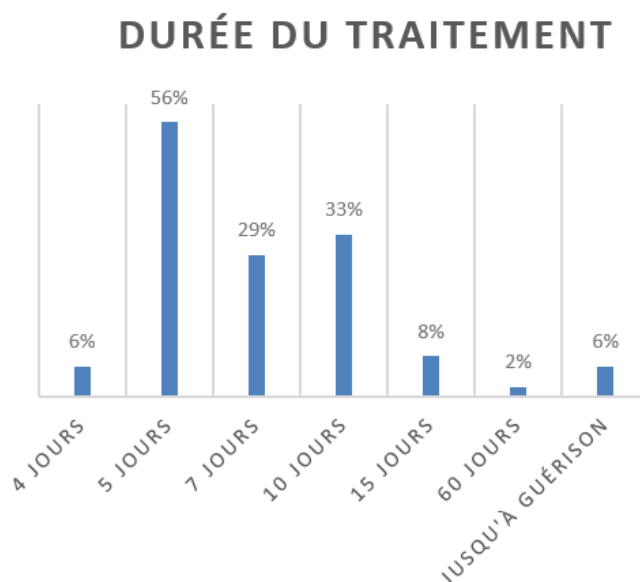
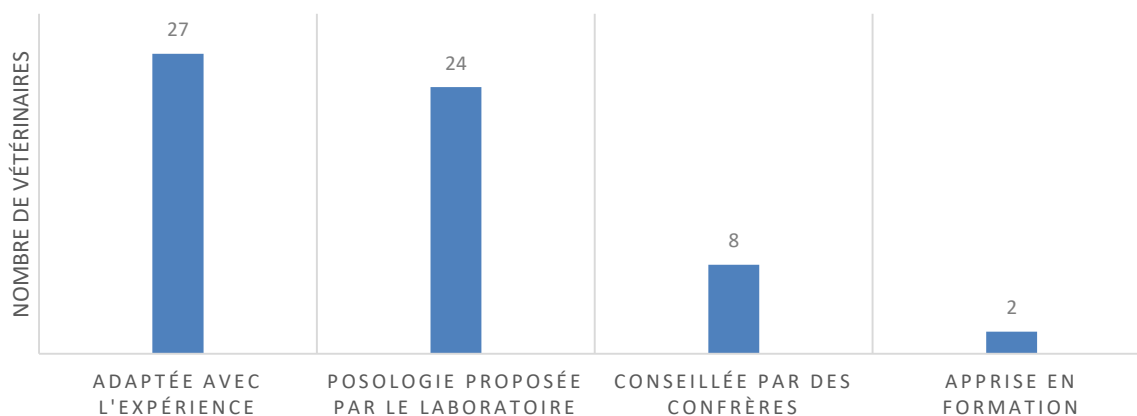


Figure 40 : Raisons ayant motivé la prescription de la posologie choisie.



3.4.2.2 Autres traitements prescrits concomitamment

Les extraits phytothérapeutiques ne sont que très rarement voire jamais utilisés seuls. L'EPS de Cyprès n'échappe pas à la règle. D'abord, il peut être utilisé en mélange avec d'autres extraits auxquels s'ajoutent parfois d'autres types de médecines dites alternatives. Les questions 24,25 et 26 visaient à déterminer quelle utilisation des médecines alternatives était faite par les vétérinaires répondants

Figure 41 : Nombre de vétérinaires utilisant l'extrait de Cyprès seul ou en mélange.

UTILISATION DE L'EPS DE CYPRÈS (EN NOMBRE DE VÉTÉRINAIRES)

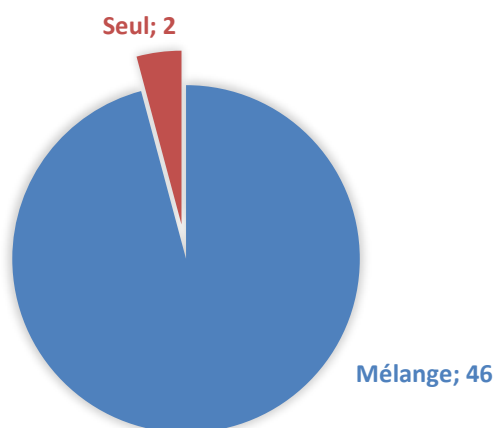
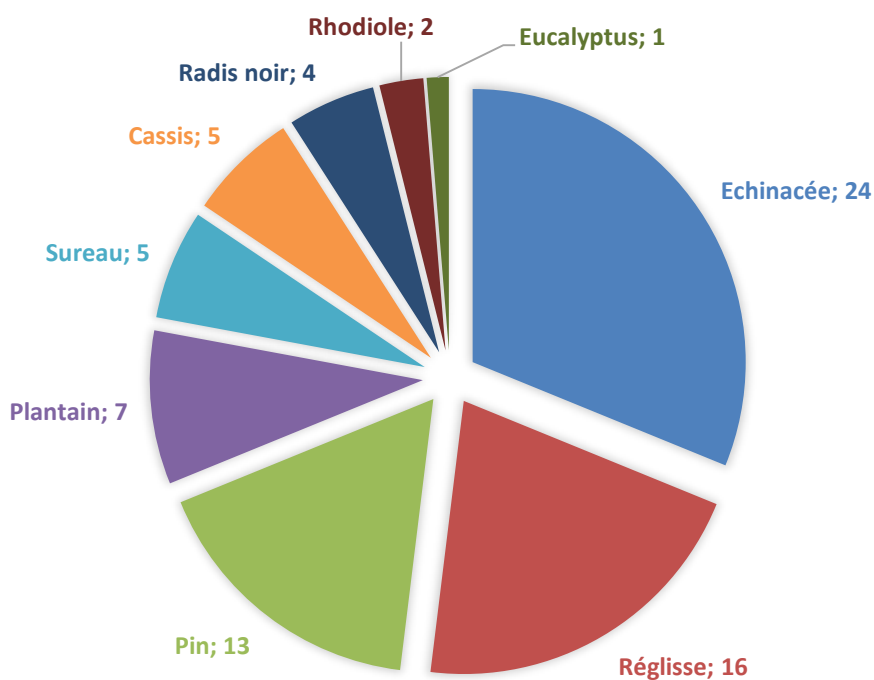


Figure 42 : Les différents EPS mélangés avec l'EPS de Cyprès selon le nombre de vétérinaires les utilisant.

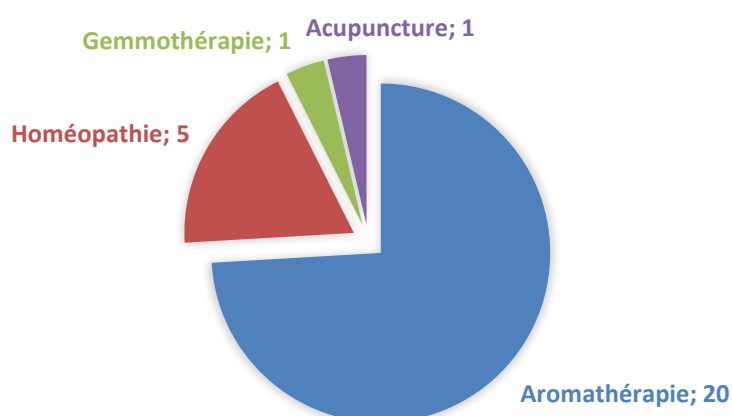
SUBSTANCES MÉLANGÉES AVEC L'EPS DE CYPRÈS (EN NOMBRE DE VÉTÉRINAIRES UTILISANT LE PRODUIT EN MÉLANGE)



La majorité des vétérinaires utilisant l'EPS de Cyprès le mélange avec d'autres extraits phytothérapeutiques (Figure 41 et Figure 42). De plus ils ont également recours à d'autres traitements « alternatifs » en parallèle comme l'homéopathie, l'aromathérapie, la gemmothérapie (utilisation des tissus embryonnaires des plantes) et l'acupuncture (Figure 43). C'est le cas pour 50% des vétérinaires utilisant l'EPS de Cyprès.

Figure 43 : Utilisations d'autres médecines alternatives par les vétérinaires, en association avec l'EPS de Cyprès.

AUTRES MÉDECINES ALTERNATIVES UTILISÉES (EN NOMBRE DE VÉTÉRINAIRES)



Peu de vétérinaires se cantonnent uniquement aux traitements alternatifs. Il est courant qu'ils soient associés à un traitement allopathique. C'est ce qui a été demandé dans les questions 21, 22 et 23 (Figure 45, Figure 44 et Figure 46).

Figure 45 : Pourcentage de vétérinaires prescrivant, ou non, un traitement allopathique en association avec l'EPS de Cyprès.

PRESCRIPTION D'UN TRAITEMENT ALLOPATHIQUE

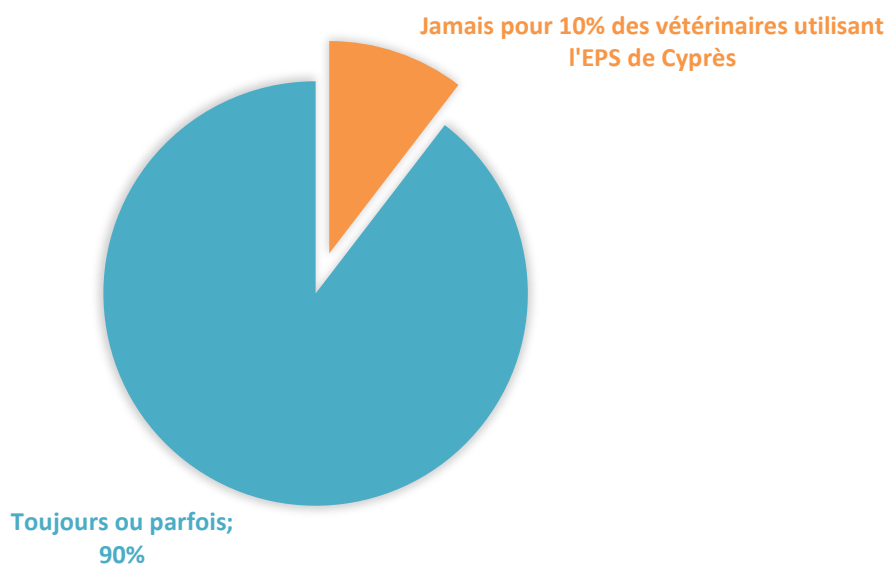


Figure 44 : Raisons pour lesquelles le traitement allopathique est prescrit, en nombre de vétérinaires ayant choisi la réponse.

RAISONS JUSTIFIANT LE TRAITEMENT ALLOPATHIQUE

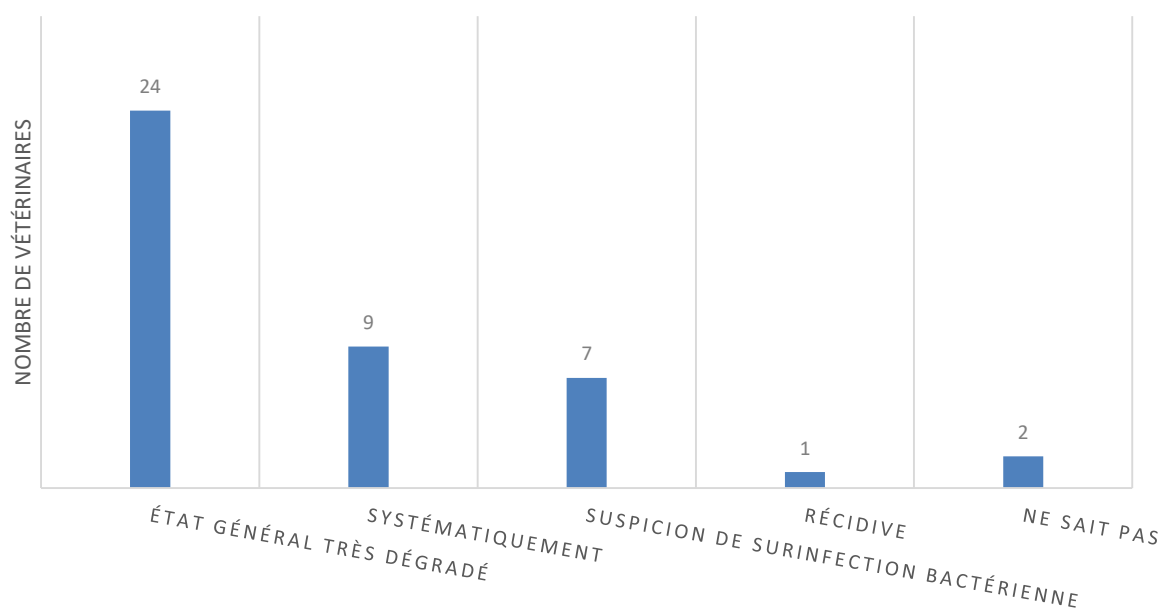
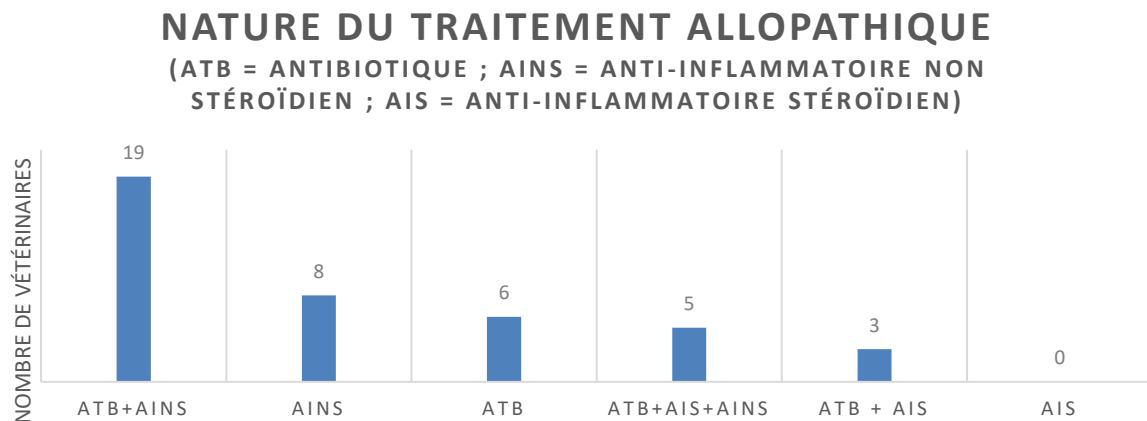


Figure 46 : Nature du traitement allopathique prescrit, en nombre de vétérinaires ayant choisi la réponse parmi les 48 vétérinaires utilisant l'EPS de Cyprès



3.5 Intérêts et limites de l'usage de l'EPS de Cyprès

Maintenant que les modalités d'usage de l'EPS de Cyprès ont été décrites par les vétérinaires, les questions portent sur les effets de cet extrait sur les bovins.

3.5.1 Effets secondaires

L'innocuité est un paramètre très important voire le plus important puisqu'il faut être certain qu'en utilisant un produit, il n'aura pas d'effet néfaste pour l'organisme. Les questions 31 et 32 portaient sur d'éventuels effets secondaires liés à l'extrait de Cyprès.

Parmi les 48 vétérinaires utilisant l'EPS de Cyprès sur les bovins, seuls cinq vétérinaires soit 10% ont noté des effets secondaires. Les seuls vétérinaires en ayant précisé la nature parlent de diarrhée.

3.5.2 Évaluation de l'efficacité

Enfin, le but premier de ce questionnaire était d'évaluer l'efficacité de l'EPS de Cyprès dans le cas d'une atteinte respiratoire, en particulier lorsqu'une étiologie virale est suspectée. L'évaluation de cette efficacité est faite grâce à un score entre 1 et 5 estimé par les vétérinaires. Un score de 3 correspond à « aucune modification de l'état général de l'animal », un score de 1 à une aggravation et un score de 5 à une guérison totale (question 18, Figure 48). En cas d'amélioration, il était demandé quels effets étaient observés (question 19, Figure 47). Ce score permet de donner une idée de l'efficacité du traitement à l'EPS de Cyprès selon l'expérience des vétérinaires qui l'utilisent sur le terrain.

Figure 48 : Évaluation de l'efficacité de l'EPS de Cyprès par les 48 vétérinaires l'utilisant.

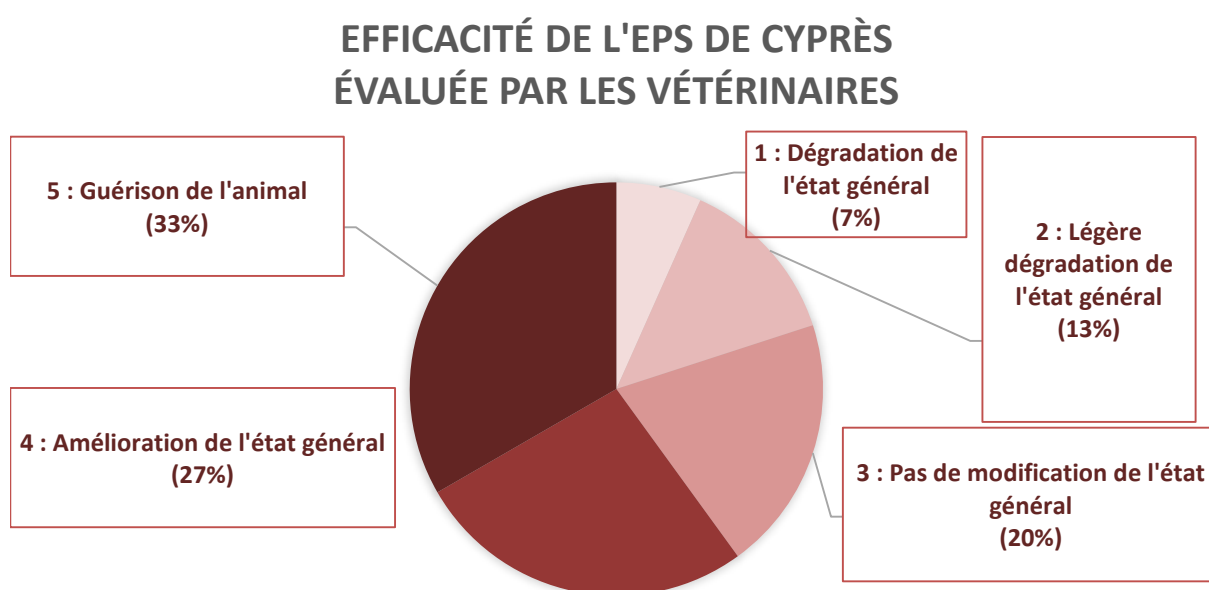
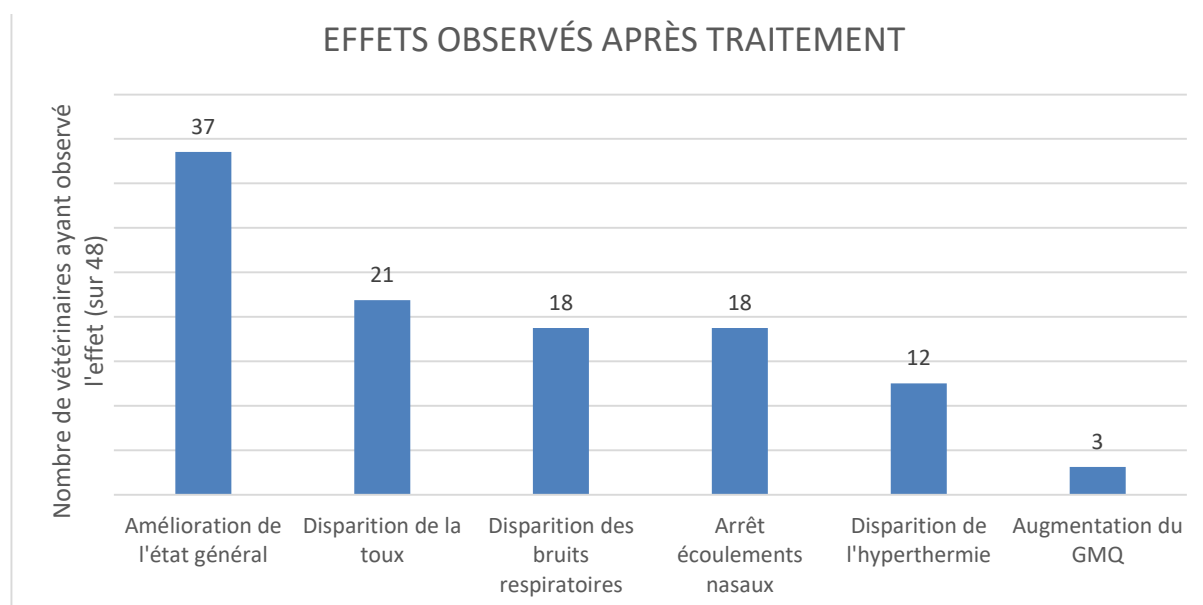


Figure 47 : Effets observés suite à l'administration d'EPS de Cyprès.



4. Discussion

4.1 Méthode

4.1.1 Population étudiée

Le questionnaire a été envoyé à l'ensemble des clients du laboratoire Wamine exerçant en médecine rurale. Ce choix était délibéré puisque nous nous intéressons à l'utilisation de la phytothérapie en médecine rurale essentiellement. Les vétérinaires interrogés pratiquent donc tous la phytothérapie et ce avec les produits Wamine, dont l'extrait de Cyprès.

Il existe donc un biais d'échantillonnage dans la population interrogée.

4.1.2 Collecte des données

La collecte des données a été faite grâce à un questionnaire en ligne réalisé à l'aide de l'application Google Forms. Cette méthode peut éventuellement avoir entraîné un autre biais, les vétérinaires les plus à l'aise avec l'informatique ayant peut-être plus facilement répondu au questionnaire. Cependant, il s'agit d'une application intuitive et le questionnaire était assez court, environ quinze minutes estimées, ce qui pouvait favoriser les réponses de l'ensemble des vétérinaires interrogés.

4.2 Taux de réponse

Le fichier client fourni par Wamine comportait 369 adresses électroniques de cliniques vétérinaires. Parmi celles-ci, 94 cliniques n'étaient en fait pas concernées par le questionnaire (pas d'exercice en médecine bovine, pas d'utilisation de la phytothérapie en médecine bovine...). Grâce en grande partie à la relance téléphonique, le taux de réponse parmi les 275 vétérinaires cibles est donc de 39,3 %.

Il s'agit d'un taux de réponse très satisfaisant qui peut s'expliquer par la rapidité et la facilité de réponse au questionnaire mais aussi par la relance téléphonique faite aux cliniques vétérinaires.

4.3 Réponses au questionnaire

Aucun questionnaire de ce type réalisé auparavant n'a été trouvé. Les résultats n'ont donc pas pu être comparés à ceux d'une autre étude.

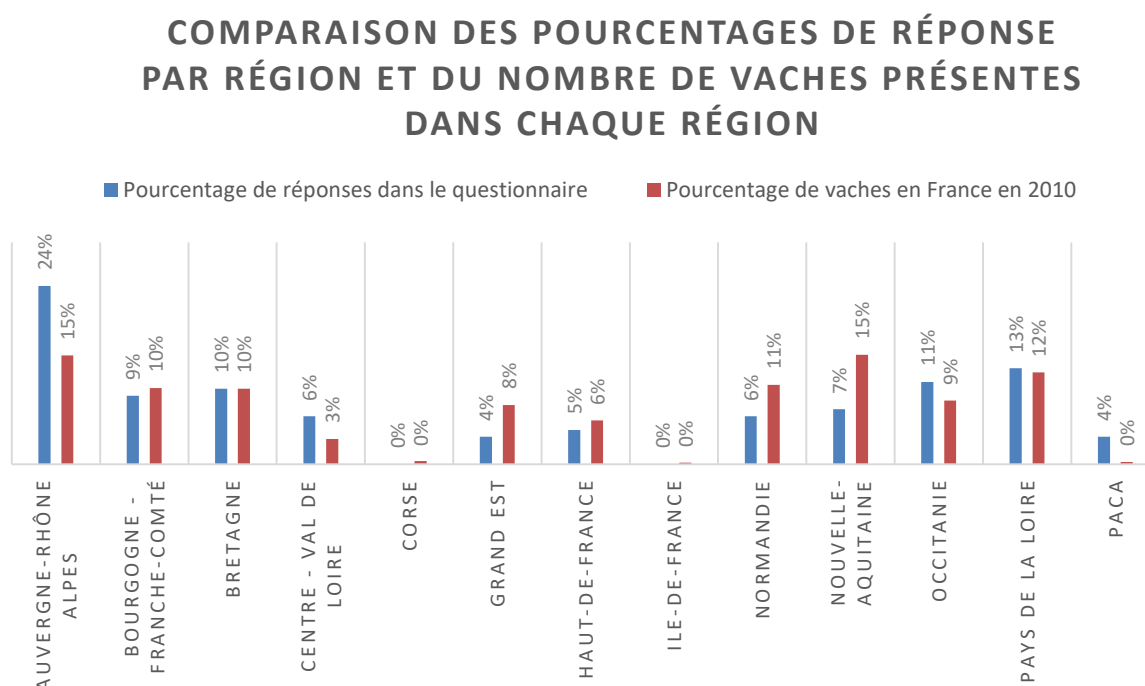
4.3.1 Les vétérinaires utilisant la phytothérapie et leur clientèle

Un des objectifs du questionnaire était de mieux cerner les vétérinaires utilisant la phytothérapie, à la fois par des questions personnelles et sur leur formation ainsi que par des questions sur leur clientèle.

4.3.1.1 Région d'exercice et clientèle

Les régions françaises sont très différentes en matière d'élevage bovin. D'abord par le nombre d'animaux présents mais aussi par le type d'élevage : allaitant ou laitier.

Figure 49 : Comparaison des pourcentages de vétérinaires ayant répondu au questionnaire et de vaches présentes dans chaque région française. Source : FranceAgriMer, 2010.



Le pourcentage de vaches présentes correspond au nombre de mères présentes dans chaque région toutes races confondues par rapport au nombre total de mères en France (FranceAgriMer, 2010). Sur la Figure 49, on note des valeurs similaires entre le pourcentage de vaches présentes et le pourcentage de vétérinaires ayant répondu au questionnaire en fonction de leur région. La plus grosse différence se trouve en région Auvergne - Rhône Alpes. Les vétérinaires sont peut-être plus nombreux dans cette zone par rapport au nombre d'animaux, ou encore plus enclins à pratiquer la phytothérapie. Il s'agit d'une région à activité mixte laitière et allaitante. Selon l'Agence bio, il s'agit de la deuxième région française ayant le plus d'exploitations certifiées biologiques (après l'Occitanie) (Agence bio, 2016).

Les types de clientèle étaient variables selon les vétérinaires : certains vétérinaires pratiquaient peu la médecine bovine alors que d'autres la pratiquaient exclusivement (Figure 20). De même, la part allaitant/laitier est très variable dans les réponses. On note tout de même trois tendances différentes : soit l'exercice est très majoritairement en secteur laitier, soit très majoritairement en secteur allaitant ou enfin moitié de l'un moitié de l'autre. Les intermédiaires sont rares (Figure 21). Ces résultats ne mettent pas en évidence un type de clientèle particulier chez les vétérinaires pratiquant la phytothérapie.

La médecine phytothérapeutique semble être une demande grandissante des éleveurs selon ce que l'on peut trouver dans les articles publiés à ce propos et l'avis de ceux qui promeuvent la phytothérapie. En particulier chez les éleveurs en agriculture biologique : plusieurs enquêtes montrent que ces éleveurs ont déjà souvent recours à la phytothérapie par eux même (Hivin, 2008 ; Pénin, 2017). Ces éleveurs attendent de leur vétérinaire qu'il s'intéresse aux MAC et soit apte à les conseiller (Mouillard, 2000 ; Longfellow, 2005 ; Hivin, 2008). D'après les résultats obtenus, il n'y a que peu de clientèles où le nombre d'éleveurs demandeurs pour des traitements phytothérapeutiques est important (plus de 90 % d'éleveurs demandeurs dans la clientèle). Dans presque 75 % des clientèles

des vétérinaires interrogés, moins de 20 % des éleveurs sont en demande de traitements phytothérapeutiques selon les vétérinaires. Pourtant un certain nombre d'éleveurs utilisent déjà cette thérapeutique (Figure 27 et Figure 28). La demande croissante des éleveurs n'est pas mise en évidence dans les résultats de ce questionnaire.

4.3.1.2 Les vétérinaires

Les vétérinaires de la population source interrogés sont des clients du laboratoire Wamine, utilisant la phytothérapie chez les bovins.

La formation initiale des vétérinaires est variée, les quatre écoles françaises et les facultés belges apparaissent en proportions égales : environ 20 % chacune. Elle n'a probablement pas d'influence sur l'utilisation ou non de la phytothérapie dans la population sondée.

Un tiers des vétérinaires ayant répondu au questionnaire ont terminé leur formation vétérinaire entre 2002 et 2009. Les plus jeunes vétérinaires ont été plus nombreux à répondre au questionnaire. Deux hypothèses sont possibles : soit les plus jeunes sont plus enclins à répondre à des questionnaires, soit les plus jeunes sont ceux qui pratiquent le plus la phytothérapie. Toutes les générations de vétérinaires encore en exercice ont répondu au questionnaire, le fait qu'il soit en ligne ne semble pas avoir été un frein aux réponses des vétérinaires.

40 % des vétérinaires interrogés ont commencé à utiliser la phytothérapie entre 2012 et 2017. Or le plan EcoAntibio 1 a été initié en 2012. Il est possible que l'instauration de ce plan ait eu pour effet de motiver les vétérinaires à pratiquer les médecines alternatives, la phytothérapie par exemple. Même des vétérinaires exerçant depuis plus de 15 ans ont commencé à utiliser la phytothérapie à cette période.

Si tous les vétérinaires interrogés pratiquent la phytothérapie, seulement 62% ont suivi une formation traitant de ce sujet. La moitié de ces formations sont données par les laboratoires, on peut s'interroger sur les liens d'intérêt de celles-ci. Après les laboratoires, les écoles proposant des formations aux « médecines alternatives » ont du succès auprès de 15% des vétérinaires, tout comme les facultés proposant souvent des formations communes entre médecins et vétérinaires. Il est cependant surprenant que presque 40% de vétérinaires pratiquent une médecine qui n'est pas enseignée à l'école et sans s'y être formés. Cela confirme des résultats obtenus en 2000 auprès de vétérinaires de la Manche : plus de 70% estimaient que leurs connaissances en médecines complémentaires étaient insuffisantes (Mouillard, 2000). La formation des vétérinaires semble être un point crucial pour permettre le développement de la phytothérapie en élevage.

4.3.2 Utilisation de la phytothérapie

4.3.2.1 Origine de l'utilisation par le vétérinaire

Si, dans la population interrogée, les éleveurs ne semblent pas être très demandeurs de traitements phytothérapeutiques (selon leurs vétérinaires), ils ont tout de même influé presque 20% des vétérinaires en les motivant à utiliser la phytothérapie. En effet, la demande des éleveurs arrive en troisième position des raisons pour lesquelles les vétérinaires interrogés ont commencé à pratiquer la phytothérapie. Pourtant selon une enquête réalisée en 2000 auprès d'éleveurs de la Manche, plus de 60% des éleveurs attendaient que l'utilisation des MAC soient suggérée par leur vétérinaire (Mouillard, 2000).

La principale raison reste la « conviction personnelle », les vétérinaires sont également concernés par l'évolution actuelle de la société et surtout par l'antibiorésistance. Ces paramètres

semblent avoir joué un rôle important dans le choix de 80 % vétérinaires interrogés de pratiquer la phytothérapie.

Il existe un paradoxe entre la faible demande de la part des éleveurs selon les vétérinaires sondés et l'influence de ceux-ci sur le choix des vétérinaires de pratiquer la phytothérapie. Il est possible que peu d'éleveurs soient demandeurs mais qu'ils souhaitent pouvoir compter sur leur vétérinaire pour utiliser la phytothérapie. Aussi, il est fort probable que certains éleveurs utilisent la phytothérapie seuls et sans en parler avec leur vétérinaire comme décrit dans une enquête auprès de 8 éleveurs en agriculture biologique en 2005 (Longfellow, 2005). Si aucun de leurs vétérinaires n'était formé en phytothérapie, ils utilisaient tout de même cette médecine en demandant conseil à des spécialistes du sujet ou en se basant sur des formations dispensées par des groupements techniques par exemple (Longfellow, 2005). Une autre enquête réalisée en 2008 auprès de presque 300 éleveurs en agriculture biologique révélait que 70% d'entre eux utilisaient la phytothérapie cependant, seulement 8% de leurs vétérinaires pratiquaient cette médecine (Hivin, 2008).

4.3.2.2 Les vétérinaires et la réglementation autour de la phytothérapie

La réglementation autour des produits phytothérapeutiques est en pleine évolution. La position des organismes officiels n'est pas évidente et pas toujours connue des vétérinaires. Aussi, la façon de commercialiser les produits permet de les utiliser plus facilement d'un point de vue réglementaire mais ne simplifie pas la compréhension de la loi.

La complexité de la réglementation se fait bien sentir dans les résultats du questionnaire. Dans les réponses au questionnaire, 70% des vétérinaires considèrent avec raison que les EPS sont des médicaments : ils sont commercialisés comme de MPUP destinées à être utilisées pour en faire une préparation extemporanée donc un médicament. L'Anses - ANMV considère ainsi les substances phytothérapeutiques comme des médicaments par présentation.

Les temps d'attente prescrits par les vétérinaires sont intéressants. En effet, lors de l'administration d'un médicament ou d'une préparation magistrale dont les LMR et donc les temps d'attente ne sont pas définis (ce qui est le cas pour l'EPS de Cyprès) le produit ne devrait pas être administré à un animal de rente. Le laboratoire propose, lui, un temps d'attente de 48 heures qui serait la « durée moyenne d'élimination des principes actifs » (Wamine, 2013). Or parmi les vétérinaires interrogés, presque 60% ne prescrivent aucun temps d'attente lors de l'administration d'une préparation phytothérapeutique à un bovin. Parmi les vétérinaires considérant les extraits de plantes comme des médicaments, la majorité ne prescrit aucun temps d'attente non plus. Lorsqu'un temps d'attente est prescrit, il s'agit le plus souvent du temps d'attente forfaitaire, soit sept jours pour le lait et trente jours pour la viande.

On peut penser que le flou réglementaire joue un rôle important dans cette variabilité des pratiques. Chacun tente de trouver la solution qu'il trouve la plus adaptée pour essayer d'encadrer l'usage d'un extrait de plante pour le moment officiellement interdit d'utilisation chez les animaux de rente. L'adaptation de la réglementation à la pratique vétérinaire actuelle, ou au moins une simplification, semble une étape indispensable à la légitimation de la phytothérapie et à l'uniformisation des pratiques entre les vétérinaires.

4.3.3 Utilisation de l'EPS Cyprès

Presque la moitié des vétérinaires interrogés utilisent l'EPS de Cyprès, il s'agit donc d'un extrait régulièrement utilisé en phytothérapie. Il faut cependant noter que les vétérinaires sondés font partie de la clientèle du laboratoire Wamine qui commercialise l'EPS de Cyprès.

4.3.3.1 Objectif lors de l'usage de cet EPS

Lors d'un traitement phytothérapeutique, la préparation magistrale prescrite est préparée avec plusieurs extraits. Ils sont choisis selon leurs propriétés et leur intérêt pour traiter les symptômes observés.

L'extrait de Cyprès est presque toujours utilisé lors de pathologie respiratoire par les vétérinaires sondés. Cela correspond à son indication première. Les effets recherchés sont un effet antiviral d'abord, puis un effet de protection du tissu conjonctif. Il s'agit des deux propriétés de l'extrait qui ont été étudiées scientifiquement. Aucun test clinique n'a été réalisé mais les résultats étaient concluants *in vitro* et *in vivo* sur des souris (pour l'effet antiviral). Cet extrait est parfois utilisé en espérant des propriétés antifongique et/ou antibactérienne. Aucune preuve scientifique n'existe pour ces effets.

Des résultats d'analyses éventuellement réalisées lors de l'utilisation de l'extrait de Cyprès ont été demandés aux vétérinaires. Cependant, il n'a pas été demandé si les analyses étaient des analyses sérologiques ou directes (virologie, bactériologie). Or en particulier s'il s'agit de sérologie, la maladie n'est pas forcément imputable au virus (ou à la bactérie) identifié. Si l'on est en présence de résultats de bactériologie ou de virologie, il est possible que le portage soit sain, la maladie ne peut donc pas forcément être imputée au pathogène identifié. Les résultats obtenus ne sont donc malheureusement pas interprétables.

4.3.3.2 Modalités d'utilisation

Les posologies prescrites par les vétérinaires interrogés sont très variables. Il s'agit en général de posologies proposées par le laboratoire, mais adaptées par les vétérinaires au fur et à mesure de leur utilisation de l'extrait.

Dans ses conseils d'utilisation, le laboratoire préconise d'utiliser plusieurs extraits pour réaliser une préparation magistrale (3 à 5 en général). Ensuite, il est conseillé d'administrer, par voie orale, 15 mL pour 400 kg de poids vif à chaque prise. Dans des situations chroniques, il est préférable, selon le laboratoire, d'administrer le traitement une fois par jour pendant dix à quinze jours tandis que pour une pathologie aigüe, il faudrait l'administrer trois fois par jour pendant quatre à cinq jours (Wamine, 2013).

Il n'a pas été demandé aux vétérinaires si la dose administrée correspondait au Cyprès seul ou au mélange. Puisque presque tous les vétérinaires utilisent l'extrait en mélange, on peut supposer que la posologie prescrite correspond à la dose de préparation magistrale prescrite. Or il semble que la majorité des vétérinaires sondés prescrivent 5 mL (pour les veaux lorsque c'est précisé) ou 15 mL (pour les adultes lorsque c'est précisé). La dose proposée par le laboratoire est donc respectée pour les adultes. Pour les veaux, cette dose est presque triplée dans la majorité des cas.

Deux administrations par jour sont préconisées par 70 % des vétérinaires interrogés. Quant au temps de traitement prescrit, il est de cinq à dix jours pour 85 % des vétérinaires sondés utilisant l'EPS de Cyprès.

Aucun essai clinique n'ayant été réalisé, les posologies idéales ne sont pas connues. Elles sont donc adaptées par les vétérinaires avec leur expérience terrain ce qui entraîne une grande variabilité dans les traitements à base d'EPS de Cyprès.

4.3.3.3 Préparation magistrale avec d'autres EPS

Seuls deux vétérinaires utilisent parfois l'extrait de Cyprès seul. Tous les autres le prescrivent sous forme de préparation magistrale en association avec d'autres EPS, en particulier avec des EPS d'Échinacée, de Réglisse et de Pin sylvestre. Le mélange Cyprès, Échinacée, Pin sylvestre est celui

préconisé par le laboratoire Wamine lors d'une bronchite aiguë avec jetage (Wamine, 2013). Dans le Point Vétérinaire, un cas clinique parle d'un mélange Cyprès, Pin et Réglisse ainsi que Rhodiole et Sureau, pour des veaux présentant une toux grasse et un jetage clair (Ventéjou, 2016).

Les préparations utilisées par les vétérinaires sont proches de celles que l'on trouve dans la littérature. Cependant, il n'existe pas d'uniformisation des préparations magistrales. Cela s'explique certainement par l'approche phytothérapeutique qui s'adapte à chaque cas particulier.

4.3.4 Intérêt et limite lors de l'usage de cet EPS

4.3.4.1 Effets secondaires

Seulement 10 % des vétérinaires sondés ont noté un effet secondaire à l'utilisation de l'EPS de Cyprès. Les seuls ayant précisé l'effet dont il s'agit parle de diarrhée. Cette diarrhée peut être provoquée par le glycérol s'il est administré en grande quantité. Or le glycérol est l'excipient de l'EPS de Cyprès. L'apparition de la diarrhée n'est pas forcément due au Cyprès lui-même. Cependant, il faut noter qu'une administration en grande quantité de l'EPS peut provoquer une diarrhée. Un seul vétérinaire a noté une dégradation de l'animal suite au traitement (parmi les 48 vétérinaires utilisant l'extrait de Cyprès).

L'expérience des vétérinaires interrogés ne révèle pas d'effet néfaste imputable à l'EPS de Cyprès hormis une diarrhée en cas d'administration en grande quantité.

4.3.4.2 Évaluation de l'efficacité de l'EPS de Cyprès contre les atteintes respiratoires

Les vétérinaires utilisent l'EPS de Cyprès surtout en cas de pathologie respiratoire. Ils recherchent donc une diminution des symptômes liés à cette pathologie. Dans plus de 70% des cas, l'état général de l'animal s'est amélioré suite au traitement et dans plus de 35% des cas, les vétérinaires observent une disparition de la toux et des bruits respiratoires ainsi qu'un arrêt des écoulements nasaux. Ces symptômes caractéristiques d'une atteinte respiratoire sont donc réduits lors de l'utilisation de l'EPS de Cyprès dans le traitement. Il faut noter que deux vétérinaires seulement utilisent l'extrait de Cyprès seul. Tous les autres l'utilisent en mélange avec d'autres EPS. Les effets observés ne peuvent donc pas être attribués à l'extrait de Cyprès seulement mais à une préparation magistrale contenant de l'EPS de Cyprès.

De plus, un traitement allopathique est « toujours ou parfois » associé au traitement phytothérapeutique par 90% des vétérinaires interrogés ; parmi eux 20% des vétérinaires le font systématiquement. Les autres vétérinaires le font surtout lorsque l'état général de l'animal est très dégradé (55%) ou lorsqu'ils suspectent une surinfection bactérienne quasi systématique chez les bovins (16%). L'évaluation de l'efficacité de l'EPS de Cyprès par les vétérinaires doit donc être interprétée avec précaution. En effet, plusieurs biais sont à prendre en compte. D'abord, il s'agit de vétérinaires pratiquant régulièrement la phytothérapie, on peut donc penser qu'ils lui trouvent des effets bénéfiques, peut-être plus que des vétérinaires qui ne pratiquent pas cette médecine. L'EPS de Cyprès est, dans presque tous les cas, associé à d'autres extraits, l'efficacité observée n'est donc pas due seulement à l'extrait de Cyprès. Enfin, des traitements allopathiques sont souvent ajoutés au traitement phytothérapeutique, l'efficacité observée est le résultat de la combinaison de ces traitements.

Le score d'amélioration de l'état de l'animal est de 3,8/5 en moyenne [3,2 ; 4,4]. Il s'agit du ressenti des vétérinaires sur l'efficacité de l'EPS de Cyprès lorsqu'il est utilisé en cas de maladie respiratoire d'origine virale suspectée. Il s'agit donc d'une évaluation subjective basée sur l'expérience

de vétérinaires sur le terrain. Si un quart des vétérinaires n'ont en général observé aucune modification après le traitement, 35 (sur 48) ont noté une amélioration, parmi eux quatre ont obtenu une guérison de l'animal. La présence de l'EPS de Cyprès dans le traitement ne semble pas aggraver l'état de l'animal (sauf pour un vétérinaire). Bien que cela ne démontre pas l'innocuité du produit, on peut noter que l'expérience des 48 vétérinaires sondés utilisant cet EPS n'a pas mis en évidence d'effet néfaste grave de l'extrait de Cyprès. Quant à l'efficacité, si elle ne peut pas être attribuée au Cyprès uniquement, un traitement phytothérapeutique contenant l'EPS de Cyprès semble participer à l'amélioration clinique des bovins présentant une atteinte respiratoire.

De plus, le traitement phytothérapeutique ne semble pas interférer avec le traitement allopathique puisqu'une amélioration est observée lorsque les deux sont associés. Un essai clinique comparant l'efficacité du traitement phytothérapeutique seul, d'un traitement allopathique seul et de l'association des deux serait très intéressant pour connaître l'efficacité ou non de l'EPS de Cyprès ou du moins d'une préparation magistrale contenant de l'extrait de Cyprès.

5. Conclusion de l'étude du questionnaire

Les réponses au questionnaire ont permis d'obtenir des informations sur les vétérinaires utilisant la phytothérapie et sur leur expérience de l'utilisation de l'EPS de Cyprès. De plus, les informations récoltées dans ce questionnaire pourraient permettre d'ajuster les interrogations et fournir un questionnaire plus adapté. Il serait intéressant d'interroger l'ensemble des vétérinaires pratiquant la phytothérapie.

On note une grande variabilité lors de l'utilisation des EPS et des temps d'attentes prescrits entre les vétérinaires.

Si les résultats ne sont pas extrapolables à toute la population des utilisateurs de phytothérapie en médecine bovine, ils permettent d'avoir un premier avis sur l'utilisation du Cyprès. Les vétérinaires ayant répondu au questionnaire semblent considérer qu'il y a un intérêt à utiliser une préparation magistrale contenant de l'EPS de Cyprès lors d'une atteinte respiratoire supposée virale chez les bovins.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La pathologie respiratoire est un problème majeur en élevage bovin. Son traitement repose le plus souvent sur une antibiothérapie et un traitement anti-inflammatoire. Or l'antibiorésistance est aujourd'hui une priorité de santé publique. Le plan EcoAntibio initié en 2012 vise à limiter les risques d'antibiorésistance, il se base en grande partie sur la réduction de l'usage des antibiotiques. La prévention des atteintes respiratoires et de nouveaux traitements pourraient aider à réduire cet usage des antibiotiques. La phytothérapie est une piste pour la recherche de nouveaux traitements.

La médecine traditionnelle qu'est la phytothérapie existe depuis des millénaires. Elle fait ainsi partie des médecines alternatives et complémentaires. Si son utilisation repose sur un usage traditionnel et l'expérience, les publications scientifiques traitant du sujet sont en pleine augmentation afin de palier à l'empirisme. Le Cyprès fait partie des plantes en cours d'étude. Des études *in vitro* ont révélé un effet virucide de l'extrait de Cyprès ou d'une solution de proanthocyanidines, la catégorie de molécules majoritaires dans l'extrait, contre des virus humains (Clément, 1993 ; Amouroux, 1998). De plus, dans une étude *in vivo* sur des souris, l'administration d'une solution de proanthocyanidines semble avoir un effet protecteur contre deux rétrovirus humains (Amouroux *et al.*, 1998).

Dans ce travail, une étude *in vitro* appelée test de virucidie a été réalisée sur deux virus à tropisme respiratoire communs chez les bovins : le virus respiratoire syncytial bovin et l'herpès virus bovin de type 1. Un effet antiviral a été mis en évidence pour une concentration de 80 % en extrait de Cyprès avec un temps de contact de 60 minutes à la température de 37 °C. Cependant, l'absorption intestinale des PAC est très faible chez l'homme et l'action de ses métabolites, qui semblent être eux absorbés, n'est pas connue. Des études *in vivo* sur l'absorption de ces molécules pourraient nous renseigner sur la possibilité d'avoir un contact entre les virus visés et les PAC de l'EPS administré *per os*. Sans cela, le test de virucidie ne peut permettre de conclure à une quelconque activité de l'EPS sur la pathologie respiratoire virale chez les bovins.

Dans un second temps, une étude terrain a également été menée grâce à un questionnaire envoyé à des vétérinaires pratiquant la phytothérapie sur les bovins. Elle a révélé que le plan EcoAntibio semble avoir motivé les vétérinaires à utiliser cette médecine. Aussi, il faut noter que la législation n'est pas en accord avec les pratiques actuelles (ou l'inverse). En effet, pour l'EPS de Cyprès par exemple, aucune LMR n'existe, son utilisation est donc réglementairement proscrite. Pourtant presque la moitié des vétérinaires interrogés l'utilisent... Pour l'EPS de Cyprès, les pratiques en matière de prescriptions sont très variables mais environ la moitié des vétérinaires interrogés utilisent de l'EPS de Cyprès dans une préparation magistrale phytothérapeutique (seulement deux vétérinaires parmi les 48 utilisant l'EPS de Cyprès ne font pas de mélange et utilisent seul l'EPS de Cyprès). Le traitement phytothérapeutique est très souvent associé à une autre médecine complémentaire (50% des vétérinaires utilisant l'EPS de Cyprès) et aussi à un traitement allopathique (90% des vétérinaires utilisant l'EPS de Cyprès). Les résultats du questionnaire sur l'efficacité montrent que, selon l'expérience des vétérinaires utilisant l'extrait, il pourrait avoir un effet bénéfique sur la santé des animaux présentant une atteinte respiratoire. Cependant, l'amélioration de l'état général ne peut être imputée uniquement à l'EPS de Cyprès puisqu'il est le plus souvent administré en mélange avec d'autres EPS et associé à une autre médecine complémentaire et/ou à un traitement allopathique. Si cette étude ne permet pas de conclure vis-à-vis de l'efficacité de l'EPS de Cyprès, elle met en évidence le paradoxe entre la demande actuelle des vétérinaires (et des éleveurs dans une moindre mesure selon les vétérinaires) de pouvoir utiliser la phytothérapie et la législation actuelle qui ne le permet

que pour de rares extraits. Il en résulte des pratiques variées en matière de posologie et de temps d'attente par exemple. Une réglementation plus souple pourrait peut-être permettre un meilleur encadrement de cette thérapeutique qui se développe de plus en plus tant en médecine humaine que vétérinaire.

Ces études montrent que les connaissances sur les effets de l'extrait de Cyprès évoluent et se précisent. Cependant, le manque de connaissances sur la composition de l'EPS de Cyprès et l'absorption de ses composés, en particulier celui des PAC, famille de molécules d'intérêt, ne permet pas de montrer une quelconque activité sur l'organisme malgré les résultats positifs des tests *in vitro*. Cette étude du métabolisme des PAC semble indispensable pour la poursuite de l'étude de cet EPS. Aussi, une meilleure connaissance de la composition de l'EPS de Cyprès aiderait considérablement à définir ses effets sur l'organisme.

Ensuite, des expériences *in vivo* sur les bovins visant à assurer de l'innocuité du produit pourraient ouvrir la voie à des tests cliniques. Des études prospectives semblent être le meilleur choix pour évaluer l'EPS de Cyprès, car, comme nous l'avons vu grâce au questionnaire, cet EPS est trop souvent associé à d'autres EPS et/ou traitements pour pouvoir connaître son effet propre avec une étude rétrospective. Une étude en double aveugle ou sur des animaux inoculés par les virus d'intérêt ou encore l'étude en élevage pour un effet préventif contre des maladies respiratoires virales pourraient montrer l'efficacité de l'EPS de Cyprès *in vivo*. Ces études aideraient en plus à définir la posologie idéale à administrer et ainsi uniformiser les pratiques des vétérinaires. Le principal frein à ces études est l'absence de brevetabilité des extraits de plantes. En effet, sans brevet, les laboratoires ne peuvent s'assurer d'une rentabilité économique après avoir financé des études très coûteuses.

Enfin, la réglementation encadrant la phytothérapie est aujourd'hui en pleine évolution. Les clients et les vétérinaires montrent leur besoin de pouvoir utiliser cette médecine. Pour cela, il faut pouvoir l'encadrer légalement. Le cadre réglementaire est aujourd'hui flou, il paraît indispensable de le faire évoluer afin de légitimer ces pratiques. Pour cela, des études scientifiques sont indispensables. Or la réglementation les freine puisque la plupart des EPS ne peuvent officiellement pas être utilisés en élevage... Espérons que dans l'avenir ce paradoxe pourra se simplifier.

Bibliographie

- Académie Vétérinaire de France (2010) Rapport sur les conditions d'utilisation, en France, des préparations à base de plantes chez les animaux de production. Approuvé le 30 Juin 2010. *Bull. Académie Vét. Fr.* n°1
- ADENOT I. (2014) Le pharmacien et les plantes - Cultivez votre expertise. Ordre national des pharmaciens
- AFNOR (2015) NF EN 14675 Mai 2015 Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire - Méthodes d'essai et prescriptions. AFNOR
- AGENCE BIO (2016) La bio en France, des producteurs aux consommateurs.
- AL-SNAFI A.E. (2016) Medical importance of *Cupressus sempervirens* - A review. *IOSR J. Pharm.* 6, 66-76
- AMOUREUX P. (1998) Procyanidines polymères de Cyprès : Contribution au développement d'un nouveau type d'antiviral. Université d'Auvergne - Blaise Pascal
- AMOUREUX P., JEAN D., LAMAISSON J.-L. (1998) Antiviral activity in vitro of *Cupressus sempervirens* on two human retroviruses HIV and HTLV. *Phytotherapy Research* 12, 367-368
- ANSES - ANMV (2017) Tableau 2 - Substances interdites - Règlement LMR.
- ANSES - ANMV (2018) Tableau 1 - Substances autorisées - Règlement LMR.
- ANSES - ANMV (s. d.) Que sont les compléments alimentaires ? [<https://www.anses.fr/fr/content/que-sont-les-compl%C3%A9ments-alimentaires>] (consulté le 06/06/2018).
- ANSES - SERVICE AFFAIRES JURIDIQUES ET CONTENTIEUX (2013) Note sur le statut juridique du médicament vétérinaire au regard des produits à base de plante.
- ANSM (2012) Pharmacopée Française. 11ème édition. ANSM
- ANSM (AFSSAPS) (2009) Liste des Excipients à Effet Notoire. , 84
- ANSM (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ DU MÉDICAMENT ET DES PRODUITS DE SANTÉ) (2013) Caractérisation des antibiotiques considérés comme « critiques ». Rapport d'expertise.
- ANSM (AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ DU MÉDICAMENT ET DES PRODUITS DE SANTÉ) (2016) Liste des antibiotiques critiques - actualisation 2015
- Arrêté du 14 novembre 2016 relatif à la préparation des autovaccins à usage vétérinaire destinés aux ruminants | Legifrance(s. d.) [<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2016/11/14/AGRG1634102A/jo>] (consulté le 20/09/2018).
- Arrêté du 22 juillet 2015 relatif aux bonnes pratiques d'emploi des médicaments contenant une ou plusieurs substances antibiotiques en médecine vétérinaire (s. d.)
- Arrêté du 22 mars 2017 modifiant l'arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de 1re et 2e catégorie pour les espèces animales | Legifrance (s. d.)
- AUSSAVY A. (2016) Rappels réglementaires des modalités d'obtention des AMM en 2014 pour les médicaments vétérinaires sur le marché français et analyse de leurs caractéristiques ENVA
- AYRLE H., MEVISSSEN M., KASKE M., *et al.* (2016) Medicinal plants – prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. *BMC Vet. Res.* 12
- BAREILLE N., SEEGER H., DENIS G., QUILLET J.M., ASSIE S. (2008) Impact of respiratory disorders in young bulls during their fattening period on performance and profitability. , 4
- BARNOUIN J., FAYET J.C., BROCHART M., BOUVIER A., PACCARD P. (1983) ENQUÊTE ÉCO-PATHOLOGIQUE CONTINUE: 1. HIÉRARCHIE DE LA PATHOLOGIE OBSERVÉE EN ÉLEVAGE BOVIN LAITIER. *Ann. Rech. Vét.* 14(3), 247-252
- BARTHÉLÉMY P. (2012) L'homme de Néandertal se soignait-il par les plantes ? *In Passeur de sciences.* [<http://passeurdesciences.blog.lemonde.fr/2012/07/22/homme-de-neandertal-se-soignait-il-par-les-plantes/>] (consulté le 03/09/2018).

- BAUER T., TORRES A., FERRER R., *et al.* (2002) Biofilm formation in endotracheal tubes. Association between pneumonia and the persistence of pathogens
- BELKNAP E.B., BAKER J.C., PATTERSON J.S., *et al.* (1991) The Role of Passive Immunity in Bovine Respiratory Syncytial Virus-Infected Calves. *J. Infect. Dis.* 163(3), 470-476
- BIO-X DIAGNOSTICS (2016) Test ELISA pour le diagnostic antigénique de l'Herpès virus bovin de type 1
Test sandwich pour lysats tissulaires respiratoires Test diagnostique pour bovins Bicupule.
- BOUCHER S. (2018) Guide SNGTV de Bonnes pratiques de prescription des auto-vaccins. *In JNGTV 2018*, Nantes, Pub Contact, pp 101-105
- BOUKHRIS M., REGANE G., YANGI Thabet, SAYADI Sami (2012) Chemical Composition and Biological Potential of Essential Oil from Tunisian Cupressus sempervirens L. *J. Arid Land Stud.* , 329-332
- CABARET J. (2016) Médecines complémentaires et alternatives vétérinaires, un fait de société. *Bull. GTV n°Numéro spécial 2016*, 97
- CANU A., LECLERCQ R. (2002) Les macrolides : une diversité de mécanismes de résistance. *Médecine Mal. Infect.* 32(supp. 1), 32-44
- CHOPRA I., HAWKEY P.M., HINTON M. (1992) Tetracyclines, molecular and clinical aspect. *J. Antimicrob. Chemother.* , 245-277
- CHRISTOPHE A. (2014) Limites et risques de la phytothérapie Faculté de pharmacie de Limoge
- CLÉMENT C. (1993) Mise en évidence et recherche du mode d'action antiviral d'un proanthocanidol. Clermont-Ferrand
- CLÉMENT R.-P. (2005) Aux racines de la phytothérapie: entre tradition et modernité (1re partie). *Phytotherapie* 3(4), 171-175
- Code de la santé publique - Article L5121-1 (s. d.) , *Code Santé Publique*
- Code de la santé publique - Article L5143-4 (s. d.) , *Code Santé Publique*
- COGHE J., UYSTEPRUYST C.H., BUREAU F., *et al.* (2000) Validation and Prognostic Value of Plasma Lactate Measurement in Bovine Respiratory Disease. *Vet. J.* 160(2), 139-146
- Coronaviridae. (2017) . *In Fenner's Veterinary Virology*. Elsevier, pp 435-461
- CORTESE V.S. (2009) Neonatal Immunology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., Bovine Neonatology* 25(1), 221-227
- DABO S.M., TAYLOR J.D., CONFER A.W. (2007) Pasteurella multocida and bovine respiratory disease. *Anim. Health Res. Rev.* 8(2), 129-150
- DAMBRINE G., BERNY P., FORTINEAU O., *et al.* (2016) Evaluation des demandes d'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires à base de plantes. Auto-saisine. Maisons-Alfort, Anses
- DARNAULT S. (2008) HPTLC: vers la connaissance moléculaire d'extraits végétaux d'application cosmétique Lyon
- DASPET J. (2018) Mise en pratique de l'aromathérapie en clientèle rurale. *In JNGTV 2018*, Nantes, Pub Contact
- D'COSTA V.M., KING C.E., KALAN L., *et al.* (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477(7365), 457-461
- Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique (2016) , 2016-317
- DELOST T. (2011) Evolution de la certification IBR en France. Thèse.
- DESSOUROUX A., SEYRIG C., LECLERC C. (2011) Point sur la qualité des extraits fluides glycinés de plantes fraîches standardisés (EPS) et leur intérêt pharmacologique. *Phytotherapie* 9(4), 249-254
- DIXON R.A., XIE D.-Y., SHARMA S.B. (2005) Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165(1), 9-28
- DOCTISSIMO (s. d.) Cyprès. [<http://www.doctissimo.fr/html/sante/phytotherapie/plante-medicinale/cypres.htm>] (consulté le 15/12/2017).
- DUJON L. (1993) Intérêts de la phytothérapie dans les affections respiratoires du veau en élevage industriel. Thèse. ENVL

- DURAND A. (2002) Le virus respiratoire syncytial chez la vache laitière ENVA
- EFSA (s. d.) Aliments pour animaux. In *European Food Safety Authority*.
[<https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/feed>] (consulté le 06/06/2018).
- ELLIS J.A. (2010) Bovine Parainfluenza-3 Virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., Production Animal Ophthalmology* 26(3), 575-593
- ELOIT M. (2014) Présentation générale des virus - Cours ENVA 2014 Maisons-Alfort
- FLESCH F. (2005) Intoxications d'origine végétale. *EMC - Médecine* 2(5), 532-546
- FRANCE C. d'agriculture (2017) Animal - Effectifs des bovins et Production. In *Chambres d'agriculture*.
[<http://www.chambres-agriculture.fr/informations-economiques/chiffres-cles-de-lagriculture/agriculture-francaise/les-reperes-economiques/animal-effectifs-des-bovins-et-production/>] (consulté le 30/01/2018).
- FRANCEAGRIMER (2010) La géographie des filières bovines françaises. *Fr. Agrimer, Les synthèses de FranAgriMer* n°2, 12
- FRANCOZ D., BUCZINSKI S., APLEY M. (2012) Evidence Related to the Use of Ancillary Drugs in Bovine Respiratory Disease (Anti-Inflammatory and Others): Are They Justified or Not? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., Evidence-Based Veterinary Medicine for the Bovine Veterinarian* 28(1), 23-38
- GAY E., CAZEAUX G., JARRIGE N., CALAVAS D., ANSES LYON (2012) Utilisation des antibiotiques chez les ruminants domestiques en France : résultats d'enquêtes de pratiques auprès d'éleveurs et de vétérinaires. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. N°53*
- GAY E., HAENNI M., JARRIGE N., et al. (2017) Résapath - Réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales - Bilan 2016Anses - ANMV
- GELLER C. (2010) Développement d'une méthode originale pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques - désinfectants : détermination du pouvoir antiseptique de calixarènes sur le coronavirus Humain. Nancy 1
- GLASER R., KIECOLT-GLASER J.K. (2005) Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* 5(3), 243-251
- Glossaire - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (s. d.) .
[[http://ansm.sante.fr/Glossaire/\(filter\)/P](http://ansm.sante.fr/Glossaire/(filter)/P)] (consulté le 22/06/2018).
- GREFF D. (1997) Compositions pharmaceutiques a base de gels de type glyceryl poly(meth)acrylate. WO1997047310A1
- GROSMOND G. (2012) Santé animale et solutions alternatives. Paris, Éditions France agricole
- GUILBOT A., DESSOUROUX A., JEAN D., POULIGON M. (2013) Comparaison des profils chromatographiques d'extraits fluides de plantes fraîches standardisés et glycinés (EPS) versus teintures mères : différences d'intensité et de diversité. *Phytothérapie* 11(5), 301-305
- GUINOBERT I., HADDIOUI L., BARDOT V., et al. (2018a) Virucidal activity of a hydroéthanolic cone extract of Cupressus Sempervirens against human and bovine viruses. In *Phytopharm 2018 - 22th International Congress*, Suisse
- GUINOBERT I., BARDOT V., BERTHOMIER L., et al. (2018b) Activité virucide in vitro d'un extrait de cyprès sur des virus humains et bovins. *Soumis À Publ. En Juin 2018*
- HARPER M., BOYCE J.D., ADLER B. (2006) Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol. Lett.* 265(1), 1-10
- HIVIN B. (2008) Phytothérapie et aromathérapie en élevage biologique bovin enquête auprès de 271 éleveurs de France. Université Claude Bernard - Lyon I
- HODGINS D.C., SHEWEN P.E. (1996) Preparturient vaccination to enhance passive immunity to the capsular polysaccharide of Pasteurella haemolytica A1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 50(1-2), 67-77
- HPTLC - High Performance Thin-Layer Chromatography (2011) . Elsevier
- IDEXX SNAP BVDV Antigen Test (s. d.) . [<https://www.idexx.com/livestock-poultry/ruminant/snap-bvdv.html>] (consulté le 08/12/2017).
- Institut de l'Élevage (Paris) (2008) Maladies des bovins. Paris, Editions France Agricole
- INTERVET (2018) RCP BOVILIS BOVIGRIP.

- KAKIUCHI N., KUSUMOTO I.T., HATTORI M., *et al.* (1991) Effect of condensed tannins and related compounds on reverse transcriptase. *Phytother. Res.* 5(6), 270-272
- KHANBABAEE K., REE T. van (2001) Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* 18(6), 641-649
- KIMMAN T.G., WESTENBRINK F., SCHREUDER B.E., STRAVER P.J. (1987) Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 25(6), 1097-1106
- KLEIN E.Y., VAN BOECKEL T.P., MARTINEZ E.M., *et al.* (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115(15), E3463-E3470
- KOLODZIEJ H., HABERLAND C., J. WOERDENBAG H., W. T. KONINGS A. (1995) Moderate cytotoxicity of proanthocyanidins to human tumor cell lines
- KONSTANTINOS A.P., SHERIDAN J.F. (2001) Stress and influenza viral infection: modulation of proinflammatory cytokine responses in the lung. *Respir. Physiol.* 128(1), 71-77
- LABRE P. (2017) Médecines naturelles en élevage. Phytothérapie et aromathérapie chez les ruminants et le cheval., *L'élevage autrement*. Thônes, Femenvet
- LAROUSSE É. (s. d.) Définitions : holisme - Dictionnaire de français Larousse. [<https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/holisme/40157>] (consulté le 03/09/2018).
- Le Polder (2016) L'infection virale - Cours Virologie générale ENVA
- LEKEUX P. (1991) Particularités physiologiques et physiopathologiques de la fonction pulmonaire des bovins. *Point Vét.* 23(140), 13-19
- Les Extraits de Plantes fraîches Standardisés et les aliments complémentaires (...) - Wamine (s. d.) . [<http://www.wamine.fr/La-Micronutrition>] (consulté le 03/09/2018).
- Les médecines douces séduisent de plus en plus de Français (2016) . In *FranceSoir*. [<http://www.francesoir.fr/lifestyle-vie-quotidienne/les-medecines-douces-seduisent-de-plus-en-plus-de-francais>] (consulté le 05/09/2018).
- LÉTARD J.-C., COSTIL V., DALBIÈS P. (2015) Phytothérapie - principes généraux. *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale* n°1
- LINDBERG A., BROWNLIE J., GUNN G.J., *et al.* (2006) The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe : today and in the futur. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. Epizoot.* , 961-979
- LONGFELLOW H. (2005) Conduites d'élevage et pratiques sanitaires en élevage bovin laitier en agriculture biologique : résultats d'une enquête en région Midi-Pyrénées Aquitaine. ENVT
- LOWY F.D. (2007) Secrets of a superbug. *Nat. Med.* 13(12), 1418-1420
- MARS M.H., DE JONG M.C., VAN MAANEN C., HAGE J.J., VAN OIRSCHOT J.T. (2000) Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet. Microbiol.* 76(1), 1-13
- MAUNSELL F. p., WOOLUMS A. r., FRANCOZ D., *et al.* (2011) Mycoplasma bovis Infections in Cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 25(4), 772-783
- Med'Vet (s. d.) . [<http://www.med-vet.fr/>] (consulté le 14/05/2018).
- MÉHEUT D., CHEVANCE A., MOULIN G. (2017) Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016. Rapport annuel. Maisons-Alfort, Anses
- MERCAN A. (2014) Le meilleur de la Science, de la Nature et de la Tradition : Ethnographie des enseignements de phytothérapie en France. *HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale* n°2
- MINISTÈRE DE LA SANTÉ (2011) Plan nationale d'alerte sur les antibiotiques - 2011-2016 France
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT (2016) Le plan EcoAntibio 2012-2016.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT (2017) EcoAntibio 2 - Plan nationale de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire 2017-2021.
- MOUILLARD S. (2000) L'agrobilogie laitière : nouveaux enjeux pour le vétérinaire. Enquêtes auprès des vétérinaires et des éleveurs de la Manche. ENVA
- MUYLKENS B., THIRY J., KIRTEN P., SCHYNTS F., THIRY E. (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38(2), 181-209

- NANDI S., KUMAR M., MANOHAR M., CHAUHAN R.S. (2009) Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 10(1), 85-98
- NAVARRO R. (2016) Des hommes et des cyprès. *Rev. Fr. Allergol.* 56(5), 416-419
- Oeufs contaminés insecticide fipronil scandale alimentaire européen (2017) . In *LExpress.fr*. [https://www.lexpress.fr/actualite/societe/sante/oeufs-contamines-insecticide-fipronil-scandale-alimentaire-europeen_1934236.html] (consulté le 18/09/2018).
- O'NEILL J. (2016) Review on antimicrobial resistance
- OU K., GU L. (2014) Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *J. Funct. Foods* 7, 43-53
- PÉLISSIER-SIMARD L., XHIGNESSE M. (2008) Qu'est ce que la médecine intégrative. *Médecin Qué.* 43(1)
- PELT J.-M. (2002) Les nouveaux remèdes naturels: [quand la nature guérit ... Paris, Fayard
- PÉNIN L. (2017) Conduite d'élevage et pratiques sanitaires en élevage bovin allaitant biologique : enquête auprès d'éleveurs de la Creuse et de l'Indre. ENVA
- PÉRIÉ P., MAILLARD R., MILLEMANN Y. (2007) Bronchopneumonies bovines : de l'animal au troupeau. *Cah. Prat. Dépêche Vét.* n°3, 15
- PETERHANS E., JUNGI T.W., SCHWEIZER M. (2003) BVDV and innate immunity. *Biologicals, Detecting and Controlling BVDV Infections* 31(2), 107-112
- Phytothérapie — Wikipédia (s. d.) . [<https://fr.wikipedia.org/wiki/Phytoth%C3%A9rapie>] (consulté le 22/05/2018).
- POUCHARD A. (2012) Affaire du Mediator : le point si vous avez raté un épisode. *Le Monde.fr*
- PRADO M.E., PRADO T.M., PAYTON M., CONFER A.W. (2006) Maternally and naturally acquired antibodies to Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111(3-4), 301-307
- Protein A. (2018) . *Wikipedia* Page Version ID: 856676621
- PROVOST A., PERREAU P., BRÉARD A., et al. (1987) Péripleurésie contagieuse bovine. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. Epizoot.* 6(3), 565-624
- Qu'est-ce que la Pharmacopée ? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (s. d.) . [[https://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopée/Qu'est-ce-que-la-Pharmacopée/\(offset\)/0](https://ansm.sante.fr/Activites/Pharmacopée/Qu'est-ce-que-la-Pharmacopée/(offset)/0)] (consulté le 18/09/2018).
- RAWAT P., KHAN M.F., KUMAR M., et al. (2010) Constituents from fruits of Cupressus sempervirens. *Fitoterapia* 81(3), 162-166
- RIBBLE C.S., MEEK A.H., JANZEN E.D., GUICHON P.T., JIM G.K. (1995) Effect of time of year, weather, and the pattern of auction market sales on fatal fibrinous pneumonia (shipping fever) in calves in a large feedlot in Alberta (1985-1988). *Can. J. Vet. Res.* 59(3), 167-172
- RICE J.A., CARRASCO-MEDINA L., HODGINS D.C., SHEWEN P.E. (2007) Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. *Anim. Health Res. Rev.* 8(2), 117-128
- RIOS L.Y., BENNETT R.N., LAZARUS S.A., et al. (2002) Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(5), 1106-1110
- SANDAL I., HONG W., SWORDS W.E., INZANA T.J. (2007) Characterization and Comparison of Biofilm Development by Pathogenic and Commensal Isolates of Histophilus somni. *J. Bacteriol.* 189(22), 8179-8185
- SANTOS-BUELGA C., SCALBERT A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80(7), 1094-1117
- SCHELCHER F. (1999) Bronchopneumonies infectieuses des bovins. , 6
- SCHMIDELY P., BELLOC C., DELBAC F., et al. (2017) Etat des lieux des alternatives aux antibiotiques en vue de diminuer leur usage en élevage - Elaboration d'une méthode d'évaluation des publications scientifiques et résultats
- SPENCER J.P.E., CHAUDRY F., PANNALA A.S., et al. (2000) Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272(1), 236-241
- TAYLOR J.D., FULTON R.W., LEHENBAUER T.W., STEP D.L., CONFER A.W. (2010) The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can. Vet. J.* 51(10), 1095-1102

- THOMAS A., DIZIER I., SACHSE K., *et al.* (2003) Mycoplasma bovis dans le complexe respiratoire bovin et propriétés de cyto-adhésion in vitro. *Ann. Médecine Vét.* 147(4, AUG-SEP)
- TIMSIT E., HALLEWELL J., BOOKER C., *et al.* (2017) Prevalence and antimicrobial susceptibility of Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, and Histophilus somni isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 208, 118-125
- TNS SOFRES POUR LES ENTREPRISES DU MÉDICAMENT (2011) Observatoire sociétal du médicament
- TOBLER M., KRIENBÜHL H., EGGER (1994) Caractéristiques d'extraits totaux de plantes fraîches. *Phytothérapie*
- UNITÉ DE PARASITOLOGIE ENVA (2016) Strongyloses respiratoires des ruminants
- UNITÉ PÉDAGOGIQUE DES ANIMAUX DES PRODUCTIONS ENVA (2017) Affections respiratoires des bovins
- VALARCHER J.-F., TAYLOR G. (2007) Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 38(2), 153-180
- VENTÉJOU M.-A. (2016) Phytothérapie : principes, méthodes et applications pratiques en productions animales. *Bull. GTV Médecines complémentaires*(Numéro spécial 2016), 92
- VETOQUINOL (1980) RCP - Cothivet.
- WAMINE (2013) Conseils d'utilisation des plantes. Wamine
- WINKLER M.T.C., DOSTER A., JONES C. (2000) Persistence and Reactivation of Bovine Herpesvirus 1 in the Tonsils of Latently Infected Calves. *J. Virol.* 74(11), 5337-5346
- WRIGHT G.D. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev., Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Opportunities for New Targeted Therapies* 57(10), 1451-1470
- ZHOU T. (2010) Numerical comparisons of bioassay methods in estimating LC50. Report. Kansas State University
- ZHU Y.-M., YU Z., CAI H., *et al.* (2011) Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China. *Virol. J.* 8(1), 557

Annexe 1 : Réponses des étudiants au questionnaire

Figure 54 : Réponses des étudiants de première année

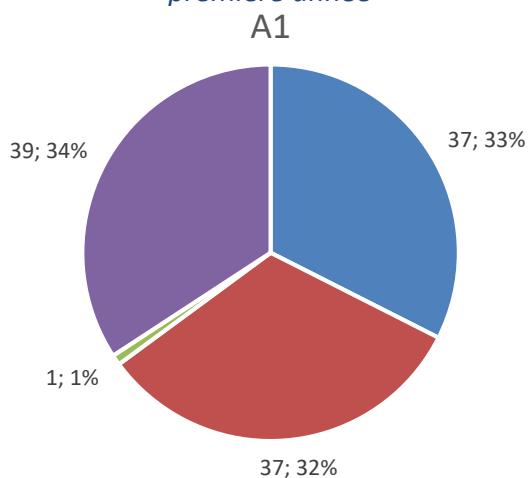


Figure 53 : Réponses des étudiants de deuxième année

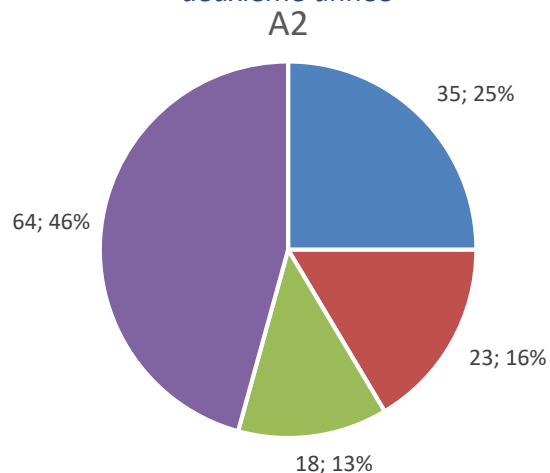


Figure 52 : Réponses des étudiants de quatrième année

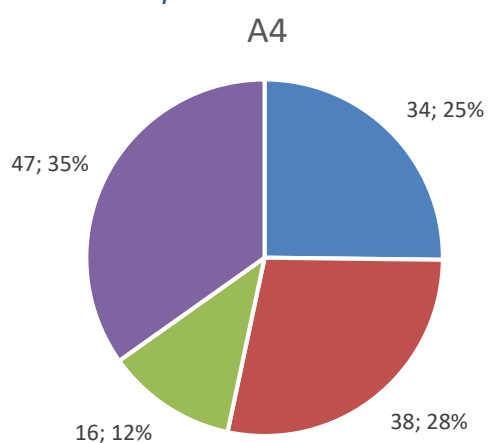


Figure 51 : Réponses des étudiants de cinquième année

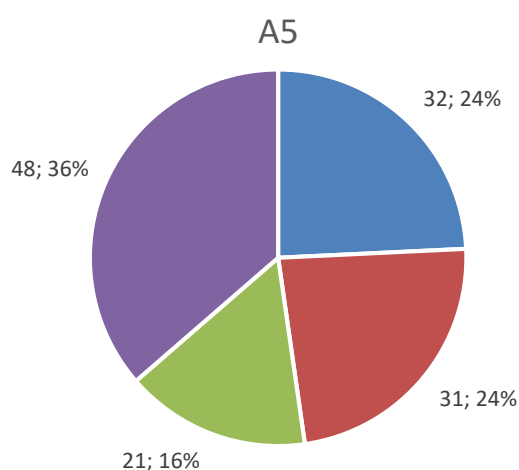
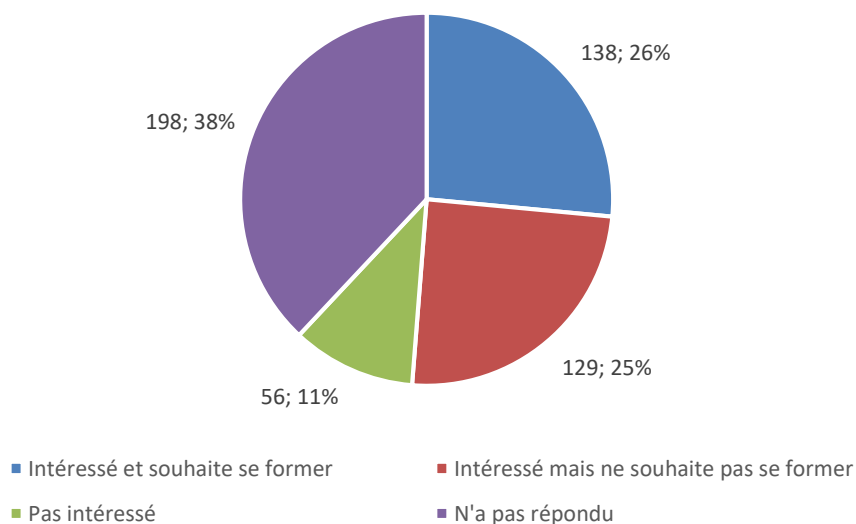
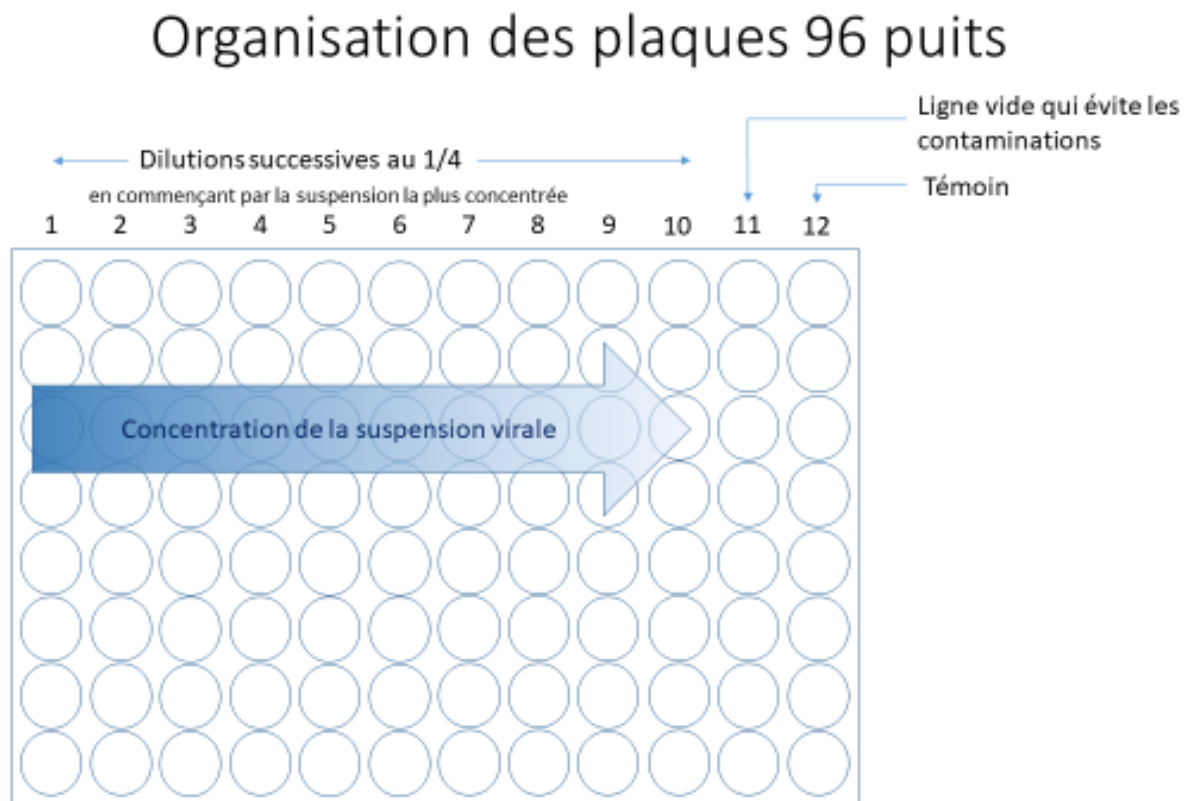


Figure 50 : Réponses des première, deuxième quatrième et cinquième années au questionnaire à propos de leur intérêt pour la phytothérapie (Nombre de répondants ; pourcentage)



Annexe 2 : Exemple de calcul de la concentration d'une suspension virale

Figure 55 : Exemple d'une plaque 96 puits et son organisation pour les tests de virucidie.



Formule de Spearman-Kärber :

log négatif *DICT*50

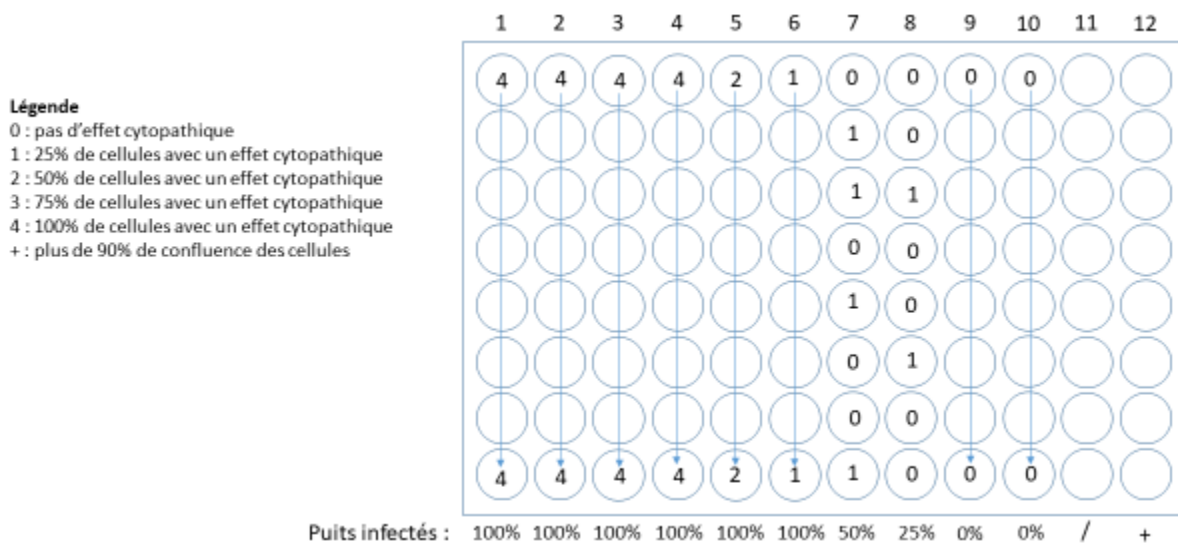
= log négatif la plus haute concentration de virus utilisée

– $\left[\left(\frac{\text{somme des pourcentages affectées à chaque dilution}}{100} \right) - 0,5 \right]$

× log dilution

Exemple de résultats de plaque 96 puits :

Figure 56 : Exemple de résultat d'un titrage viral



Avec ce résultat de lecture de la plaque 96 puits, sachant que la dilution entre chaque puit est de $\frac{1}{4}$ on obtient :

log négatif $DICT_{50}$

$$= \log \text{ négatif la plus haute concentration de virus utilisée} \\ - \left[\left(\frac{\text{somme des pourcentages affectées à chaque dilution}}{100} \right) - 0,5 \right] \\ \times \log \text{ dilution}$$

log négatif $DICT_{50}$

$$= -\log \text{ négatif } \frac{1}{4} \\ - \left[\left(\frac{100 + 100 + 100 + 100 + 100 + 100 + 50 + 25 + 0 + 0}{100} \right) - 0,5 \right] \times \log \frac{1}{4}$$

$$\log \text{ négatif } DICT_{50} = 0,6 + [(6,75) - 0,5] \times 0,6$$

$$\log \text{ négatif } DICT_{50} = 4,35$$

Dans cet exemple, la concentration de la suspension virale qui, mise en contact avec des cellules en tue 50%, est de $10^{-4,35}$.

Annexe 3 : Questionnaire envoyé aux vétérinaires

Utilisation des EPS (Extrait de Plantes fraîches Standardisées)

Étudiante à l'ENVA, je prépare une thèse qui vise à étudier l'utilisation de l'EPS de *Cupressus sempervirens* (Cyprès toujours vert) lors de pathologie respiratoire bovine. En particulier pour son effet antiviral.

Je vous serais très reconnaissante de bien vouloir prendre quelques minutes pour répondre à ce questionnaire afin de faire un bilan de vos expériences sur le terrain. Chaque vétérinaire est invité à répondre à ce questionnaire, même si vous n'utilisez pas l'EPS de Cyprès.

Merci !

* Question obligatoire

A propos de vous

1 - Dans quelle école avez-vous été formé ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ ENV Alfort
- ☐ ENV Lyon
- ☐ ENV Nantes
- ☐ ENV Toulouse
- ☐ Autre :

2 - Quelle est votre année de sortie ? (1993 par exemple) *

Votre activité

3 - Dans quelle région exercez-vous ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Auvergne-Rhône-Alpes
- ☐ Bourgogne-Franche-Comté
- ☐ Bretagne
- ☐ Centre-Val de Loire
- ☐ Corse
- ☐ Grand Est
- ☐ Haut-de-France
- ☐ Ile-de-France
- ☐ Normandie
- ☐ Nouvelle-Aquitaine
- ☐ Occitanie
- ☐ Pays de la Loire
- ☐ Provence-Alpes-Côte d'Azur

4 - Quel est votre pourcentage d'activité en médecine bovine ? (XX%) *

5 - Quel est le pourcentage de votre activité en élevages laitiers (par rapport à l'allaitant) ? (XX%) *

6 - Quel est le pourcentage d'éleveurs qui vous demandent des solutions "alternatives" à l'allopathie pour traiter leurs bovins ? (XX %) *

7 - Quel est le pourcentage d'élevages qui ont recours à la phytothérapie ? (XX%) *

8 - Parmi les élevages qui ont recours à la phytothérapie, combien sont certifiés biologiques ? (XX%) *

La phytothérapie

9 - Depuis quand utilisez-vous la phytothérapie ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Moins d'un mois
- ☐ Moins d'un an
- ☐ 1 à 5 ans
- ☐ 5 à 10 ans
- ☐ 10 à 15 ans
- ☐ plus de 15 ans

10 - Pour quelle(s) raison(s) avez-vous commencé à utiliser la phytothérapie ? *

Plusieurs réponses possibles.

- ☐ Par curiosité
- ☐ Convaincu par les laboratoires
- ☐ A la demande des éleveurs
- ☐ Par conviction personnelle
- ☐ Sur conseils de confrères
- ☐ Autre :

11 - Avez-vous suivi une formation en phytothérapie ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Non
- ☐ Oui

12 - Si oui, qui proposait cette formation ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Un laboratoire
- ☐ Un groupement technique
- ☐ Autre :

L'EPS de *Cupressus sempervirens* (Cyprès toujours vert)

13 - Utilisez-vous l'EPS de Cyprès ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Non *Passez à la question 33.*
- ☐ Oui *Passez à la question 14.*

L'EPS de *Cupressus sempervirens* (Cyprès toujours vert)

14 - Pour quel(s) type(s) d'atteintes utilisez-vous l'EPS de Cyprès ? *Plusieurs réponses possibles.

- ☐ Musculaire ou squelettique
- ☐ Respiratoire
- ☐ Neurologique
- ☐ Métabolique (hépatique et rénale)
- ☐ Digestive
- ☐ Autre :

15 - Quel(s) effet(s) recherchez-vous ? *

Plusieurs réponses possibles.

- ☐ Cicatrisant
- ☐ Anti-viral
- ☐ Anti-oxydant
- ☐ Protection des tissus conjonctifs
- ☐ Anti-inflammatoire
- ☐ Anti-parasitaire / Insecticide
- ☐ Anti-bactérien / Fongicide
- ☐ Autre :

16 - Dans la majorité des cas, avez-vous une étiologie certaine quand vous utilisez l'EPS de Cyprès ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Non
- ☐ Oui

17 - Si oui, laquelle ?

Efficacité de l'EPS de Cyprès sur les virus

18 - Dans le cas où vous recherchez une activité anti-virale, avez-vous noté une amélioration de l'état général de l'animal ? (3 correspondant à "aucune modification de l'état général de l'animal") *

Une seule réponse possible.

	1	2	3	4	5	
Dégradation						Guérison

19 - Quelles sont les améliorations que vous avez noté suite à un traitement à l'EPS de Cyprès ? *

Plusieurs réponses possibles.

- ☐ Disparition de l'hyperthermie
- ☐ Disparition de la toux
- ☐ Augmentation du GMQ
- ☐ Disparition des bruits respiratoires
- ☐ Arrêt des écoulements nasaux
- ☐ Amélioration de l'état général
- ☐ Autre :

20 - Dans le cas où vous avez pu faire des analyses, quels virus étaient en cause ? *

Plusieurs réponses possibles.

- ☐ Influenza
- ☐ Virus Respiratoire Syncytial Bovin
- ☐ Rhinotrachéite Infectieuse Bovine
- ☐ BVD / Maladie des Muqueuses
- ☐ Autre :

Autres traitements

21 - Dans un contexte de pathologie respiratoire, prescrivez-vous des traitements allopathiques en même temps que les traitements phytothérapeutiques à base d'EPS de Cyprès ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Non, jamais *Passez à la question 24.*
- ☐ Oui, toujours ou parfois *Passez à la question 22.*

Traitements supplémentaires

22 - Dans quelles conditions prescrivez-vous un traitement en plus de l'EPS de Cyprès ? *

Plusieurs réponses possibles.

- ☐ Vous le faites systématiquement

- Lorsque vous suspectez une surinfection bactérienne
- Lorsque l'état général de l'animal est très dégradé
- Autre :

23 - Quelles sont les traitements que vous prescrivez en plus des extraits de plantes ? *

Plusieurs réponses possibles.

- Antibiotiques
- Anti-inflammatoires non stéroïdiens
- Anti-inflammatoires stéroïdiens
- Autre :

Modalités d'usage et posologie

24 - Dans la majorité des cas, utilisez-vous l'EPS de Cyprès seul ou en mélange avec d'autres EPS ? *

Une seule réponse possible.

- Seul
- En mélange

25 - Si vous l'utilisez en mélange, à quel EPS l'ajoutez-vous le plus souvent ? Réalisez-vous d'autres associations ? (huiles essentielles, homéopathie...) *

Une seule réponse possible.

- Non
- Oui

26 - Si, oui, lesquelles ?

27 - Quelle quantité d'EPS de Cyprès prescrivez-vous pour chaque prise ? *

28 - Combien de fois par jour ? *

29 - Pendant combien de jours ? *

30 - Comment avez-vous choisi cette posologie ? *

Plusieurs réponses possibles.

- Posologie proposée par le laboratoire
- Adaptée avec votre expérience personnelle
- Conseillée par des confrères
- Autre :

31 - Avez-vous noté des effets secondaires à l'utilisation de l'EPS de Cyprès ? *

Une seule réponse possible.

- Non
- Oui

32 - Si oui, lesquels ?

Réglementation

33 - Selon vous, les EPS sont-ils des médicaments ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Non
- ☐ Oui

34 - Si non, devraient-ils avoir ce statut ?

Une seule réponse possible.

- ☐ Non
- ☐ Oui

35 - Prescrivez-vous un temps d'attente après l'utilisation d'extraits de plantes ? *

Une seule réponse possible.

- ☐ Non *Passez à la question 38.*
- ☐ Oui *Passez à la question 36.*
- ☐ Cela dépend des extraits *Passez à la question 36.*

Réglementation

36 - Si vous l'utilisez, quel est le temps d'attente lait que vous prescrivez pour l'EPS de Cyprès ? (en jours)

37 - Si vous l'utilisez, quel est le temps d'attente viande que vous prescrivez pour l'EPS de Cyprès ? (en jours)

38 - Souhaitez-vous recevoir un exemplaire de la thèse par mail ?

Une seule réponse possible.

- ☐ Non
- ☐ Oui

Merci beaucoup pour vos réponses !

Amandine Prélôt-Claudon

UTILISATION DE L'EXTRAIT DE PLANTES FRAÎCHES STANDARDISÉ DE *CUPRESSUS SEMPERVIRENS* (CYPRÈS TOUJOURS VERT) COMME VIRUCIDE LORS DE MALADIES RESPIRATOIRES DES BOVINS

NOM et Prénom : PRÉLOT-CLAUDON Amandine

Résumé : La pathologie respiratoire est une pathologie majeure en élevage bovin. Elle induit des pertes économiques non négligeables et impacte sérieusement le bien-être animal. La maladie respiratoire la plus courante est la broncho-pneumonie infectieuse enzootique (BPIE). Son traitement repose en grande partie sur une antibiothérapie. Or aujourd'hui, avec la prise de conscience du développement de l'antibiorésistance, des plans nationaux ont été mis en place afin de promouvoir une prescription raisonnée des antibiotiques. Pour y parvenir, plusieurs solutions sont envisagées. L'une d'elle repose sur l'utilisation des médecines alternatives dont fait partie la phytothérapie. Cette médecine, basée sur l'utilisation des plantes, pourrait être une aide dans la lutte contre les bronchopneumonies, en limitant le pouvoir pathogène des virus par exemple. En réduisant la pathologie virale, la colonisation des poumons par des bactéries serait limitée et l'usage d'antibiotiques réduit.

Or l'extrait de Cyprès a été étudié pour son effet antiviral. L'effet virucide d'un extrait de plantes fraîches standardisé (EPS) de Cyprès toujours vert (*Cupressus sempervirens*) a été testé contre deux virus responsables de BPIE chez les bovins : le virus respiratoire syncytial bovin et l'Herpès virus bovin. L'extrait a montré un effet virucide contre ces deux agents pathogènes *in vitro*.

Pour évaluer l'utilisation et l'opinion des vétérinaires sur l'efficacité de cet EPS de Cyprès, un questionnaire a été envoyé à un panel de vétérinaires pratiquant la phytothérapie. Il en résulte que parmi ces vétérinaires, environ la moitié utilise cet EPS. D'après leur avis, il y aurait une amélioration de l'état général de l'animal lorsqu'une atteinte virale est suspectée et qu'il est traité avec de l'EPS de Cyprès. Cependant, dans la plupart des cas, l'EPS de Cyprès est mélangé à d'autres extraits de plantes et un traitement allopathique (antibiotique, anti-inflammatoire...) et un autre traitement alternatif (homéopathie, acupuncture...) sont associés à la phytothérapie. L'effet observé ne peut donc pas être considéré comme uniquement dû à l'EPS de Cyprès. Cependant, très peu d'effets délétères ont été observés suite à l'utilisation de cet extrait (seulement dans cinq cas sur quarante-huit vétérinaires utilisant l'extrait).

Ces résultats tant *in vitro* que *in vivo*, même s'ils ne permettent pas de conclure à l'efficacité de l'EPS de Cyprès contre des virus bovins en élevage, encouragent à poursuivre les recherches sur son effet virucide. L'évaluation de sa biodisponibilité chez les bovins pourrait être la prochaine étape dans la démonstration de son efficacité en élevage.

Mots clés : CUPRESSUS SEMPERVIRENS – CYPRÈS – PHYTOTHÉRAPIE – MALADIE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE – VIROSE – THÉRAPEUTIQUE - BOVIN

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr Yves MILLEMANN

Co-Directeur : Dr Sébastien PERROT

Assesseure : Dr Fabienne CONSTANT

Invités : Claude FAIVRE, Isabelle GUINOBERT

USE OF STANDARDIZED FRESH PLANT'S EXTRACT OF *CUPRESSUS SEMPERVIRENS* (CYPRESS) AS A VIRUCIDE AGAINST BOVINE'S RESPIRATORY DISEASES

SURNAME and Given Name : PRÉLOT-CLAUDON Amandine

Abstract : Respiratory diseases are of paramount importance in cattle. They are responsible for huge economical losses and impact on animal welfare. The most common pathology is the bovine respiratory disease (BRD). Its treatment is mostly based on an antibiotherapy. Nowadays, awareness of resistance to antibiotics led to carry out national plans that promote a well-reasoned use of antibiotics. To succeed, many solutions have been considered. One of these is the use of alternative medicines such as phytotherapy. This medicine, based on the use of plants, could be helpful against BRD, by reducing consequences of viral infections. The decrease of deleterious consequences of viral infections may help reducing bacterial colonization and so antibiotic use too.

This study has been focusing first on the evaluation of the antiviral effect of Cypress extract. The virucidal effect of a standardized fresh plants extract of Cypress (*Cupressus sempervirens*) has been tested against two bovine viruses : the respiratory syncytial virus and the bovine herpesvirus. The extract was efficient against these two viruses in vitro.

To evaluate the use of this extract as well as the opinion of veterinarians about Cypress extract efficiency, a questionnaire has been sent to veterinarians using phytotherapy. Almost the half of them is using Cypress extract. According to them, the use of the extract may lead to a global health improvement when a viral infection is suspected. Nevertheless, when used, in most cases, the extract is mixed with others extracts and an allopathic treatment is added. The observed effect cannot be considered to be only due to the Cypress extract. However, just a few adverse effects have been reported (only 5 out of 48).

Even if we cannot conclude on the efficiency of Cypress extract, these results encourage to pursue research about its virucidal effect on cattle. A next step to demonstrate its efficiency could be to assess its biodisponibility.

Keywords : CUPRESSUS SEMPERVIRENS – CYPRESS – PHYTOTHERAPY – RESPIRATORY DISEASE – VIRUS – THERAPEUTIC - CATTLE

Jury :

President : Pr.

Director : Pr Yves MILLEMANN

Co-Director : Dr Sébastien PERROT

Assessor : Dr Fabienne CONSTANT

Guests : Claude FAIVRE, Isabelle GUINOBERT