

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Université Abdelhamid BEN BADIS
de Mostaganem
Faculté des Sciences de
la Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
بمستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2016

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M^{elle} KOURI Fatima

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Exploitation des écosystèmes microbiens laitiers

THÈME

***Isolement et caractérisation des bactéries responsables
des mammites chez les bovins
De la ferme expérimentale de l'université de Mostaganem***

Soutenue publiquement le 03/07/2016

DEVANT LE JURY

Président	Mr NEMICHE	M.C.A	U. Mostaganem
Examineur	Mme TAHALAITI	M.A.A	U. Mostaganem
Invité	Mr SEBAI	Dr Vétérinaire Spécialiste	Laboratoire vétérinaire régional
Encadreur	Mme RECHIDI-SIDHOUM	M.A.A	U. Mostaganem
Co-encadreur	Mr BOUCHERF	Docent	U. Mostaganem

Année universitaire 2015/2016

Liste des tableaux

<u>Tableau01</u> : Flore originelle du lait cru.....	18
<u>Tableau 02</u> : Germes contaminant le lait cru.....	20
<u>Tableau 03</u> : Sources et niveaux de contamination du lait.....	21
<u>Tableau04</u> : Les espèces bactériennes responsables de 90% des mammites en élevage laitier.....	31
<u>Tableau 05</u> : Répartition (en%) des différents types cellulaires dans le lait de vache en l'absence et en présence d'infection mammaire.....	40
<u>Tableau06</u> : Information géographiques concernant la ville de Hassi Mameche.....	44
<u>Tableau07</u> : les germes pathogènes étudiés et leurs milieux sélectifs....	48
<u>Tableau08</u> : Résultats du dénombrement des <i>staphylocoques</i> en milieu Chapman.....	62
<u>Tableau09</u> : Résultats du dénombrement des <i>streptocoques</i> en milieu Chapman.....	63
<u>Tableau10</u> : Résultats de l'antibiogramme des <i>Staphylocoques</i>	70
<u>Tableau11</u> : Résultats de l'antibiogramme des <i>Streptocoques</i>	70

Liste des Figures

Figures01: Schéma de la glande mammaire.....	14
Figures02: Schéma du trayon.....	15
Figures03: Evaluation de la propreté des vaches.....	28
Figures04: test papier indicateur des mammites.....	47
Figure05: étuve.....	48
Figure07: vortex.....	49
Figure08: Distributeur des antibiotiques.....	49
Figure 09 : indice de propreté des vaches de la ferme.....	58
Figure10: Résultat du test papier indicateur des mammites.....	58
Figure11: Staphylocoques.....	60
Figure12: Staphylocoques pathogènes.....	61
Figure13: Streptocoques.....	62
Figure14: Résultats du test BHIB.....	63
Figure15: Résultats du test plasma de lapin.....	64
Figure 16: Résultats du test catalase des staphylocoques.....	64
Figure17: Résultats du test oxydase des staphylocoques.....	65
Figure18: Résultats du test de présomption des streptocoques	66
Figure19: Résultats du test de confirmation des streptocoques fécaux...66	
Figure20: Résultats du test catalase des streptocoques.....	67
Figure21: Résultats du test oxydase des streptocoques.....	68

Figure22: Résultats d'ensemencement dans milieu GN.....68

Figure23: Résultats de l'antibiogramme des staphylocoques69

Figure24: Résultats de l'antibiogramme des streptocoques69

Tables des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Liste des abréviations	
Introduction	05

Chapitre I : Généralités sur les bovins

1. Alimentation	07
2. Suivi sanitaire.....	07
3. Généralité sur les mamelles	08
3.1. Fonctionnement de la mamelle.....	09
- Aspect de la montée du lait suite à la mise-bas.....	09
3.2. Anatomie de la glande mammaire.....	10
3.3. Anatomie du trayon.....	11
4. Généralité sur le lait.....	12
4.1. Définition du lait.....	12
4.1.1. Flore originelle.....	13
4.1.2. Flore de contamination.....	14

Chapitre II Les mammites bovines

1. Définition de la mammite.....	18
2. Classification des mammites et Aspects cliniques.....	19
2.1. Les mammites cliniques.....	19
2.1.1. La mammite gangreneuse	20
2.1.2. La mammite d'été	21
2.1.3. La mammite à nocardia astéroïdes	21
2.1.4. La mammite colibacillaire	21
2.2. Les mammites subcliniques	22
3. Origine des mammites	23

3.1. Le modèle hexagonal	23
3.2 Bactéries impliquées dans les mammites.....	26
3.2.1 Agents pathogènes majeurs.....	26
3.2.2 Agents pathogènes mineurs.....	26
3.3 Les Staphylocoques	28
3.4 Les Streptocoques.....	28
3.5 Les autres bactéries pathogènes.....	29
3.6 Les autres agents pathogènes	29
4. Les mécanismes de défense de la mamelle.....	30
4.1 Au niveau de la glande mammaire.....	30
4.2 Au niveau du trayon	32
5. Importance des mammites.....	33
5.1 Importance médicale des mammites.....	33
5.2 Importance sanitaire des mammites.....	33
5.3 Importance économique des mammites.....	34

Chapitre III Diagnostic de mammite

1. Prophylaxie sanitaire	36
1.1 Dépistage des mammites.....	36
1.1.1 Numération des cellules somatiques.....	36
1.1.2 Test de CMT (Californian Mastitis Test).....	38
1.1.2.1 Principe du test.....	38
1.1.2.2 Réalisation du test.....	38
1.1.3 Papier indicateur de mammites.....	39
2. Prophylaxie médicale	39

Chapitre IV Matériels et méthodes

1. Objectif.....	40
2. Présentation de la zone d'étude.....	40
2.1 Situation sanitaire des vaches	42
2.2 Alimentation des vaches	42
2.3 Hygiène de la traite	42
2.4 Production laitière par jour.....	42
2.5 Saison de prélèvement.....	42
2.6 Laboratoire vétérinaire régional.....	43
3. Détection des mammites.....	43
4. Prélèvements	44
5. Analyse microbiologique	44
5.1 Préparation des dilutions décimales.....	46
5.2 Etude de des germes pathogènes.....	47
5.2.1 Méthode de calcule et dénombrement bactérien.....	47
5.2.1.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux... 47	
5.2.1.2. Recherche et dénombrement des Staphylocoques aureus.....	48
5.2.1.2.1 Ensemencement dans un Chapman.....	48
5.2.1.2.2 Ensemencement dans un milieu Baird Parker	48
5.2.1.2.3 Test BHIB.....	49

5.2.1.2.4 Test plasma de lapin.....	49
5.2.1.2.5 Test de catalase	50
5.2.1.2.6 Test d'oxydase	50
5.2.1.3. Recherche et dénombrement des Streptocoque	51
5.2.1.3. 1Ensemencement en surface.....	51
5.2.1.3. 2Test de présomption	51
5.2.1.3. 3Test de confirmation	52
5.2.1.3. 4Test à la catalase.....	52
5.2.1.4.5 Test d'oxydase.....	53
6. Antibiogramme.....	53

Chapitre V Résultats et discussions

1. Indice de propreté.....	55
2. Résultat du test papier indicateur mammites.....	55
3. Analyse microbiologique	56
3.1 Les coliformes fécaux	56
3.2 Staphylocoques.....	56
3.2.1 Résultats d'ensemencement dans un milieu Chapman.....	56
3.2.2. Résultats d'ensemencement dans un milieu Baird Parker.....	57
3.3 Les Streptocoques.....	58
3.4 Résultats de dénombrement des germes photogènes.....	59
3.5 Résultats des tests	59

3.5.1. Test de BHIB.....	59
3.5.2. Test plasma de lapin	60
3.5.3. Test à la catalase.....	61
3.5.4. Test d'oxydase.....	61
3.5.5. Test de présomption.....	62
3.5.6. Test de confirmation.....	63
3.5.7. Test de catalase.....	63
3.5.8. Test d'oxydase.....	64
4. Antibiogramme.....	64
Discussion.....	68
Conclusion.....	72
Références bibliographiques.....	73
Annexes.....	79

Liste des abréviations

CMT: California Mastitis Test

S: Staphylococcus

PPCB: Péripleumonie contagieuse bovine

LPS: Système lactoperoxydase

PMN: Polynucléaires neutrophiles de la glande mammaire

CCS: Comptage des cellules somatiques

UFC: Unité formant colonie

JORA: journal officiel république algérienne

BHIB: BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar (gélose pour infusion coeur-cervelle)

VAN30 : Vancomycine

NEO30 : Néomycine,

TET30 : Tétracyclines,

AMC : Amoxicilline,

FOX : Céfoxitine,

ENR : Enrofloxacin

OXA : L'oxacilline

P : Pénicilline

CHL30 : Chloramphénicol

AMP01 : Ampicilline

Les mammites bovines constituent un facteur pathologique dans les élevages laitiers où elles occasionnent des pertes économiques considérables, en raison de la chute de la production laitière, des pertes dans l'industrie laitière ainsi que les coûts thérapeutiques et prophylactiques des animaux (**Faye et al., 1994**). La connaissance de la fréquence de l'infection mammaire chez la vache laitière présente un intérêt majeur pour la définition et l'adaptation des programmes de maîtrise de la pathologie mammaire (**Coulon, 1999**).

En Algérie, comme dans la plupart des pays, les mammites constituent une entité pathologique préoccupante. La production laitière a connu une évolution spectaculaire durant la dernière décennie (**Saidi et al., 2001**). Mais malgré cet effort remarquable, l'Algérie demeure en dessous de la suffisance en lait. Il reste de ce fait à assurer la qualité hygiénique du lait qui est tributaire de l'état sanitaire de la glande mammaire. Pour répondre à ces objectifs, nous avons appliqué la méthode de dépistage de mammites en utilisant le papier indicateur de mammites, les analyses microbiologiques et l'antibiogramme pour la recherche de la sensibilité bactérienne.

Pour réaliser l'objectif, nous avons réparti ce travail en deux parties :

Dans la première partie, nous avons essayé de rappeler globalement les connaissances de la structure, le fonctionnement et l'immunité de la mamelle et les bactéries pathogènes responsables de mammites.

Dans la deuxième partie, non seulement nous avons cité les méthodes des analyses microbiologiques des mammites, mais nous avons résumé en plus les résultats obtenus des réalisations expérimentales sous forme des tableaux explicatifs des analyses bactériologiques du lait mammitieux, ainsi que l'antibiogramme.

Enfin nous avons achevé ce travail par une confrontation de ces résultats avec des normes, pour l'évaluation de cette recherche et valider les résultats.

Ce travail de recherche a été réalisé tant au laboratoire des sciences et techniques de production animale de l'université, qu'au laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem.

Chapitre I : Généralités sur les bovins

1) Alimentation

L'alimentation des animaux est basée sur l'exploitation du pâturage naturel d'une manière rationnelle, quelques endroits pâturées durant la saison des pluies et qui seront réservées pour la saison sèche de l'année suivante afin que le stock de semences puisse se reconstituer.

La complémentation alimentaire est sélective et est limitée aux vaches laitières, aux vaches gestantes, aux animaux affaiblis et/ou malades et aux veaux. Ces animaux reçoivent des pellettes, luzernes, trèfles, l'herbe, et souvent du son de blé et du fourrage. En raison du coût élevé des compléments alimentaires, la complémentation se fait durant la saison sèche. Par contre, du sel, sous forme de pierre à lécher, est distribué aux animaux deux fois dans l'année, une fois durant la saison de pluie et une seconde fois durant la saison froide (**Abdelkrim, 2009**).

2) Suivi sanitaire

Sur le plan sanitaire, l'intervention s'articule autour de trois axes : la vaccination, le déparasitage et le traitement des animaux malades. Les animaux sont vaccinés contre les principales maladies, particulièrement celles qui sont réputées légalement contagieuses à savoir la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB), la pasteurellose septicémique bovine, ou anthrax

Le déparasitage est systématique. Chaque semaine, les animaux subissent en masse un déparasitage externe par pulvérisation contre les tiques. Ensuite, deux fois par an, les animaux sont traités contre les parasites gastro-intestinaux, une première fois en début de saison des pluies, et une seconde fois en début de saison sèche. Quant aux animaux

malades, ils reçoivent des traitements appropriés sous la supervision du vétérinaire en charge du suivi sanitaire (**Abdelkrim, 2009**).

3) Généralités sur les mamelles

Les mamelles de la vache sont des glandes cutanées spécialisées dont la fonction est de sécréter du lait.

La mamelle est formée de quarts quartiers qui comportent une partie purement glandulaire. Le parenchyme mammaire est constitué de lobes, eux-mêmes divisés en lobules formés d'acini ou d'alvéoles glandulaires. Chaque alvéole est constituée principalement d'une couche monocellulaire (lactocytes) qui est le lieu de synthèse du lait.

Les lactocytes entourent la lumière alvéolaire et reposent sur un fin réseau de cellules myoépithéliales. Sur le bassinnet s'ouvrent de nombreux gros canaux lactifères qui conduisent le lait vers le trayon au fur et à mesure que ces canaux remontent vers le haut de la mamelle, ils se ramifient à la façon des branches et branchettes d'un arbre. Les canaux les plus fins et les canalicules débouchent sur les alvéoles.

Le système lobulo-alvéolaire est englobé dans un tissu, appelé stroma, constitué de fibrocytes, d'adipocytes et de fibres de collagène, la masse glandulaire épithéliale est une structure transitoire, elle ne se forme qu'au cours de la gestation, elle produit le lait pendant la lactation et elle disparaît après le tarissement (**Lepage, 1999**).

3.1 Fonctionnement de la mamelle

La mamelle de la vache laitière forte productrice de lait est un organe pourvu d'une forte vascularisation, puisque ce système de vaisseaux apporte les éléments nécessaires à la formation du lait par les lactocytes.

Les alvéoles mammaires sont de petites usines de lait. Elles travaillent jour et nuit.

Elles prennent les éléments nutritifs nécessaires (glucose, acides aminés, acides gras, eau et sels minéraux) du sang pour les transformer en lait qui se collecte à l'intérieur de la lumière alvéolaire.

Au moment de la traite, les cellules myoépithéliales stimulées par l'ocytocine se contractent pour expulser le lait de la lumière alvéolaire à travers le canal alvéolaire vers les canaux galactophores puis vers le sinus lactifère (Lee et al., 1980).

- Aspect de la montée du lait suite à la mise-bas

La lactogènes, ou montée de lait, est le déclenchement de la sécrétion de lait suite à la mise-bas. Elle s'inscrit dans une succession d'événement débutant au cours de la gestation, assurant la pénétration de l'adaptation, non seulement de la mamelle mais aussi de l'ensemble du métabolisme maternel.

Ainsi, lors de la gestation, la glande mammaire subit une multiplication et une différenciation des cellules alvéolaires, puis elle acquiert la capacité à produire du lait lors des dernières semaines. Dans le même laps de temps, on assiste à une véritable déviation du métabolisme maternel au profit de la mamelle. L'augmentation de la qualité de sang traversant la mamelle lui fournit les métabolismes nécessaires à la sécrétion du lait. Ces modifications sont sous le contrôle de différentes

hormones, principalement des œstrogènes en alternance avec de la progestérone. Ces hormones stimulent le développement des canaux et des acini pendant la fin de gestation « ce qui correspond aux dernières semaines de tarissement » (**Cauty et Perreau, 2009**).

3.2 Anatomie de la glande mammaire

La figure 01 représente l'anatomie de la glande mammaire. cette glande pèse 50kg, en moyenne, et en fonction de l'âge, sa conformation constituée de 4 quartiers anatomiquement séparés par des ligaments, ce qui ne permet pas le passage direct d'une bactérie à l'autre. La synthèse du lait s'effectue dans les alvéoles (vésicules de 100 à 300 microns), tandis que la capacité de la citerne 1 litre de lait (moyenne), la distribution du lait dans la mamelle avant la traite est de 60% dans les alvéoles ,20% dans les canaux ,20% dans la citerne.

La mamelle constitue de lactocytes internes, cellules myoépithéliales externes, Réseau artério-veineux périphérique (500 litres de sang /l de lait), Système excréteur (canaux galactophores, citerne du pis, sinus et canal du trayon).

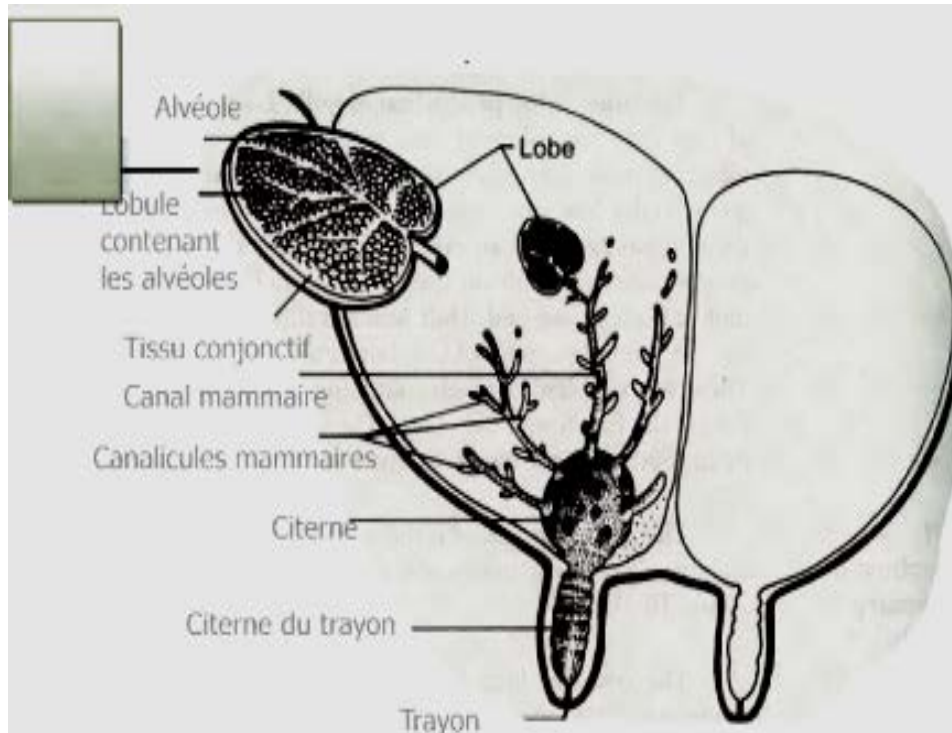


Figure01 : Schéma de la glande mammaire

(http://www.memoireonline.com/03/12/5537/m_Contribution--l-évaluation-des-pratiques-frauduleuses-dans-le-lait--la-reception0.html) consulté le 06/05/2016.

3.3 Anatomie du trayon

La figure 02 représente un Schéma détaillé du trayon. La longueur de ce dernier est de 3 à 10 cm, tandis que son diamètre est de 2 à 4 cm. Le trayon se compose de : un Repli annulaire (tissu érectile veineux) entre la citerne du pis et le sinus du trayon, de nombreux vaisseaux et nerfs (terminaisons nerveuses, mécano et thermorécepteurs), canal du trayon (Longueur 5 à 13 mm), (Diamètre 1 à 2 mm ouvert, 0.4 mm fermé), kératine tapisse la paroi interne du canal (captation des bactéries), sphincter terminal, anneau de tissu lymphocytaire, le mamelon ou ostium papillaire (Ch. Hanzen, 2008).

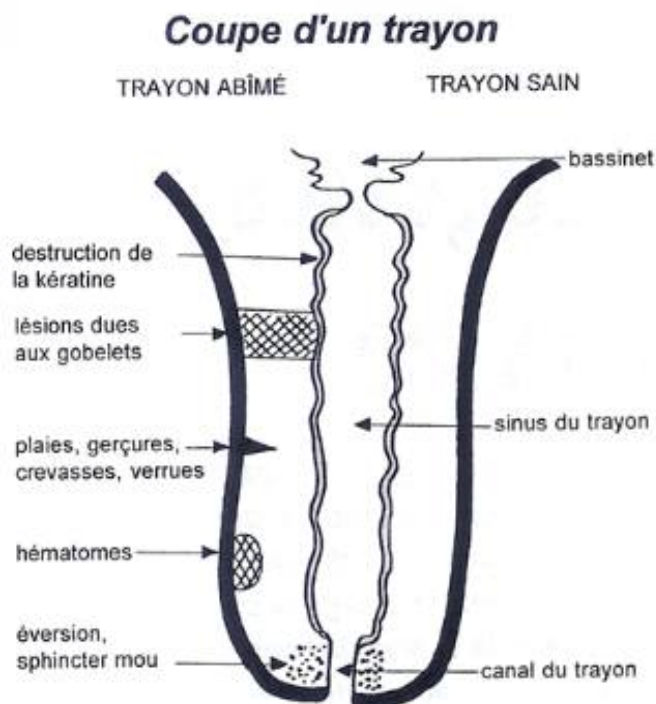


Figure 02 : Schéma du trayon

(http://www.memoireonline.com/03/12/5537/m_Contribution--l-évaluation-des-pratiques-frauduleuses-dans-le-lait--la-reception0.html) consulté le 06/06/2016

4) Généralités sur le lait

4.1. Définition du lait

Selon le congrès international de la répression des fraudes alimentaires à Genève de 1908 : le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir le colostrum (Debry, 2006).

Le lait contient un nombre variable de cellules ; celles-ci correspondent à la fois à des constituants normaux comme les globules

blancs, mais également à des éléments d'origine exogène que sont la plupart des microorganismes contaminants (**Gripon et al., 1975**).

Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries, mais on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire, des virus.

De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique, etc), des substances aromatiques, de l'acide lactique (responsable de l'acidification en technologie fromagère), diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (**Institut De L'élevage, 2009**).

L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages (**Agabriel et al., 1995**), mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (**Robinson, 2002**).

Un lait est considéré comme peu contaminé s'il renferme quelques centaines à quelques milliers de germes par millilitre, un lait fortement pollué peut en contenir plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions par ml (**Ramet, 1985**).

Dans cette microflore contaminante, les bactéries conditionnent le plus directement la qualité hygiénique ainsi que l'aptitude à la conservation et à la transformation de la matière première (**Adda., et al 1982**).

4.1.1 Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 103 germes/ml).

A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées acténines à activité limitée dans le temps « une heure environ après la traite » (Cuq, 2007).

La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (Vignola, 2002).

Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles.

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (Guiraud, 2003). Et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Varnam *et al.*, 2001).

Tableau01 : Flore originelle du lait cru

Le tableau 01, regroupe les principaux microorganismes originels du lait et leurs proportions relatives (Crema, 2003).

Microorganismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus sp.</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus ou Lactococcus</i>	< 10
Gram négatif	<10

4.1.2 Flore de contamination

Cette flore est l'ensemble des microorganismes contaminant le lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération, qui causera des défauts sensoriels ou qui réduira la durée de conservation des produits (**Vignola, 2002**).

Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : entérobactéries, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, microcoques, corynébactéries, *Bacillus*, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière.

Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de *Clostridium*, d'entérobactéries coliformes, et éventuellement, d'entérobactéries pathogènes: *Salmonella*, *Yersinia*. Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (**Leyral G. et al., 2007**).

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : *Streptococcus pyogenes*, *Corynebactérium pyogenes*, staphylocoques, etc. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella* ; *Brucella*, agent de la fièvre de Malte, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, agent de la listériose, *Mycobacterium bovis* et *tuberculosis*, agents de la tuberculose, *Bacillus anthracis*, agent du charbon, *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre, et quelques virus.

Hormis les maladies de la mamelle, le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant, du trayon, du matériel de récolte du lait et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks).

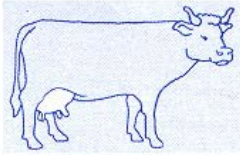

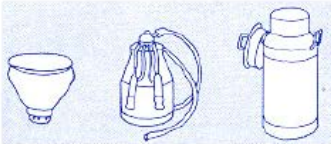
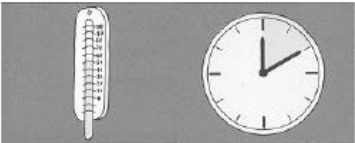
Tableau 02: Germes contaminant le lait cru

Le tableau 02 représente les sources de contamination du lait cru (Jakob *et al.*, 2009).

Sources de contamination	Sources de contamination	Psychrotrophes
Germes Gram positifs -Germes sporulés aérobies	Terre, poussière, foin (très répandu)	Certaines espèces
-Germes sporulés anaérobies (clostridies)	Ensilage, fourrage vert en fermentation, boue	Non
-Entérocoques	Fèces, résidus de lait	Non
Staphylocoques	Peau, muqueuses	Non
-Microcoques	Peau, résidus de lait	Certaines espèces
-Bactéries propioniques	Peau, résidus de lait, fourrage vert en fermentation, ensilage	Non
-Bactéries lactiques	Plantes, ensilages, résidus de lait, muqueuses	Non
-Bactéries corynéformes	Peau, sol	Certaines espèces
Germes Gram négatifs -Colibactéries (<i>E. coli</i>)	Fèces, eaux usées	Non
<i>Entérobactéries</i>	Plantes, fèces, eaux usées	Certaines espèces
<i>Pseudomonas</i>	Eau, sol (très répandu)	Oui
Alcaligenes, Flavobacterium, etc.	Eau, sol (très répandu)	Oui
Levures	Sol, plantes, résidus de lait (très répandues)	Oui

Tableau 03: Sources et niveaux de contamination du lait

Le tableau 03 représente les niveaux et les sources de contamination du lait chez les bovins (Crema, 2003).

	Normal	Anormal	
Pis	< 100 germes par millilitre	100'000 et plus par millilitre	
Environnement	1'000 – 5'000 germes par millilitre	10'000 et plus par millilitre	
Ustensiles à lait	1'000 - 30'000 germes par millilitre	100'000 et plus par millilitre	
Refroidissement et durée de stockage	pas d'augmentation significative	500'000 et plus par millilitre	

Chapitre II : les Mammites bovines**1) Définition de la mammite**

La mammite est un état inflammatoire de la mamelle, caractérisée par la présence de germes pathogènes dans le lait, la présence de cellules, dites somatiques, en nombre anormalement élevé, et de modifications chimique et biochimique du lait (**Beaudeau et al., 1997**).

Malgré tous les efforts et les mesures prises pour le contrôle de cette maladie, la mammite bovine reste la maladie la plus importante et la plus coûteuse au niveau de l'industrie laitière.

La mammite ou l'inflammation au niveau de la glande mammaire se développe lorsqu'un agent pathogène réussit à traverser les barrières du canal du trayon et à se multiplier au niveau du lait. Lorsque les mécanismes de défense immunitaire combattent cette infection rapidement et de façon efficace, la mammite sera de faible intensité et transitoire. Par contre, lorsque les mécanismes de défense sont compromis, lors de la période de parturition par exemple, ou lorsque l'agent pathogène possède des mécanismes d'évasion face au système immunitaire, la mammite sera plus sévère ou chronique. L'intensité de la réponse inflammatoire déterminera le type de mammite, subclinique ou clinique.

Classiquement, la mammite bovine peut se diviser en deux grandes catégories, contagieuse et environnementale. Les agents pathogènes de la glande mammaire qui sont considérés comme étant contagieux sont ceux qui sont adaptés pour une survie chez l'hôte, particulièrement au niveau de la glande mammaire. Le mode de transmission se fait principalement d'un quartier infecté vers un quartier sain et d'une vache à l'autre lors du

moment de la traite. Les agents contagieux ont la capacité de persister au niveau de la glande mammaire.

Les microorganismes pathogènes environnementaux sont des agents opportunistes. Typiquement, ils infectent la glande mammaire, se multiplient, engendrent une réponse immune et sont rapidement éliminés **(Julie-Hélène, 2014)**.

2) Classification des mammites et aspects cliniques

On peut classer les mammites selon les modifications de la mamelle « chaleur, douleur, rougeur, gonflement », la composition du lait « grumeaux, couleur » **(Blood et al., 1976)**.

2.1. Les mammites cliniques

Un examen attentif des caractéristiques macroscopiques de la sécrétion mammaire, une inspection et une palpation de la mamelle et des nœuds lymphatiques rétro-mammaires (souvent négligés) permettent de diagnostiquer et de caractériser les différentes formes de mammites cliniques. **(Béatrice, 2007)**.

La mammite Cliniques est une inflammation de la mamelle dont l'origine la plus fréquente est la filtration de bactéries dans un quartier par le canal de trayon. Chez la vache, la mammite se manifeste par:

- une modification non clinique de la sécrétion lactée (diminution de production et augmentation du nombre de cellules somatiques sans aucun signe clinique) ;

- une modification de la sécrétion suivie de signes cliniques fonctionnels (grumeaux, sang ou caillots sanguins, pus dans le lait), de signes cliniques locaux (gonflement, chaleur, douleur, rougeur) et de signes cliniques généraux (température plus ou moins élevée, avec ou

sans appétit et, quelquefois, en décubitus, un état de choc)(**Abdoulkarim , 2012**).

Cette maladie est associée à des symptômes visibles comme l'inflammation de la mamelle (dure, enflée, chaude, douloureuse), la modification de l'aspect du lait (présence de grumeaux, variations de couleur, d'odeur et d'aspect). Dans les cas suraigus, l'état général de la vache peut être atteint : forte chute de production, perte d'un quartier et dans des cas exceptionnels, mort de l'animal.

Les mammites cliniques s'accompagnent parfois d'une très forte réaction inflammatoire et de symptômes graves qui peuvent être spectaculaires (congestion, œdème, sécrétion du lait décomposée ou purulente, abcès, fistule, gangrène...) et parfois sont associées des signes généraux plus moins intenses (hyperthermie, trouble nerveux, amaigrissement...)

Ces mammites entraînent toujours d'importantes chutes de production. Quelquefois, la perte d'un quartier ou plusieurs quartiers qui conduisent à la réforme et exceptionnellement à la mort de l'animal. La sévérité et l'évolution de l'infection dépendent à la fois du pouvoir pathogène du microorganisme en cause et de l'efficacité des défenses immunitaires de l'hôte

On distingue quatre types de mammites cliniques :

2.1.1 La mammite *gangreneuse*

C'est une infection mammaire due le plus souvent à des souches de *Staphylococcus aureus* productrices de l'hémolysine α . Cette toxine provoque de la vasoconstriction locale prolongée qui empêche l'irrigation sanguine de la partie distale du quartier infecté, entraînant la nécrose des

tissus. Cette forme de mammite est plus fréquente chez les jeunes vaches que chez les vaches âgées qui disposent plus souvent d'anticorps contre l'hémolysine. Des signes de gangrène ont également été observés dans le cas de mammites à colibacillaire (**Plommet et al., 1968**).

2.1.2 La mammite *d'été*

Elle est causée par *Arcanobactérium pyogènes*. Cette forme de mammite est particulièrement fréquente entre juin et septembre. Elle atteint plus particulièrement les génisses et les vaches laitières tarées. Elle se traduit par la formation d'abcès dans le quartier, qui devient enflé douloureux, et par la production abondante d'un pus nauséabond (**Dahou, et al., 1991**).

2.1.3 La mammite à *nocardia astéroïdes*

Elle atteint généralement les vaches en troisième et quatrième lactation dans le mois qui suit le vêlage. Elle se manifeste par des quartiers enflés et très durs avec des abcès. La sécrétion est souvent dénaturée, formant un dépôt jaunâtre et un surnageant incolore. La vache présente une température élevée et persistante, elle ne s'alimente plus et maigrit rapidement. Il peut s'établir une fistule permettant l'écoulement d'un pus abondant, hors du quartier (**Plommet et al., 1968**).

2.1.4 La mammite *colibacillaire*

Elle évolue sous forme subaiguë. Elle dépend principalement de l'efficacité de la réaction immunitaire : précoce, intensité, efficacité bactéricide. Si cette réaction est trop tardive ou insuffisante, les colibacilles se multiplient activement dans le lait et leurs endotoxines provoquent chez l'animal un état de choc. La vache en position couchée

est prostrée, présence de la diarrhée, déshydratation et 'hyperthermie. La sécrétion des quartiers atteints est souvent réduite et le lait prend un aspect aqueux et jaunâtre (**Plommet et al., 1968**).

2.2 Les mammites subcliniques

Les mammites subcliniques sont caractérisées par une absence de signes cliniques. L'inflammation due à l'infection s'accompagne essentiellement d'un afflux de cellules somatiques dans le lait du quartier infecté, particulièrement les polynucléaires neutrophiles, et par une modification de la composition chimique du lait (baisse des taux de caséine et de lactose, augmentation des taux d'électrolytes). Le diagnostic des mammites subcliniques repose sur la numération des cellules somatiques du lait, la mise en évidence des modifications chimiques et la recherche de la bactérie en cause. L'augmentation des cellules somatiques peut être révélée par des méthodes de comptage, comme le California Mastitis Test (CMT), le Fossomatic, le Coulter Conter, la conductivité électrique. Lors de mammite subclinique, les bactéries peuvent persister dans le pis et l'infection devenir chronique suite à l'expression de certaines propriétés. Par exemple, la formation d'un biofilm, la survie à l'intérieur des cellules épithéliales mammaires et/ou l'absence de synthèse d'une capsule sont considérées comme trois propriétés impliquées dans la chronicité d'une infection à *S. aureus* (**Bardiau et al., 2014**).

L'inflammation est modérée sans signe visible au niveau de la vache, de la mamelle ou du lait. Elle s'accompagne d'un afflux de globules blancs aussi appelés cellules. Le diagnostic de ces mammites se fait par :

- des analyses directes de la concentration cellulaire du lait effectuées en routine dans le cadre du Contrôle laitier ;

- des tests indirects comme le CMT (**Abdelkrim, 2009**).

Il n'y a pas d'inflammation macroscopique évidente, mais l'examen du lait révèle l'existence d'une infection, une augmentation du comptage cellulaire et également une altération des propriétés chimiques du lait (**Poutrel ., 1985**).

3) Origine des mammites

Les mammites sont presque exclusivement d'origine infectieuse .exceptionnellement, elles peuvent être dues a des champignons ou a des parasites.

Les mammites d'origine chimique ou traumatique sont rares et se compliquent le plus souvent d'une infection mammaire, la dernière cause des mammites est le traumatisme : un choc violent peut entraîner un hématome intra-mammaire mais, le plus souvent, ce sont des traumatismes ou des agressions de la peau du quartier ou du trayon qui sont à l' origine des mammites (**Dominique, 2010**).

3.1. Le modèle hexagonal

On définit le modèle hexagonal des acteurs de la maladie : micro-bisme, éleveur, conduit d'élevage, bâtiment, aliment, animal

Animal : la sensibilité de la maladie est variable selon les individus et le niveau de production, plus il est élevé, plus, l'animal est sensible. La structure d'une population est également importante , les animaux les plus âgés étant porteurs de plus de germes que les jeunes .il

faut donc éviter de loger les veaux a proximité immédiate des stabulations des vaches laitières (Cauty et Perreau, 2009).

- **La propreté du pis (arrière et côtés)**

Est un indicateur de l'hygiène des logettes et de la litière.

- **La propreté des pattes arrière**

Est un indicateur de l'hygiène des couloirs.

- **La propreté des flancs et des cuisses**

Est un indicateur de l'hygiène des logettes et de la litière.



Figure 3 : Evaluation de la propreté des vaches
(Etat1 propre ,2 relativement propre ; 3 souillé; 4 très souillé)

Les Micobismes : Les germes bactéries et virus et les parasites font partie de l'environnement. Chaque élevage possède sa propre flore, constituée de germes pathogènes ou non .il existe un équilibre entre la flore et les animaux présents. Les effectifs importants et les densités élevées en bâtiment tendent à concentrer le microbe

L'alimentation : des matières premières de mauvaise qualité peuvent contenir des substances toxiques.

Une ration déséquilibrée peut provoquera, au mieux un état général insatisfaisant

(Animal trop gras trop maigre, fatigué de l'organisme lié à un excès d'azote et ou pire maladies métaboliques et des effets de carence)

Logement : le milieu ambiant conditionne le confort des animaux. L'inconfort et la malpropreté sont susceptibles de compromettre leur bon état de santé.

Eleveur et conduit d'élevage : les compétences de l'éleveur et le sérieux de sa conduite technique jouent un rôle prépondérant dans le maintien d'un bon niveau sanitaire (**Levesque, 2004**).

La contamination du lait se fait au cour de la traite, par les manchons trayeurs, et les lavettes utilisées pour plusieurs vaches (**institut de l'élevage, 2009**).

3.2 Bactéries impliquées dans les mammites

Les bactéries responsables de mammites sont toutes capables de se multiplier dans le lait qui est un milieu nutritif suffisamment riche pour assurer leur développement

Il est courant de distinguer deux types d'agents pathogènes pour la mamelle de la vache

3.2.1 Agents pathogènes majeurs

Ils sont responsables aussi bien des mammites subcliniques que des mammites cliniques plus moins graves. Par la fréquence, la persistance ou la sévérité des infections qu'ils provoquent, trois espèces bactériennes ont une importance capitale : *Staphylococcus aureus*, des espèces de *Streptococcus* (*agalactiae*, *dysgalactiae*, *uberis*) et des entérobactéries notamment *E. coli*, *Klebsiella sp.* On leur adjoint parfois des agents plus rares comme Actinomyces pyogènes, Bacillus cereus, Mycoplasma bovis, Nocardia asteroides (**Badinand , 1994**).

3.2.2 Agents pathogènes mineurs

Ils entraînent le plus souvent une réaction modérée de la mamelle, se comportant à la limite entre les agents saprophytes et les agents pathogènes. Cependant ,ils peuvent être parfois à l'origine de mammites cliniques aiguës; il s'agit, en particulier, parmi les plus fréquents, des staphylocoques à coagulase négative, *Micrococcus varians*, Actinomyces pyogènes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella hemolytica*, *Corynébactérium bovis*, divers Bacillus, *Cryptococcus neoformans* et des levures (**Bouchot et al .,1985**).

Tableau 04: Les espèces bactériennes responsables de 90% des mammites en élevage laitier (Cauty et Perreau, 2009).

Bactéries	Réservoir	Contamination	Remarques
<i>Staphylocoques dorés</i> <i>Streptocoque s.agalactiae</i> <i>streptocoque s.dysgalactiae</i>	Mamelles (lait infecté). Grumeaux, Crevasses sur les trayons	Lors de la traite manchons, trayeurs lavettes, mains souillées éclaboussures de lait contaminé	Responsable de la majorité des mammites subcliniques La persistance des infections est importante
<i>Streptococcus. uberis</i> <i>Escherichia.coli</i>	Laitières en bâtiments, mais aussi prairies : Bouses, lisiers trop fraîchement épandu	Par contact du trayon blessé ou non , avec l'environnement des mouches peuvent être indirectement responsables de la contamination , en poussant la vache à se gratter avec ses sabots	Infection courte mais sévère

3.3 Les Staphylocoques

Par sa richesse, le lait constitue un milieu favorable au développement des staphylocoques, particulièrement les staphylocoques aureus qui peut produire une entérotoxine en un temps court à température ambiante d'où l'intérêt de sa recherche (Joffin, 1999).

Baird Parker à divisé le genre *Staphylococcus* en trois espèces *S.aureu*, *S.épidermidis* et *S.saprophyticus* étant caractérisé par la possession d'un enzyme, la coagulasse, qui transforme la fibrinogène du plasma en fibrine, seule cette espèce était présumée développer un pouvoir pathogène. En fait et cela est précisé plus loin seul *S.aureus* intéresse bactériologiste alimentaire, car ce sont les souches de *S.aureus* qui paraissent susceptibles de sécréter des enterotoxines.

Staphylococcus aureus appartient à la famille des *micrococcaceae* ; sont gram positif et possèdent une catalase, sont aéro-anaérobies facultatifs et thermosensibles (Tué vers 60°).

S.aureus est ubiquitaire, il peut être retrouvé notamment chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales ; les bovins, les porcs, les moutons, les volailles, sur la peau ou encore sur la muqueuse (Bourgeois et al., 1980).

3.4 Les Streptocoques

S. agalactiae est un cocci à Gram positif, β hémolytique, appartenant au groupe B de la classification de Lancefield. C'est une bactérie hautement contagieuse, parasite obligatoire de la glande mammaire, car elle ne survit que très peu de temps en milieu extérieur. La bactérie est généralement responsable de cas de mammites

subcliniques avec, souvent aussi des cas cliniques (**George *et al.*, 2008**). Le lait de la mamelle infectée constitue la principale source de contamination dans les élevages laitiers. La contamination intervient à l'occasion de la traite (**Abdelkrim, 2009**).

3.5 Les autres bactéries pathogènes

Il existe d'autres bactéries pathogènes telles *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, et certaines souches d'*Escherichia coli* que l'on peut rencontrer de manière accidentelle dans le lait. Ces deux dernières provoquent les mêmes symptômes que *Staphylococcus aureus*, alors que la première peut provoquer la listériose, à l'origine d'avortements et de troubles nerveux. Cette maladie touche également les nouveau-nés ainsi que les adultes immunodéprimés chez qui elle peut se manifester, à l'extrême, par des septicémies ou des méningites. Cependant, en production fermière de caillés lactiques, le risque de développement de *Listeria* et *Salmonella* est très faible dès lors que le pH du caillé est inférieur à 4,5 (**Hélène, 2010**).

3.6 Les autres agents pathogènes

D'autres agents étiologiques comme les levures et les algues sont également responsables des mammites. Les levures sont retrouvées dans des endroits humides, riches en matière organique, et sont isolées à partir des trayons mais aussi du matériel de traite (**Keller *et al.*, 2000**).

Bien que la fréquence des mammites à levure soit faible, occasionnellement des cas d'épidémie peuvent être observés, notamment dans les élevages avec des mesures d'hygiène défailante et ou associés à des traitements intra-mammaires répétitifs (**Farnsworth et Sorensen,**

1972). Plusieurs espèces de levures du genre *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Trichosporum* ont été associées aux mammites bovines, mais *Candida spp* est le genre le plus fréquemment isolé à partir de cas de mammite mycosique chez les bovins (Aalbaek *et al.*, 1994).

L'infection peut se faire lors des injections des infusions intra-mammaires contaminées ou par le manchon du trayeur (Radostitis *et al.*, 2007).

Parmi les algues connues qui provoquent des maladies chez les humains et les animaux, on peut citer le genre *Prototheca* (*P*), notamment *P. zopfii* et *P. wickerhamii*, *P. zopfii*, a été identifié comme un agent pathogène responsable de mammites bovines en 1952 (Moller *et al.*, 2007).

Dans le passé, cette algue entraînait des mammites sporadiques, et de nos jours, ces mammites sont devenues endémiques (Costa *et al.*, 1996). Tout comme *Candida spp*, les infections dues à *Prototheca spp* se font via les injections intra-mammaires (Taniyama *et al.*, 1994).

4) Les mécanismes de défense de la mamelle

4.1. Au niveau de la glande mammaire

Les mécanismes de défense cellulaire de la glande mammaire sont composés des polynucléaires neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes. Les polynucléaires neutrophiles (PMN) de la glande mammaire constituent la première ligne de défense cellulaire contre les bactéries mammopathogènes et représentent 90% des cellules dans la sécrétion lactée lors de mammites (Rainard, 1985).

Les étapes conduisant à la destruction des bactéries par les PMN passent par leur recrutement à la faveur de la libération des cytokines comme le facteur α de nécrose des tumeurs (TNF- α), des interleukines

(IL-8, IL-1) et de la prostaglandine ($F2\alpha$). Ces cytokines favorisent l'afflux massif des PMN au niveau du site de l'infection. Les bactéries phagocytées sont tuées par l'action des ions superoxydes (O_2°) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Paape *et al.*, 1991**). Les macrophages représentent, eux, le type cellulaire dominant du lait provenant d'une mamelle saine (**Lee *et al.*, 1980 ; Paape *et al.*, 1991**). Ces cellules interviennent aussi dans la phagocytose et participent à la réponse immunitaire spécifique en jouant un rôle dans le déclenchement et l'expression des réponses immunitaires, après digestion et présentation des antigènes, via l'activation des lymphocytes. Quant aux lymphocytes, une fois activés, ils produisent les anticorps.

Les mécanismes de défense moléculaire de la glande mammaire sont divisés en innés et acquis. Les mécanismes innés sont représentés par des molécules à activité antimicrobienne et par le complément. Parmi les molécules à activité microbienne, les plus importantes sont la lactoferrine et le système lactoperoxydase (LPS). La lactoferrine est capable de séquestrer le fer et le rendre indisponible aux bactéries qui en ont besoin pour leur croissance comme cofacteur enzymatique. Le système lactoperoxydase (LPS) rencontré dans le lait est composé de trois éléments, la lactoperoxydase, l'ion thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène. C'est la réaction entre le thiocyanate et le peroxyde d'hydrogène, catalysée par la lactoperoxydase qui donne le principe actif antimicrobien de ce système (**Jacob *et al.*, 2000**).

Le LPS est actif contre les bactéries telles que les streptocoques, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (**Outteridge *et al.*, 1988**).

La mamelle bénéficie également des mécanismes acquis de défense moléculaire, à savoir les immunoglobulines qui interviennent à

différents stades de l'infection après activation de la réponse immune et sécrétion par les lymphocytes (**Poutrel, 1988**).

Ainsi, les immunoglobulines peuvent :

- empêcher l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales mammaires, ce qui facilite l'excrétion de ces bactéries lors du processus de la traite ;
- rendre plus efficace la phagocytose par les PMN (opsonisation) ;
- neutraliser les toxines bactériennes.

4.2. Au niveau du trayon

Le canal du trayon est la principale voie d'entrée des bactéries lors des mammites ainsi que la première ligne de défense de la glande mammaire. L'extrémité distale du canal du trayon est normalement hermétiquement fermée par les muscles du sphincter, empêchant ainsi l'entrée des germes pathogènes. La paroi interne de ce canal du trayon est tapissée par de la kératine qui empêche la migration des bactéries et qui contient des acides gras à longues chaînes qui aident dans la lutte contre l'infection. Toutefois, l'efficacité de ces défenses est limitée à l'approche de la parturition, car il résulte une pression intra-mammaire accrue qui entraîne la dilatation du canal et des fuites de sécrétions mammaires (**Capuco et al., 1992**). et, lors de la traite, le canal du trayon est également distendu (**Rainard et al., 2006**). En outre, les muscles du sphincter exigent 2 heures de temps pour revenir à leur position de contraction. Une fois que les bactéries ont dépassé ces barrières anatomiques au niveau du trayon, elles doivent ensuite échapper aux composants cellulaires des mécanismes de défense de la glande mammaire (**Capuco et al., 1992**).

En fin de la traite, le sphincter reste ouvert quelques minutes et peut être une voie d'entrée des germes photogènes vers la mamelle, pour diminuer ce risque (**Michel, 2011**), les producteurs réalisent très souvent au moment de la dépose des faisceaux trayeurs une désinfection post-traite par trempage de l'extrémité des trayons dans une solution désinfectante. A noter que ces résultats ont été observés avec des produits iodés gras. Cette pratique ne serait donc pas une pratique limitant pour le maintien de la charge microbienne des trayons. Par leur pouvoir graissant, certaines spécialités contribueraient à un bon type staphylocoque à coagulase positive (**Michel, 2011**).

5) Importance des mammites (Véra Gedilaghine, 2005)

5.1 Importance médicale des mammites

Toute mammite porte préjudice au bien être de l'animal. De plus, certaines mammites sont mortelles, c'est le cas des mammites gangréneuses, à *Nocardia*, ou les mammites colibacillaires.

5.2 Importance sanitaire des mammites

Les mammites portent atteinte à l'hygiène animale et potentiellement à la santé publique. Le risque zoonotique lié à la contamination du lait par certains germes fait l'objet de préoccupations de santé publique.

En effet, le lait « mammiteux » peut être vecteur d'agents responsables de toxi-infections alimentaires (salmonellose, listériose, etc.).

De fait, en l'absence de pasteurisation, des germes pathogènes pour l'Homme provenant de quartiers infectés peuvent contaminer les produits laitiers

Certains sont très étudiés : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, ou *Salmonella*. D'autres le sont moins comme *Escherichia coli*.

5.3 Importance économique des mammites

Les mammites constituent le trouble sanitaire le plus fréquent et aux plus fortes répercussions économiques au sein de l'élevage de bovins laitiers, Ceci tient principalement du fait de leur fréquence, des frais vétérinaires qu'elles entraînent (honoraires, coût de traitements) et de leurs répercussions néfastes tant qualitatives que quantitatives sur la production laitière.

En effet, celle-ci s'en trouve réduite tandis que l'altération de la composition du lait qui en résulte (baisse du lactose, des caséines, de certains minéraux tels que le calcium et le phosphore, augmentation des protéines solubles inutilisables pour la fabrication de fromages) se répercute sur les aptitudes technologiques du lait (baisse des rendements fromagers, etc.).

Ceci entraîne donc des pénalités de paiement du lait et une moindre rémunération de l'éleveur.

L'impact économique est ainsi formé par la somme des coûts des actions de maîtrise (traitements et préventions) et des pertes (réductions de production, lait non commercialisé, pénalités sur le prix de vente, mortalités et réformes anticipées) rapporte les résultats d'une estimation du coût des mammites cliniques réalisée au Royaume-Uni ; celui-ci s'élèverait en moyenne à 175£ par cas clinique, soit un coût de 168

millions d' £ par an pour l'ensemble des mammites cliniques du cheptel laitier du Royaume-Uni. L'impact économique en France est peu connu et ne peut pas être déduit d'études étrangères à cause de différences dans les méthodes et les paramètres économiques.

Cependant, BEAUDEAU et *al* (1997) ont pu le situer, suite à une étude menée dans les pays de la Loire, en moyenne à 1,14 centimes d'euros par kg de lait. Les coûts de maîtrise représentaient 36% de l'impact économique (24% pour les traitements et préventions médicales et 12% pour les produits d'hygiène de traite et de lavettes) tandis que les pertes représentaient 64%.

Chapitre III : Diagnostic de mammite**1) Prophylaxie sanitaire****1.1 Dépistage des mammites**

Les numérations cellulaires sur le lait permettent d'identifier précisément les vaches du troupeau atteintes d'infections mammaires en vue notamment de limiter la contagion aux autres vaches et d'établir certaines priorités dans les mesures de lutte à appliquer (**Serieys, 1985**).

1.1.1 Numération des cellules somatiques

Comme tout liquide biologique, le lait, même normal, contient des cellules somatiques hétérogènes. Elles sont, en effet, essentiellement constituées de globules blancs (macrophages, polynucléaires neutrophyles et lymphocytes) de la circulation sanguine et de cellules épithéliales provenant de la desquamation des épithéliums des canaux galactophores, des acini et lors de l'érosion du tissu glandulaire (**Barkema et al., 1997**).

Les différentes cellules retrouvées dans le lait évoluent en nombre et en proportion suivent le stade physiologique de l'animal. En l'absence d'infection, les macrophages constituent le type cellulaire dominant et ce n'est qu'en cas d'infection du quartier que les polynucléaires neutrophiles affluent dans le lait où ils deviennent les plus nombreux. Quant aux autres types cellulaires, ils sont peu représentés, notamment les lymphocytes et les cellules épithéliales qui sont très peu nombreuses dans le lait des quartiers non infectés (**Riollet et al., 1999**).

Tableau 05: Répartition (en%) des différents types cellulaires dans le lait de vache en l'absence et en présence d'infection mammaire (Gabli, 2005).

Type cellulaire	Mamelle saine	Mamelle infectée
Polynucléaires neutrophiles	0 – 11	50 – 90
macrophages	66 - 88	0,2 - 2
lymphocytes	10 - 27	2,8 - 5,1

Durant la lactation, le comptage cellulaire d'un lait normal, issu des quartiers exempts d'infection est lié à la production de l'animal par un phénomène de dilution. Il est élevé au début de lactation (pendant le premier mois) et lors des phases qui précèdent le tarissement il est minimal durant la période allant du deuxième au septième mois

En dehors de l'état sanitaire de la mamelle, des facteurs physiologiques peuvent avoir un effet sensible non négligeable sur la concentration cellulaire du lait. En particulier l'effet d'un stress, augmentation de la température, traite traumatisante, des carences minérales ou vitaminiques, un effort physique important et l'âge peuvent entraîner des variations sensibles mais de courte durée de la concentration cellulaire (Fabre *et al.*, 1997).

Lors d'infection, il y a un appel leucocytaire important qui se caractérise par une augmentation de comptage cellulaire et des modifications considérables dans la répartition des populations dans le

lait. Si bien que les Polynucléaires neutrophiles deviennent très nombreux et majoritaires (**Barkema et al., 1997**).

1.1.2 Test de CMT (Californian Mastitis Test)

Si les méthodes de mesure directe permettent d'avoir des résultats précis, par contre, elles demandent l'aide d'un laboratoire. A l'inverse, le CMT est très approximatif mais il peut être mis en œuvre à l'étable, au cours de la traite. Ses résultats sont obtenus immédiatement et concernent la production de chaque quartier alors que les mesures directes sont réalisées sur des mélanges de lait des quartiers ou sur le lait de tank (**Barkema et al., 1997**).

1.1.2.1 Principe du test

Un réactif tensioactif mélangé à un échantillon de lait réagit avec l'ADN contenu notamment dans le noyau des cellules somatiques. Il se forme un précipité dont l'importance et la consistance sont fonction de la teneur en cellules de l'échantillon (**Barkema et al., 1997**).

1.1.2.2 Réalisation du test

Le test est réalisable à l'étable notamment sur le lait des quartiers juste avant la traite.

Après élimination des premiers jets, un peu de lait (2ml environ) est recueilli dans une coupelle transparente (chaque coupelle correspond à un quartier) et additionné d'une quantité à peu près égale de réactif. Après agitation de quelques secondes du plateau pour bien mélanger réactif et lait, la lecture est effectuée en observant par transparence L'aspect du précipité (**Barkema et al., 1997**).

1.1.3 Papier indicateur de mammites

Testeur de dépistage de mammite, un jet de lait sur la zone témoin donne une réaction de couleur : vert foncé ou bleu vert pour les mamelles infectées, vert ou jaune pour les mamelles saines (<http://www.mon-ami-baptiste.com/boutique/test-du-lait-1403/papier-test-mammite--10518.html>), consulté le 20/04/2016.

2) Prophylaxie médicale

Le traitement de mammites est essentiellement réalisé par injection intra mammaire d'antibiotiques.

En lactation, il faut vidanger complètement la mamelle avant de traiter.

Les chances de guérison complète sont faibles pendant cette période.

Le lait doit être écarté de la consommation humaine.

Au tarissement, il faut profiter de cette période de repos relatif et réaliser une injection d'antibiotiques juste après la dernière traite. L'efficacité du traitement des mammites subcliniques est alors proche de 90% (Cauty et Perreau, 2009).

Chapitre IV: Matériel et méthodes**1) Objectifs**

L'objectif de cette étude est de réaliser d'une part, un isolement des bactéries du lait cru des bovins laitiers de la ferme, et d'autre part, la caractérisation de sa flore pathogène dans le but de découvrir la présence d'une mammites subclinique ou chronique, et de choisir les antibiotiques adéquats à leur traitement, et de prendre tous les dispositifs afin d'y remédier.

2) Présentation de la zone d'étude

Le prélèvement a été effectué à la ferme expérimentale de l'université Abdelhamid Ben Badis, à Hassi Mameche (Wilaya De Mostaganem). La surface de la ferme est de 65 hectares (tableau 06). L'élevage est constitué du certain nombre de bovins, dont 02 vaches. L'entretien est réalisé par 03 travailleurs qui s'occupent de la traite biquotidienne à temps partiel de l'alimentation et l'abreuvement des animaux, et leur entretient.

Les vaches sont identifiées, pour leur identification (pie rouge N°26 et pie noire N°27).

Concernant l'écosystème, il est composé d'un matériel végétal et animal constitué de palmiers, muriers et d'eucalyptus, d'ovins, de chiens, de volailles et de rongeurs, au moyen de boucles d'oreilles qui portent un numéro propre à chaque animal.

Tableau06 : Information géographiques concernant la ville de Hassi Mameche (Source : [http://fr.wikipedia.org/wiki/Hassi Mamech](http://fr.wikipedia.org/wiki/Hassi_Mamech)) consulté le 29/05/2016.

Coordonnées géographiques	Latitude : 35.8602, Longitude : 0.0731707 35°51' 37'' Nord, 0°4'23'' EST
Superficie	6300hectares 63.00 Km ² (24,32 sq mi)
Altitude	133m
Climat	Climat semi-aride, sec et chaud

2.1 Situation sanitaire des vaches

Au moment où nous avons réalisé les prélèvements de lait, les deux vaches pie rouge et pie noire se trouvaient en cycle de lactation, nous avons de plus les travailleurs nous ont appris que parfois les vaches ont des mammites soignées au moyen d'antibiotique, (Multiject IMM 5g), ce médicament est injecté dans le pis.

Pour éviter les maladies dues aux tiques (insectes parasites de la peau), les animaux sont soignés au moyen d'un antiparasitaire externe, le sebacil.

Pour essayer de connaître l'origine des mammites, nous avons évalué de l'état de propreté des vaches selon la méthode prônée par Cauty Et Perreau (2009).

2. 2 Alimentation des vaches

Le matin avant la traite, environ 3 kg de concentré, V.L.B17 (aliment complet supplémentaire vitaminisé), sont distribués, ils sont composés de céréales, tourteaux de soja, issues de meunerie, calcaire, phosphate, sel, oligo-aliments, vitamines (A, E, D3). Le soir, on distribue seulement 2 kg.

Après la traite, les vaches seront sur le terrain, elles ingèrent le sorgho, la luzerne, l'herbe, les feuilles de murier...etc. Dès leur entrée du pâturage, elles s'abreuvent, ensuite, il est mis à leur disposition environ, 10 kg de fourrage et 15 kg pour la nuit.

2. 3 Hygiène de la traite

La traite se fait le matin à 8h30, et le soir à 15h30. Selon nos constatations, l'hygiène totale de la vache n'est pas réalisée, pour la traite, les travailleurs ne mettent pas de gants pour l'hygiène de la mamelle, ils utilisent de l'eau pré-chaude, additionnée d'eau de javel, les premiers jets sont jetés sur le sol. Chaque jour, la machine à traire est rincée à l'eau après la traite, le récipient de cette machine est d'une capacité de 30 litres. La salle de traite est nettoyée après la traite. Le lait est conservé dans un tank réfrigéré à 4°C, mis dans une salle spéciale.

2 .4 Production laitière par jour

La production le matin : pie rouge 4litres ; pie noire 9 litres ;

La production le soir : pie rouge 2 litres ; pie noire 4 litres.

2 .5 Période de prélèvement

Le prélèvement du lait cru pour nos expérimentations à eu lieu à 8h du matin durant la période du 03 avril au 12 avril 2016.

2. 6 Laboratoire vétérinaire régional de Mostaganem

Il constitue la pierre angulaire de l'ensemble des moyens logistiques d'appui aux programmes de lutte contre les maladies et assurent la prise en charge des contrôles des produits animaux et d'origine animale à l'importation et à l'exportation.

L'ensemble des activités des Laboratoires Vétérinaires sont prises en charge sur le budget de l'Etat (<http://lvrlag.unblog.fr/author/lvrlag>) consulté le 02/05/2016.

3) Détection des mammites

Matériel

Test papier indicateur mammites

Méthode

Ce test est réalisé à l'étable, notamment sur le pis, juste avant la traite et après élimination des premiers jets. Un peu de lait environ 2ml est recueilli sur le papier, dans la zone témoin spéciale à chaque pis.



Figures 04 : test papier indicateur des mammites

04) Prélèvements

4.1. 1^{er} prélèvement de la vache pie rouge:

Nous avons réalisé le 1^{er} prélèvement le 04/04/2016, de pis postérieur gauche de la vache pie rouge, en appliquant certaines conditions d'hygiène de prélèvement, dont le nettoyage des mains avec un savon et le port de gants. Les mamelles uniquement sont nettoyées avec l'eau pré-chaude javellisée, séchées avec une serviette stérilisée. On désinfecte la surface du pis, les premiers jets sont prélevés dans un bol, le prélèvement du lait de la vache pie rouge est réalisé manuellement, directement dans des flacons stérilisés et acheminés par nos soins rapidement dans une glacière à 4° C au laboratoire.

4.2. 2^{ème} prélèvement de la vache pie noire

Réalisé le 11/04/2016 sur le pis droit de la vache pie noire, et se déroule dans les mêmes conditions que celles du prélèvement précédent.

05) Analyse microbiologique

Matériels



Figure05 : étuve



Figure06: Compteur de colonies



Figure07: vortex



Figure08: Distributeur des antibiotiques

Méthodes

5.1 Préparation des dilutions décimales

Principe

Nous avons préparé des dilutions décimales pour faciliter l'examen microbiologique (**JORA N°70, Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004**).

Préparation

Après sa collecte, le lait cru, considéré comme suspension mère est homogénéisé avant son utilisation pour éviter l'émulsion obtenue. Des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-6} sont effectués est à partir de la solution mère : à l'aide d'une pipette pasteur stérile, 1 ml de la solution mère de lait est introduite dans un tube contenant 9 ml d'eau peptonée, la solution est homogénéisée à l'aide d'un vortex pendant 5 à 10 secondes, nous avons utilisé une nouvelle pipette pour chaque diluant, et agité la suspension avant les ensemencements.

5.2 Etude de des germes pathogènes

Tableau07 : les germes pathogènes étudiés et leurs milieux sélectifs

(GUIRAUD J.P., 2003)

Les germes concernés	Milieu sélectif
Coliforme fécaux <i>E. coli</i>	Désoxycholate
<i>Staphylocoques dorés</i>	Slanetz
<i>Streptocoque a galaxie</i>	Chapman

5.2.1 Calcul et dénombrement bactérien

Méthodes directes

Le comptage direct des colonies se fait au compteur électronique des colonies isolées à partir des milieux géloses, L'unité UFC (**Figure04**).

$$N \text{ (UFC)} = x \cdot L' \text{inverse } 10^{-n}$$

N : somme totale des colonies comptées.

n : nombre de dilution

x : nombre des colonies comptées.

5.2.1.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux

La présence d'*Escherichia coli* dans l'environnement signe toujours une contamination fécale.

A partir des dilutions (10^{-1} , 10^{-4}), nous avons porté aseptiquement 1 ml de chaque dilution de lait dans une boîte de pétri vide pour un ensemencement en profondeur, ensuite, nous avons versé la gélose, environ 16 ml (désoxycholate fondue et refroidie), puis nous avons homogénéisé les boîtes par des mouvements circulaire, sous forme de

huit, après solidification, les boites sont retournées, puis incubées pendant 24 heures à 44°C

Interprétation des résultats

Après 24h d'incubation, dans le cas où il n'est pas observé de colonie, donc absence des coliformes.

5.2.1.2. Recherche et dénombrement des Staphylocoques aureus

Les Staphylocoques sont des bactéries commensales de l'homme et l'animal. La présence de leurs toxines sont responsables d'intoxications alimentaires (Cauty Et Perreau, 2009).

5.2.1.2.1 Ensemencement dans un milieu Chapman

A partir de dilutions (10^{-1} à 10^{-6}), nous avons versé aseptiquement 1 ml de dilution lait dans une boîte de Pétri, ensuite nous avons rajouté 15 ml de gélose Chapman, fondue et refroidie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$, après homogénéisation de l'inoculum à la gélose par des mouvements circulaires et de va-et-vient, les boîtes pétri sont retournées après solidification de la gélose et incubées à 37°C pendant 48h.

Un résultat est considéré comme positif, lorsqu'il y a présence de colonies jaunes et dorés, de taille différentes.

5.2.1.2.2 Ensemencement dans un milieu Baird Parker

Nous avons versé environ 18ml de gélose Baird Parker fondue et refroidie dans chaque boîte Pétrie, après la solidification de la gélose, les boîtes sont retournées, puis séchées dans une étuve à 55°C .

A partir des dilutions (10^{-1}), nous avons versé aseptiquement, 1ml de chaque dilution de lait dans une boîte de pétri, puis nous avons étalé

l'inoculum sur toute la surface de la boîte à l'aide d'un étaloir, incubation à 37°C, pendant 24 heures à 48 heures.

Interprétation des résultats

Un résultat est considéré comme positif, lorsque les boîtes contiennent des colonies caractéristiques, à savoir des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide.

5.2.1.2.3 Test de BHIB

Dans une zone stérile, nous avons pris une colonie de *staphylococcus* avec une anse de platine, et nous l'avons introduite dans un tube de BHIB, nous avons agité le tube dans un vortex, puis nous l'avons incubé pendant 18 h à 37°C.

Interprétation des résultats

La présence d'un trouble dans les tubes de BHIB, indique la multiplication des *Staphylococcus aureus*.

5.2.1.2.4 Test au plasma de lapin :

A côté d'un bec benzène, et dans un nouveau tube stérile, nous avons mélangé 0.5 ml de notre tube de BHIB avec 0.5 ml de plasma de lapin.

Interprétation des résultats

Une coagulation rapide, indique la présence *Staphylococcus aureus*.

5.2.1.2.5 Test à la catalase

Pendant leurs respirations aérobies, certaines bactéries produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), celui-ci est très toxique, et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce aux enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase, cette enzyme est capable de décomposer l'eau oxygénée selon la réaction :



Dans une zone stérile, et dans une boîte de Pétri, nous avons rajouté une goutte d'eau oxygéné, sur une colonie de *Staphylococcus aureus*

Interprétation des résultats

L'observation d'une effervescence, indique une catalase positive.

5.2.1.2.6 Test d'oxydase

C'est un test discriminant qui permettra de faire des hypothèses sur l'identité de la bactérie étudiée.

Dans les mêmes conditions précédentes, et avec l'anse de platine, nous avons placé une colonie de *staphylococcus* sur un disque d'oxydase.

Interprétation des résultats

L'absence de changement de couleur sur le disque signifie une oxydase négative.

5.2.1.3. Recherche et dénombrement des Streptocoques :

On recherche les Streptocoques dans les denrées alimentaires parce qu'ils sont des indicateurs de contamination fécale, leur présence est un indice de manipulations non-hygiéniques, est la cause d'intoxications alimentaires (Waes, 1973).

5.2.1.3. 1Ensemencement en surface

A partir de dilutions (10^{-1} à 10^{-6}), nous avons prélevé avec une pipette Pasteur 2 ou 3 gouttes (environ 0.1ml) de chaque dilution de lait que nous avons déposé et étalé avec un râteau sur de la gélose Slanetz, solidifiée dans les boites de Pétri. Ces dernières sont retournées après solidification de la gélose puis incubées à 37°C pendant 48h.

Interprétation des résultats

Les colonies présentant une coloration rouge à marron doivent être considérées comme caractéristiques des streptocoques.

5.2.1.3. 2Test de présomption

Le bouillon de Rothe est utilisé pour effectuer le test présomptif de recherche et de dénombrement des entérocoques dans les eaux d'alimentation, les produits surgelés et les autres produits alimentaires par la méthode du nombre le plus probable. Cette recherche se pratique en deux étapes :

Test présomptif sur bouillon de Rothe,

Test confirmatif sur bouillon de Litsky.

(<http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf>)

consulté le 02/06/2016.

A partir des dilutions (10^{-1} à 10^{-3}), nous avons porté aseptiquement 1 ml de chaque dilution et nous l'avons versé dans des tubes contenant 9 ml de milieu de Rothe, et nous avons mélangé l'inoculum dans le milieu, puis nous l'avons incubé se fait à 37°C , pendant 24 à 48heures.

Interprétation des résultats

Les tubes présentant un trouble microbien, sont considérés comme positifs.

5.2.1.3. 3 Test de confirmation

Nous avons fait le repiquage des tubes positifs à l'aide d'une anse de platine bouclée que nous avons introduit dans au test de présomption des tubes contenant un milieu Eva Lytski. Après avoir mélangé l'inoculum dans le milieu, l'incubation se fait à 37°C , pendant 24heures.

Interprétation des résultats

On considère le résultat comme négatif, en l'absence de turbidité dans les tubes.

5.2.1.3. 4 Test à la catalase

Dans une zone stérile, et dans une boîte de Pétri, nous avons rajouté une goutte d'eau oxygénée sur une colonie de streptocoques

Interprétation des résultats

L'absence d'effervescence, indique une catalase négative.

5.2.1.3.5 Test d'oxydase

Dans les mêmes conditions que précédemment, et avec lance de platine, une colonie de Streptocoques est déposée sur un disque d'oxydases.

Interprétation des résultats

L'absence de changement de couleur sur le disque signifie une oxydase négative.

6) Antibiogramme

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de tester la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- À la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne ;
- À l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles (**Collaboration de l'OMC., 2011**). Nous avons ensemencé les streptocoques et les staphylocoques de Chapman et Slanetz (dilution 10^{-1}), dans des boîtes contenant une gélose nutritive et nous les avons incubés à 37°C pendant 24 h.

Le lendemain, nous avons mis stérilement 1 ml de l'eau physiologique dans des tubes, puis nous avons prélevé les colonies des boîtes de gélose nutritive, et nous les avons mis en suspension, puis nous avons réglé la densité des tubes avec vortex, jusqu'à obtenir la même opacité que l'étalon Mac Farland 0.5, ce dernier est préparé par l'ajout acide sulfurique à une solution aqueuse de chlorure de baryum.

le standard Mac Farland est notamment utilisé lors de la préparation des inoculums bactériens standardisés pour les tests de sensibilité aux agents antimicrobiens (**national comite, 2001**).

Pour la réalisation de l'antibiogramme, premièrement, nous avons coulé les boîtes de Pétri de gélose Mueller-Hinton, et nous avons placé les disques sur la gélose grâce à un distributeur des disques d'antibiotique.

La Figure 08 montre le distributeur d'antibiotique, qui permet le dépôt standardisé des disques sur la gélose, nous avons trempé l'écouvillon dans la suspension bactérienne, ensuite nous avons enlevé l'excès de l'inoculum par pression sur les bords du tube, ensuite nous avons écouvillonné régulièrement la gélose en tournant la boîte de 60° jusqu'à ensemencement de la totalité de la surface, nous avons laissé sécher pendant 3 à 5 minutes la gélose, puis nous avons déposé les disques d'antibiotiques, l'incubation est réalisée de 24 h à 37°C.

Interprétation des résultats

Nous avons observé des zones d'inhibition sur les souches microbiennes. Pour chaque souche microbienne, la sensibilité ou la résistance à un antibiotique est différente (annexe 06,07).

Chapitre V : Résultats et discussion

1. Indice de propreté

Les deux vaches de la ferme sont relativement propres

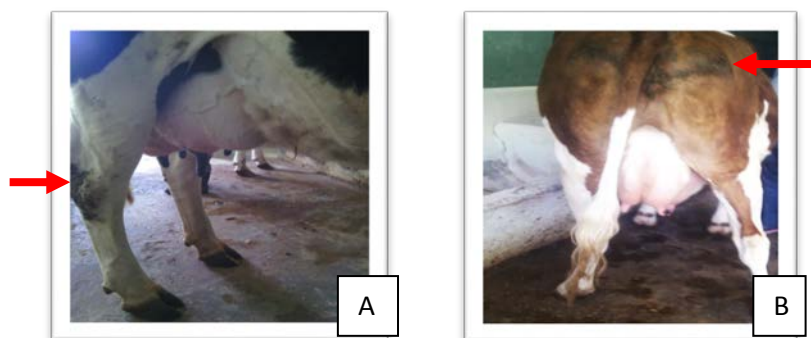


Figure 09 : Indice de propreté des vaches de la ferme,
A : vache pie noire ; B : vache pie rouge.

2. Résultats du test papier indicateur mammites

Test effectué sur la vache pie rouge et la vache pie noire de la ferme.

Selon la figure ci-dessous, nous avons observé un virement de la couleur du papier indicateur, passant du vert, au vert foncé. Ceci est apparu à l'endroit qui indique le pis postérieur droit de la vache pie noire, et à la place du pis postérieur gauche de la vache pie rouge, ce qui indique la présence de mammites (**figures 10**).

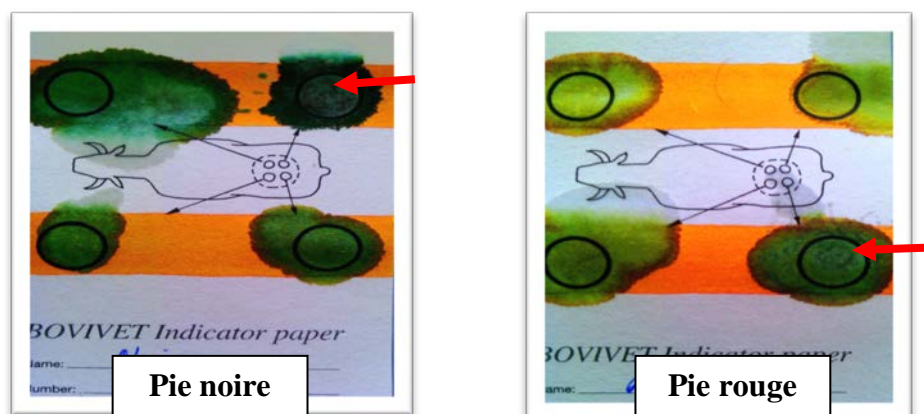


Figure 10 : Résultats du test papier indicateur des mammites,

3. Analyses microbiologiques

3.1 Coliformes fécaux

Après 24 heures d'incubation, aucun germe n'a été obtenu dans les deux échantillons des deux vaches.

L'absence des coliformes prouve qu'ils ne sont pas la cause des mammites chez les deux vaches.

3.2 Staphylocoques

Sur un plan pratique, la prévention contre les staphylocoques passe par une bonne prévention des mammites et une attention toute particulière au trayon (Cuq, 2007).

La contamination de la peau et des muqueuse par les staphylocoques, augmente pendant le cycle de lactation (Jacob et al., 1985), ce qui peut être la cause de d'infection de la mamelle.

3.2.1 Résultat de l'ensemencement dans un milieu Chapman

Dans cette étude, nous avons fait la recherche des *staphylococcus aureus* dans le milieu Chapman. Ce dernier est un milieu sélectif pour l'isolement des staphylocoques, nous avons obtenu des bactéries sous forme des colonies jaune et rouge dans les deux échantillons (figure 11).

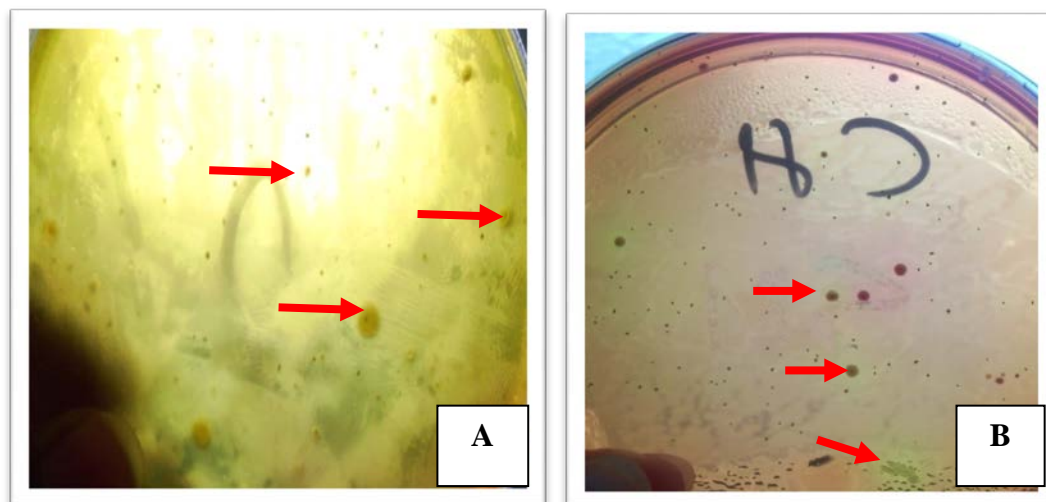


Figure 11: Staphylocoques : A : échantillon 01, dilution 10^{-1} ;
B : échantillon 02, dilution 10^{-1} .

3.2.2. Résultats de l'ensemencement dans un milieu Baird Parker

Nous avons fait la recherche des staphylocoques dans le milieu Baird Parker, ce dernier permet la détection et la numération directe des staphylocoques pathogènes, nous avons obtenu des colonies noires, et des colonies noires entourées par des halos (**figure12**).

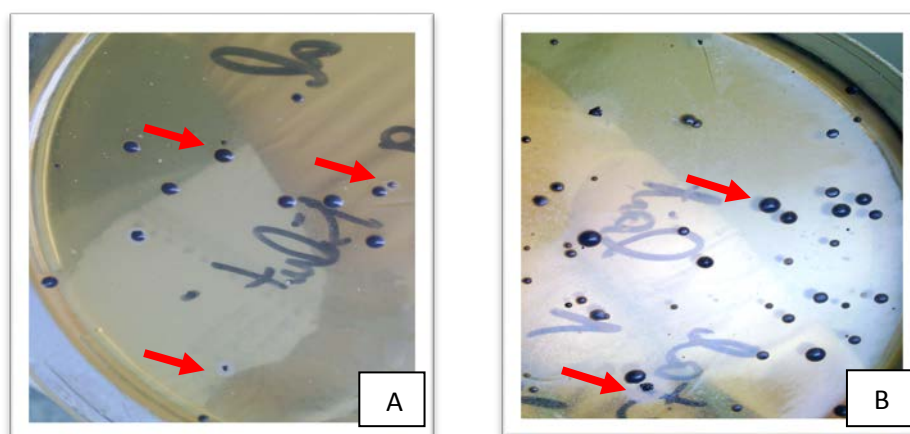


Figure12: Staphylocoques pathogènes : A : échantillon 01, dilution 10^{-1}
B : échantillon 02, dilution 10^{-1}

3.3 Streptocoques

Le taux des streptocoques fécaux varie de 1.10^2 à 20.10^2 ufc/ml. Le milieu Slanetz, est un milieu sélectif pour leur isolement à permis d'observer des colonies rouge à marron (figure13).

Le taux de streptocoques est en rapport avec l'état de santé des vaches, les conditions hygiéniques de la traite, d'une pollution fécale ancienne humaine ou animale (Clausenet et al., 1977). Quant aux streptocoques susceptibles de contaminer le lait, ils sont plutôt typiquement des déjections animales, comme *streptococcus bovis*, *s.equinus*, *s.gallolyticus* et *s.alactolyticus* (Bitton, 1999; Farrow et al., 1984).

3.3.1 Résultats de l'ensemencement dans un milieu Slanetz

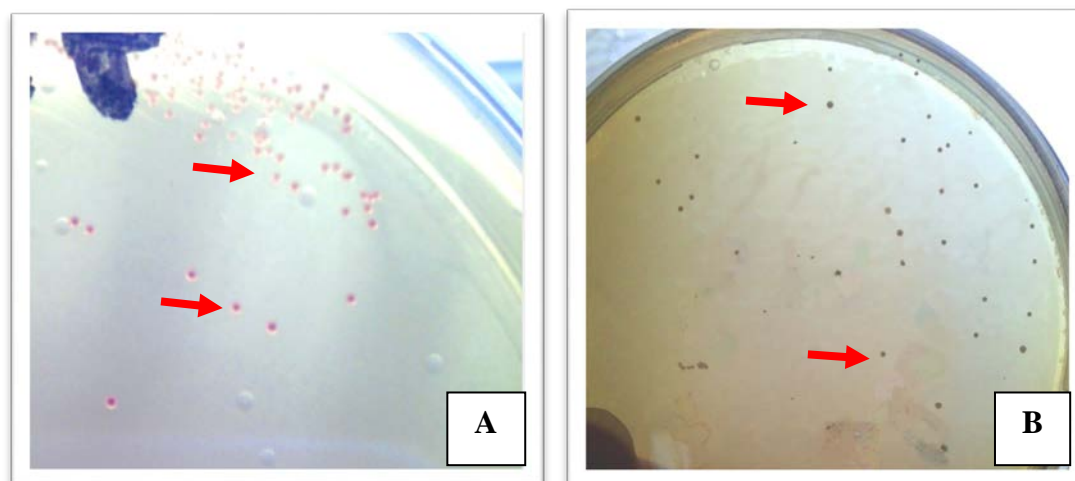


Figure13: Streptocoque : A : échantillon 01, dilution 10^{-1} ;
B : échantillon 02, dilution 10^{-1} .

3.4 Résultats de dénombrement des germes photogènes

Les résultats représentés dans les tableaux 07 et 08.

Tableau 08: Résultats du dénombrement des staphylocoques en milieu Chapman (ufc/ml).

Dilutions Echantillons	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
pie rouge	5.7	0.33	0.019	0.0004
pie noire	7.1	0.39	0.022	0.0006

Tableau 09: Résultats de dénombrement des streptocoques dans un milieu de Slanetz (ufc/ml).

Dilutions Echantillons	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
pie rouge	4.9	0.26	0.006	/
pie noire	5.6	0.31	0.011	0.0004

3.5 Résultats des tests

➤ *Staphylococcus aureus*

3.5.1. Test de BHIB

La **figure 14** montre la présence d'un trouble dans les deux tubes de BHIB des deux échantillons.

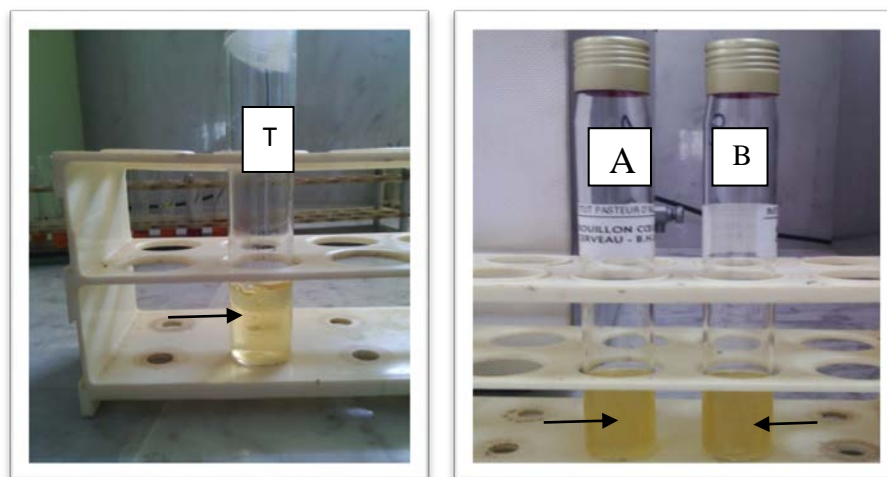


Figure 14: Résultat du test BHIB : A : échantillon 01, dilution 10^{-1} .
B : échantillon02, dilution 10^{-1} , T: témoin.

3.5.2. Test plasma de lapin

La **figure 15** ci-dessous, montre une coagulation dans les tubes, ce qui indique la présence des *staphylococcus aureus*.

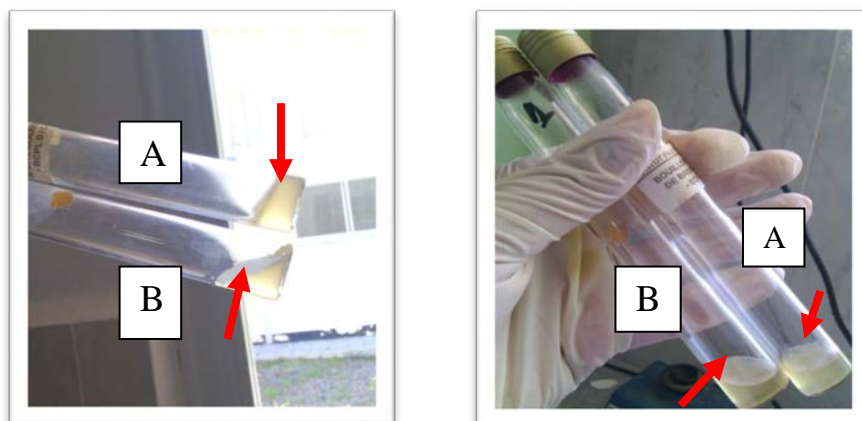


Figure 15: Résultats du test plasma de lapin. A : échantillon 01, dilution 10^{-1} . B : échantillon 02, dilution 10^{-1} .

Les souches de *staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma en un temps variant d'une demi-heure à 24h. La prise en masse du plasma est généralement totale, au point que le tube peut être retourné. Un caillot moins compact visible avant 24 heures doit être considéré comme positif (**Annexe07**).

3.5.3. Test de la catalase

L'apparition d'une effervescence en présence d'eau oxygénée indique une catalase positive, dans l'échantillon bactérien.

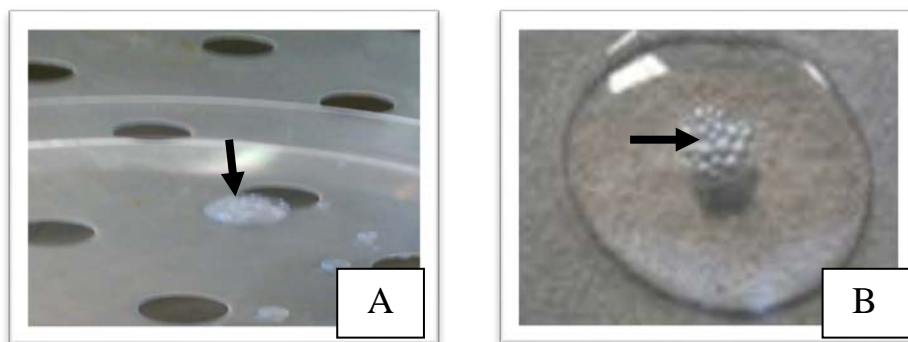


Figure 16: Résultats du test catalase des deux échantillons :
A : échantillon 01, dilution 10^{-1} B : échantillon 02, dilution 10^{-1}

3.5.4. Test à l'oxydase

L'absence de changement dans les deux échantillons indique un résultat négatif.

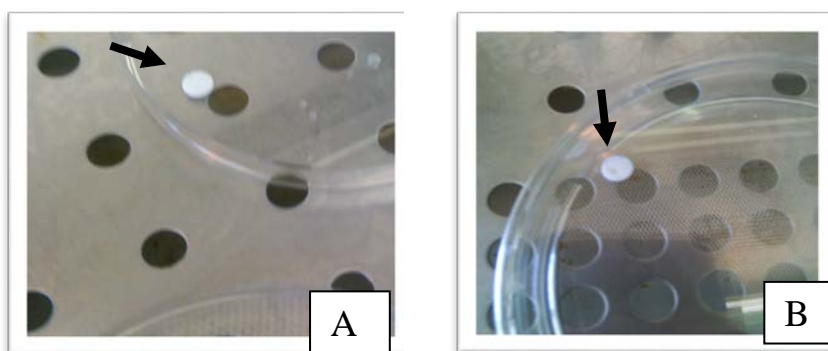


Figure 17: Résultats du test oxydase des *staphylococcus aureus*,
A : échantillon 01, dilution 10^{-1} B : échantillon 02, dilution 10^{-1}

➤ *Streptococcus agalactiae*

3.5.5. Test de présomption

La recherche des streptocoques utilise un milieu de présomption de Roth et un autre de confirmation de l'Eva Litsky en cas d'obtention d'un résultat positif dans le premier test (**Guiraud et al., 1980**).

Résultats du test de présomption présentant un trouble dans les deux échantillons.

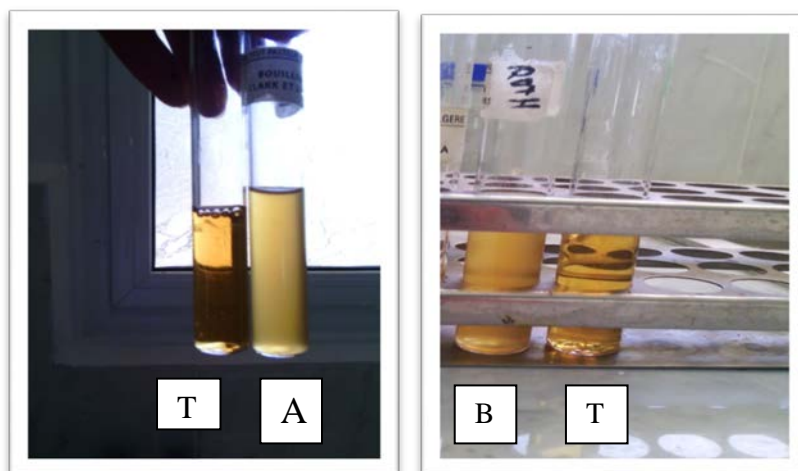


Figure 18: Résultats du test de présomption. A : échantillon01, dilution 10^{-1} . B : échantillon02, dilution 10^{-1} , T : milieu Roth témoin.

3.5.6. Test de confirmation

La figure 17 montre qu'il n'y a aucun changement dans les tubes, résultats négatifs.

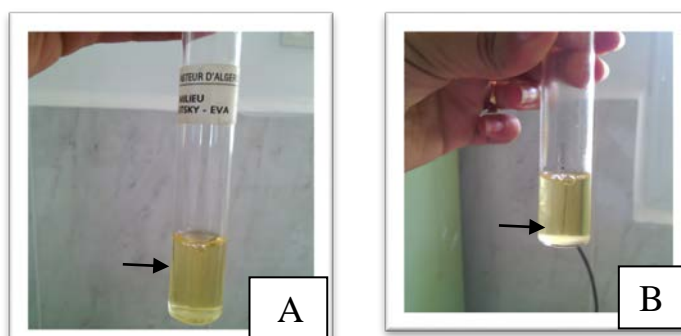


Figure 19: Résultats du test de confirmation des streptocoques fécaux A : échantillon 01, dilution 10^{-1} , B : échantillon 02, dilution 10^{-1}

3.5.7. Test à la catalase

L'absence de changement dans les deux échantillons, signifie une catalase négative.

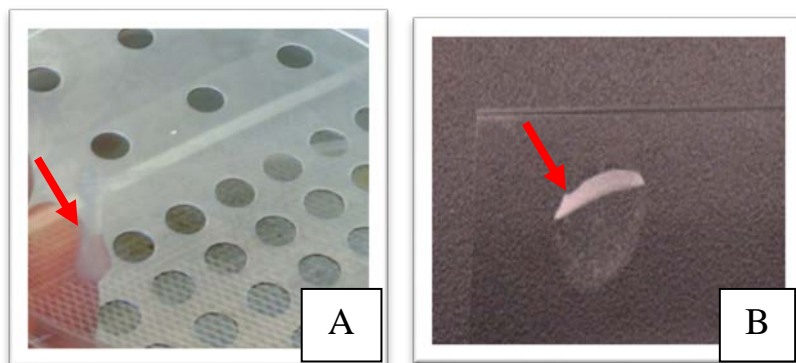


Figure 20: Résultats du test catalase A : échantillon 01, dilution 10^{-1} .
B : échantillon 02, dilution 10^{-1}

3.5.8. Test à l'oxydase

La figure 21 représente une oxydase négative, aucun changement dans les deux échantillons.

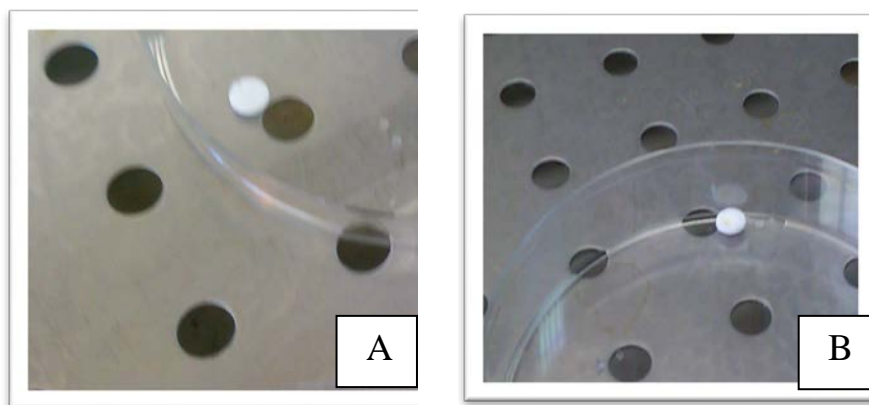


Figure 21: Résultats du test oxydase A : échantillon 01, dilution 10^{-1} .
B : échantillon 02, dilution 10^{-1}

4. Antibiogramme

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro (annexe 05): sensible (**S**), Résistant (**R**), et Intermédiaire (**I**).

Les souches catégorisées (**S**), sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte, dans le cas d'un traitement par voie systémique, avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP).

Les souches catégorisées (**R**), sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique, quelque soit le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

Les souches catégorisées (**I**), sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène, pour lequel les résultats obtenus in vitro ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique (**Collaboration de l'OMC., 2011**)

Le résultat de l'ensemencement dans un milieu gélose nutritif après l'incubation à 37°C, pendant 24 h, représenté dans la figure 22.

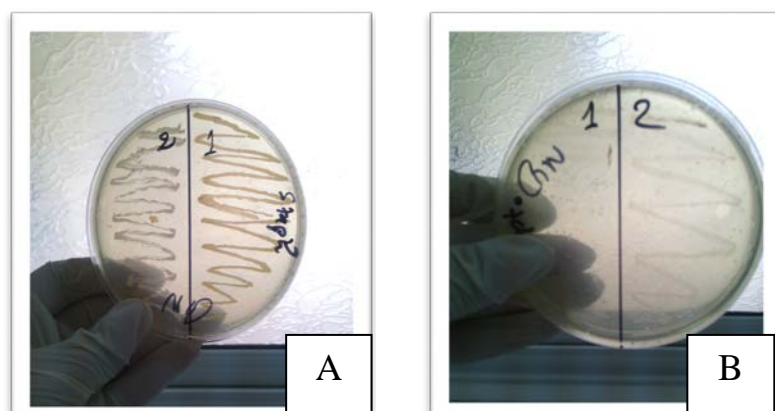


Figure 22: Résultat d'ensemencement dans milieu GN. A : échantillon 01 de lait, B : échantillon 02 de lait.

Les résultats de l'antibiogramme sont représentés dans les **figures 23 et 24** et dans les **tableaux 08 et 09**.

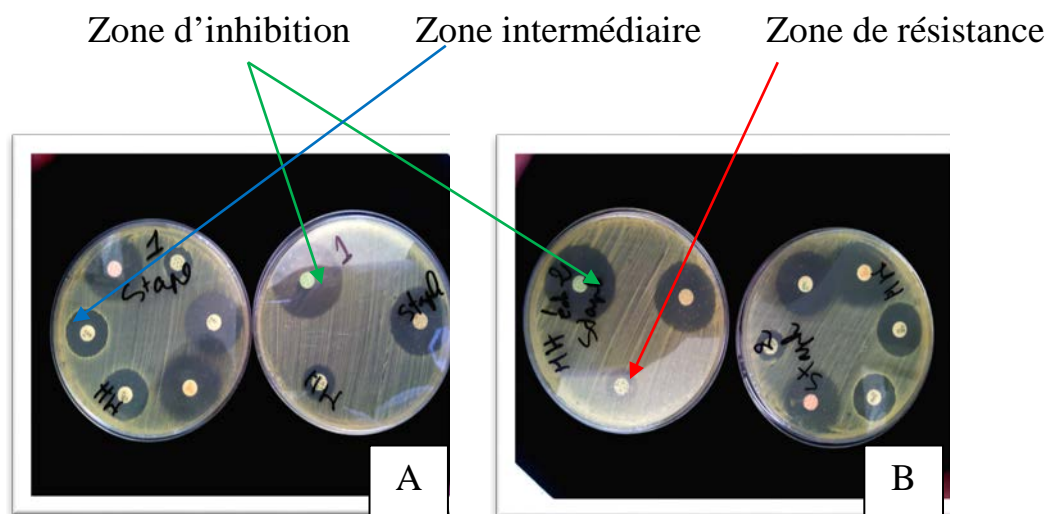


Figure 23: Résultats de l'antibiogramme des *staphylococcus aureus* sur une gélose MH. A : échantillon 01, B : échantillon 02

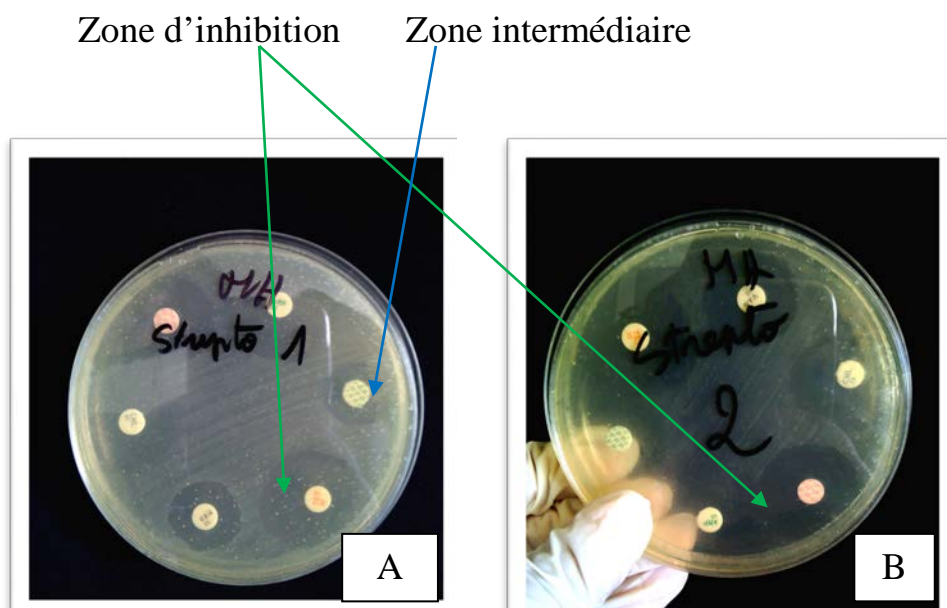


Figure 24: Résultats de l'antibiogramme des *streptococcus agalactiae*, A : échantillon 01, B : échantillon 02

Nous avons observé des zones d'inhibition sur les souches microbiennes, pour chaque souche microbienne, la sensibilité ou la résistance à un antibiotique est différente (**annexe 05 et 06**).

Nous avons réalisé les tableaux 10 et 11, en se référant au livre de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (en médecine humaine et vétérinaire).

Tableau10 : Résultats de l'antibiogramme des *Staphylococcus aureus*

ATB	OX1	ENR	FOX	VAN30	NEO30	TET30	AMC	P	E
Echantillon1	I	S	S	S	S	S	S	R	S
Echantillon2	S	S	S	S	S	S	S	R	S

S : sensible, **I** : intermédiaire, **R** : résistante

Tableau11 : Résultats de l'antibiogramme des *Streptococcus agalatae*

ATB	VAN30	TET30	CHL30	AMP01	P	E
Echantillon1	S	S	S	S	I	S
Echantillon2	S	S	S	S	I	S

S : sensible, **I** : intermédiaire, **R** : résistante

Discussion

1. Indice de propreté

Selon la classification de **Cauty et Perreau, 2009**, il ressort que les deux vaches de la ferme sont relativement propres. Concernant la vache pie noire, les zones de salissures s'étendent sur la moitié inférieure de la cuisse et sur les pattes arrières, tandis que les zones de salissures chez la vache pie rouge s'étendent sur le haut de la cuisse.

La propreté des pattes arrières est un indicateur de l'hygiène des couloirs, la propreté des flancs et des cuisses est un indicateur de l'hygiène des logettes et de la litière (**Cauty et Perreau, 2009**).

2. Résultat du test papier indicateur mammites

Sur le test papier indicateur mammites, la couleur verte foncée est due à la présence d'une mammite chez les deux vaches. Une fois la vache atteinte d'une mammite, le lait devient acide, ce qui provoque le changement de couleur dans le papier indicateur.

3. Analyses microbiologiques

Trois (03) souches pathogènes ont été sélectionnées et isolées à partir du lait cru des deux vaches de la ferme sur milieu Désoxycholate, Slanetz, Chapman et Braid Parker.

L'analyse microbiologique nous a montré une diversité de genre et d'espèces étudiées.

➤ *Staphylococcus aureus*

L'année précédente (**en 2015**), les travaux de **Bellatrache** qui ont porté sur la caractérisation de la flore du lait cru de la ferme expérimentale n'ont pu mettre en évidence des *staphylococcus aureus* par manque de réactif. Cette année, nous avons saisi l'occasion de continuer la recherche en exploitant les produits disponibles.

L'analyse nous a mené à découvrir la présence des colonies jaunes et dorées, de tailles différentes dans le milieu Chapman due à la présence des staphylocoques, on peut prendre ainsi comme hypothèse que les staphylocoques peuvent être la cause de la mammite.

Les expériences de **KOCH** ont montré que les staphylocoques supportent les milieux hypersalés à 7,5%. **CHAPMAN** a confirmé ces premiers résultats en observant que les *staphylocoques* coagulant le plasma de lapin présentaient des colonies jaunes sur le milieu auquel il a donné son nom, alors que la plupart des autres bactéries étaient inhibées. (**Chapman, 1948**).

La recherche dans le milieu Baird Parker nous à permis de découvrir des colonies caractéristiques, à savoir des colonies noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparence (halo) ce qui représente les caractéristiques des *Staphylococcus aureus* qui peuvent être la cause de mammite (**Duthie, 1954**).

Staphylococcus aureus est susceptible de donner une colonie ronde, crémeuse, opaque, jaune sur milieu de Chapman ; noire, entourée d'un halo clair sur milieu de Baird Parker (**Guiraud, 2003**).

Pour confirmer ces résultats, le test de BHIB nous a révélé des troubles dans les tubes de BHIB, quant au Test plasma de lapin, il nous a

révélé la coagulation, ce qui confirme la présence des *staphylococcus aureus*.

La croissance est mise en évidence par l'apparition d'une turbidité dans le milieu. Des subcultures doivent être entreprises pour pratiquer une purification des souches destinées à être identifiées (**Duthie, 1954**)

Selon nos résultats obtenus, les *Staphylococcus aureus* possèdent une catalase, et sont dépourvus d'oxydase.

Selon Duthie, 1954, les *staphylococcus aureus* possèdent une catalase (qui va décomposer l'eau oxygénée H₂O₂) à la différence des streptocoques qui n'en possèdent pas, de même que les aérocoques « germes non pathogènes mais qui peuvent poser un problème pour le diagnostic différentiel des *S. aureus* ».

En comparaison avec l'étude de diversité des écosystèmes microbiens du lait et typologie des élevages bovins laitiers de la région de Hassi Mameche et Ain Nouissy, il a été noté l'absence des *staphylococcus aureus* ce qui reflète la maîtrise de la qualité hygiénique des exploitations testées (**Rechidi, 2013**).

➤ *Streptococcus agalatae*,

Les colonies obtenues présentant une couleur rouge ou rose foncée, à marron, sont caractéristiques des Streptocoques (**Rodier, 1984**).

L'absence de turbidité dans le bouillon de Litsky indique que les Streptocoques que nous avons obtenus ne sont pas des streptocoques fécaux.

Les 02 isolats identifiés au genre *Streptococcus*, ont été rattachés aux caractères des *Streptococcus agalatae*, car ces derniers n'ont ni catalase ni oxydase.

Selon **George et al**, *streptococcus agalatae* sont des Cocci à Gram positif, catalase négative, anaérobies aérotolérants.

Les résultats des travaux menés par **Bellatreche en 2015** ont montré l'absence de streptocoques. En revanche, il a été constaté la présence de Streptocoque fécaux dans la recherche réalisée par **Rechidi en 2013** et ce eu égard au nombre d'exploitations concernées par l'étude dans ce dernier cas.

4. Antibiogramme

L'antibiogramme constitue la suite logique de l'examen bactériologique. Nous constatons l'apparition des zones transparentes de différents diamètres, ce qui reflète la sensibilité des bactéries à l'égard des antibiotiques.

La zone sensible dépend du diamètre d'inhibition de la bactérie *Staphylococcus aureus*. Celle-ci est sensible aux antibiotiques suivants Vancomycine, Néomycine, Tétracyclines, Amoxicilline, Céfoxitine, Enrofloxacin, et intermédiaire à L'oxacilline, et résistante à la Pénicilline.

Tandis que les *Streptococcus agalatae* sont sensibles aux Vancomycine, Tétracyclines, Chloramphénicol, Ampicilline, Erythromycine, et intermédiaire à la Pénicilline.

D'après **Emmanuel et al., (2008)**, *Streptococcus* est particulièrement sensible à la pénicilline et aux autres types d'antibiotiques appartenant à la famille de la pénicilline. Un antibiogramme est réalisé lorsque l'utilisation de ces antibiotiques n'aboutit pas à la guérison des sujets malades.

Streptococcus agalactiae est sensible aux Tétracyclines, Chloramphénicol, Ampicilline, Amoxicilline, Erythromycine, et souvent résistante à la Pénicilline (**Lafont et al., 2002**)

Staphylococcus aureus est sensible aux antibiotiques suivants : Vancomycine, Néomycine, Tétracyclines, Amoxicilline, Céfoxitine, Enrofloxacin, et souvent à l'oxacilline ; résistant à la Spiramycine et souvent résistant à la Pénicilline (**Lafont et al., 2002 ; Emmanuel et al., 2008**).

On considère que l'antibiogramme est difficile à réaliser par le praticien car beaucoup de facteurs entrent en jeu dans la qualité de celui-ci (taille de l'inoculum, conservation des disques, milieu de culture). **Blains, (2004)**, estime que l'antibiogramme ne se justifie pas souvent, il reste discutable et le vétérinaire praticien connaît déjà par ses études et son expérience sur le terrain, la sensibilité des principaux germes aux différents antibiotiques (**Poutrel, 2004**).

Conclusion

Suite à nos travaux de recherche sur le présent thème, on peut conclure que la vache pie noire est atteinte d'une mammite clinique, par contre la vache pie rouge est atteinte d'une mammite subclinique, et que ceci est probablement dû aux causes suivantes :

-mauvaises conditions d'élevage et d'hygiène ;

-mauvaises conditions d'hygiène de la traite: insuffisance de nettoyage et désinfection des quartiers avant et après chaque traite, utilisation de machine à traire mal entretenue, insuffisance de traitement au tarissement ;

- mauvaises conditions de travail pour le personnel : absence de tenue vestimentaire, de vestiaires et de sanitaires.

Suite à ces constatations, on propose de citer quelques recommandations:

- ▶ Mise en place dans la ferme d'élevage, d'un laboratoire d'autocontrôle de microbiologie spécialisé, vu son rôle dans le contrôle de la qualité sanitaire du lait du lait cru, notamment dans la recherche des mammites;
- ▶ Amélioration de l'application de mesures d'hygiène adéquates, particulièrement lors de la traite ;
- ▶ Traitement systématique des mammites cliniques en respectant les règles de bases (traitement antibiotique précoce et massif) ;
- ▶ Procéder à la réforme des vaches aux mammites non guéries ou récidivantes ou à quartier fibrosé ;
- ▶ Recherche systématique des mammites par le test papier indicateur ;
- ▶ Amélioration des conditions de travail du personnel de la ferme d'élevage.

Ouvrages et articles:

1. ADDA J., GRIPON J. C. et VASSEL L. (1982). The chemistry of flavor and texture generation in cheese. food chemistry, pp : 9,115 - 129.
2. AGABRIEL C., COULON J.B., BRUNSCHWIG G., SIBRA C. et NAFIDI C, (1995). Relation entre la qualité du lait livré et les caractéristiques des exploitations. INRA Prod. Anim., 8 (4). pp : 251-258.
3. BADINAND F. MAITRISE DU TAUX CELLULAIRE DU LAIT (1994). Rec.Méd.Vét., pp : 170, 419-427
4. BARDIAU M., DETILLEUX J., FARNIR F., MAINIL J.G., OTE, I (2014). Associations between properties linked with persistence in a collection of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. Vet. Microbiol. pp: 169, 74-79
5. BARKEMA H.W. , SHUKKEN Y.H ., LAM T.J.G.M. ; BEIBOER M.L . ; WILMINKII H. ; BENEDICTUSG ET BRANDA A.,(1997). Incidence and risk factors for repeated cases of clinical. *Escheria Coli* mastitis in dairy cattle.
6. BEATRICE VIOLAINE MARIE DEVERRIERE, (2007). Reproduction expérimentale de mammites A *Staphylococcus aureus* chez la brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires, thèse d'Etat pour obtenir le grade de docteur vétérinaire , A L'école Nationale Vétérinaire De Toulouse, p32
7. BEAUDEAU.F SEEGER H FOURICHON C et HORTEL P, (1997). Probabilité de survenu mammite clinique chez les vaches laitières a numération cellulaire du lait inférieures a 400 000 cellules par ml rnc. rech. ruminants p:277- 278
8. BLAINS S. (2004), Intérêts et techniques de l'identification bactérienne des germes de mammites au cabinet vétérinaire p: 811.
9. BLOOD D.C, HENDERSON J.A, (1976). Médecine vétérinaire.Vigot Frères Ed., Paris 6e, p 294-331.
10. BOUCHOT M.C., CATEL J., CHIROL L., GANIERE J.P., LEMENEC M. (1985).Diagnostics bactériologiques des infections mammaires des bovins Re. Méd.Vét., p: 161- 567-577.
11. BOURGEOIS C.M. LEVEAU J.Y., (1980). Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires volume3 le contrôle microbiologiques, APRIA, p225.
12. Chapman G.H., 1948 An improved Stone medium for the isolation and testing of food poisoning staphylococci. Food Research p 100-105.

13. CAPUCO A.V., BRIGHT S.A., PANKEY J.W., Wood D.L., Miller R.H., Bitman A J (1992), Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin j. dairy Sci, p: 75- 2126–2130.
14. CAUTY I et PERREAU, J-M (2009), Conduite du troupeau bovin laitier production, qualité, rentabilité, édition 2^e guide France agricole, ISBN, 987-285557-165-2. p: 66-254-258- 259.
15. COULON, (1999). Facteur physiologique de la variation des concentrations cellulaires du lait journées nationales GTV INRA nantes/ 26-27-28 mai : p31-41.
16. CREMO. (2003). Problèmes de qualité du lait, causes possibles et mesures à prendre. brochure 1^{ere} édition Paris. p3.
17. CUQ J.L. (2007). Microbiologie alimentaire. édition sciences et techniques du languedoc. université de montpellier. pp: 20-25.
18. DAHOU, I.R ET LESLIE K.E, (1991), Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections, preventive veterinary medicine, 10: 225 237.
19. DEBRY, (2006), lait, nutrition et santé. Ed : tec et doc Lavoisier Paris. 566P.
20. Duthie E.S., (1954) Evidence of Two Forms of Staphylococcal Coagulase. J. gen. Microbiol., p 427-436
21. FABRE M. ; MORVAN H. ; LEBREUX B., HOUFFSCHMITT P ET BEATHELOT X. (1997). Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France. article2-mammites sucliniques. bulletin GTV., 573 (5b) :p9-1.
22. FAYE. B, DORR N, LESCOURRET F., BARNOUIN J., et CHAUSSAGNE M., (1994). Les infections intra mammaire chez la vache laitière dans l'enquête écopathologique de Bretagne. inra. prod. anim., 7(1) : p55-66.
23. GRIPON JC., DESMAZEAUD MJ., LE BARS D. et BERGERE JL. (1975). étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Influence de la présure commerciale. le lait 55.pp: 502-516.
24. GUIRAUD J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Édition dunod. paris. pp : 136-139.
25. HANZEN Ch., (2008). Physiologie de la glande mammaire et dutrayon de la vache laitière, faculté de médecine vétérinaire, p : 6-7-9-10
- JACOB B.M., ANTONY E.K., SREEKUMAR B., HARIDAS M (2000). Thiocyanate mediated antifungal and antibacterial property of goat milk lactoperoxidase. Life. Sci., ,p 66, 2433-2439.

26. JAKOB E., WINKLER H. ET HALDEMANN J. (2009). Critères microbiologiques pour la fabrication du fromage. édition, agroscope liebfeld-posieux. groupe de discussions N° 77. F. pp :5-31.
27. JULIE-HELENE Fairbrother, (2014) Mammite Bovine A *Escherichia Coli*; Identification et caractérisation de la persistance, mémoire présenté a la faculté de médecine vétérinaire en vue de l'obtention du grade de maître, es sciences vétérinaires, université de Montréal, p6-7-8
28. LAFONT .JP, MARTEL JL, MAILLARD R, CHASLUS-DANCLA E, PUYT JD, LAVAL A, et al. (2002), Antibiothérapie bovine. Acquis et consensus. Conférences organisées par le laboratoire Pfizer Santé Animale. Ed. Du Point Vétérinaire, p: 318.
29. LEE C.S., WOODING F.B., KEMP (1980). Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. J. Dairy. Res, p :47-39-50
30. LEIFSON, E.. (1935). New culture media bas ed on sodium desoxycholate for the isolate ion of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. Journal of Pathology and Bacteriology, p: 581-599
31. LEPAGE PH, (1999), Lepage PH. Les cellulaires du lait et de la mamelle. J. N. G T V. I N R A., Nantes, p 7-13.
32. LEVESQUE (2004), La traite des vaches laitières étape par étape vers la qualité guide pratique. Édition Educagri. Québec. p25
33. LEYRAL G. ET VIERLING É. (2007). Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires. 4e édition biosciences et techniques, p 87.
34. OUTERIDGE P.M., LEE C.S (1988). The defense mechanisms of the mammary gland of domestic ruminants. prog. vet. microbiol. immun., p:165-196
35. PAAPE M.J., MILLER R.H., ZIV G. (1991). Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. Am. J. Vet. Res., p:52, 363-366.
36. PLOMMET M, ROGUINSKY M., (1968). Enquête sur les germes de mammites Bull. Acad. Vet p:221-231.
37. POUTREL B., CAFFIN J-P(1988). physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin g2 concentration in milk. j. dairy Sci, p: 71- 20-35-43.

Références

38. POUTREL B. (2004), Antibiothérapie au tarissement chez la vache laitière : un traitement systématique : un concept dépassé *Le Point Vétérinaire* p52.
39. RAINARD P. (1985). Les Mammites Colibacillaires. *Rec. Méd. Vét.*, p: 161, 529-537.
40. RAINARD P., RIOLLET C (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res*, p : 37, 369-400.
41. RAMET J.P. (1985). La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. collection fao alimentation et nutrition p:48.
42. RIOLLET C., RAINARD P., POUTREL B(26-27-28 MAI,1999). Cinétique de recrutement cellulaire et demultiplication bactérienne après infection. *J. N. G T V. I N R A.*, Nantes, p : 67-73.
43. ROBINSON R.K. (2002). Dairy microbiology handbook. the microbiology of milk and milk products. third edition. edition john wiley and Sons, INC. New York. p :780
44. Rodier J., (1984) L'analyse de l'eau. Dénombrement des streptocoques fécaux présumés. (Méthode par filtration sur membrane). Dunod 7è Ed., p 828-829.
45. SAIDI R., KHELEF D., KAIDI R (2010). Evaluation d'un test de dépistage précoce des mammites subcliniques des vaches. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop*, p63- 57-61
46. SERIEYS F(1985). La numération des cellulaires du lait : interprétation pour le diagnostic et le suivi des infections mammaires. *Rec. Méd. Vét*, p : 161-553-566
47. SORDILLO L.M., SHAFER-WEAVER K., DE ROSA D (1997). Symposium: bovine immunology. immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, p : 80- 18-51-18-65.
48. TORMO Helene, (2010). diversité des flores microbiennes des laits crus de chèvre et facteurs de variabilité, thèse pour obtenir le diplôme de docteur de l'université paul sabatier Toulouse, ,p52
49. VARNAM A.H. ET SUTHERLAND P. (2001). milk and milk products: technology, chemistry, and microbiology. volume 1 food products series. An aspen publication. New York. pp: 35-37.
50. VIGNOLA C. (2002). Science et technologie du lait transformation du lait. Edition presses internationales polytechnique, canada. pp. 3-75.

Thèses:

1. GABLI Abdelhafid. (2005). Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines, thèse de

doctorat en sciences vétérinaires université mentouri-Constantine p12-13-14-25

Mémoires:

1. ISSA IBRAHIM Abdelkrim, (2009). Bilan bactériologique des mammites dans les troupeaux zébu azawak a la station expérimentale sahélienne de toukounous (niger) et epidémiologie moléculaire des *staphylococcus aureus* isolés. pp: 35- P40.
2. Bellatrache. Z (2015) de caractérisation de la flore du lait cru de la ferme expérimentale de Mostaganem
3. BELHADI Nabila, (2009). , Affects des facteurs d'élevages sur la production laitière, mémoire de magister en agronomie, université mouloud maameri De Tizi Ouzzou, P 29
4. Emmanuel, François, Jean Barrot Debreil (2008), les analyses bactériologiques du lait des infections mammaires bovines applicables au cabinet vétérinaire en pratique courante et leurs intérêts dans le traitement des mammites.
5. RECHIDI.N, (2013). diversité des écosystèmes microbiens du lait et typologie des élevages bovins laitiers de Hassi Mameche et Ain Nouissy p58.

Textes réglementaires :

Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004, rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour essai et dilutions en vue de l'examen microbiologique (JORA N°70).

Documentation :

1. Collaboration de l'OMC (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6^{ème} édition, p 185-184-187.
2. Institut d'élevage. (2009). Traite des vaches laitières. Matériel installation, entretien. 1ere édition France agricole. Produire mieux. pp: 55-506.
3. 20.National committee for clinical laboratory standards., (2001) approved standards :M11A5 methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Wayn Pa.

Sites web

[1.http://www.memoireonline.com/03/12/5537/m_Contribution--1-évaluation-des-pratiques-frauduleuses-dans-le-lait--la-reception0.html](http://www.memoireonline.com/03/12/5537/m_Contribution--1-évaluation-des-pratiques-frauduleuses-dans-le-lait--la-reception0.html)

Références

2.<http://www.mon-ami-baptiste.com/boutique/test-du-lait-1403/papier-test-mammite--10518.html>

<http://microcsb.net/IMG/pdf/antibiogramme.pdf>.

3.http://www2.aclyon.fr/enseigne/biotech/microbio/Milieu_culture/SLA_NETZ.htm

4.http://bacterioweb.univfcomte.fr/cours_dcem1/streptocoques.htm

5.<http://microcsb.net/IMG/pdf/antibiogramme.pdf>

6.<http://lvrlag.unblog.fr/author/lvrlag>

7.<http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf>

8.<http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/webapp/course/course.html>

Annexe01

Milieu désoxycholate (LEIFSON, E., 1935)

- **Composition**

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande10,00 g
- Lactose10,00 g
- Désoxycholate de sodium0,50 g
- Chlorure de sodium.....5,00 g
- Citrate de sodium2,00 g
- Rouge neutre0,03 g
- Agar agar bactériologique15,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,1 \pm 0,2$

- **Principe**

Ce milieu contient une base nutritive ordinaire.

Ce milieu contient 1 critère de différenciation : le lactose dont la fermentation est révélé par le rouge neutre.

Il contient 2 inhibiteurs des bactéries Gram+ à faible concentration : le désoxycholate (sels biliaires) et le citrate de sodium.

Couleur finale du milieu : rose violacé

Annexe02

Milieu Slanetz

(http://www2.aclyon.fr/enseigne/biotech/microbio/Milieu_culture/SLANETZ.htm)

- **Composition**

Peptone.....	20 g
Glucose.....	2 g
Azide de sodium.....	0.4 g
TTC triphényltétrazolium	0.1 g
Hydrogénophosphate de sodium	4 g
Agar	10 g

pH = 7,2

- **Principe**

Ce milieu contient un critère de différenciation : le TTC (voir gélose lactosée au TTC et Tergitol 7) qui lors de sa réduction donne une coloration des bactéries en rouge.

Il contient un inhibiteur du gram -, qui sélectionne les Streptocoques : l'azide de sodium.

- **Lecture**

Les Entérocoques donnent des colonies de taille moyenne, roses ou rouges.

Les Bacillus peuvent pousser et donner le même aspect de colonies, mais de taille plus importante.

Annexe03

- Milieu Baird Parker

(http://www2.aclyon.fr/enseigne/biotech/microbio/Milieu_culture/SLANETZ.htm)

- **Composition**

Le tellurite et le jaune d'œuf sont ajoutés au milieu au moment de l'emploi.

Bio-Trypcase.....	10g
Extrait de viande de bœuf.....	5g
Extrait de levure.....	2g
Chlorure de lithium.....	5g
Pyruvate de sodium.....	10g
Glycocolle.....	12g
Tellurite de potassium.....	1 mL
Emulsion de jaune d'œuf à	10 % 1 mL
Agar.....	15g

pH = 7,2

Annexe04

Milieu Chapman

(http://www2.aclyon.fr/enseigne/biotech/microbio/Milieu_culture/SLANETZ.htm)

- **Composition**

Sa composition, en grammes par litre d'eau distillée, est la suivante :

Peptones.....	11,0 g
Extrait de viande.....	1,0 g
Chlorure de sodium.....	75 g
Mannitol.....	10,0 g
Rouge de phénol.....	0,025 g
Agar.....	15 g
Eau distillée	1000 mL

pH = 6.6

Annexe 05

Collaboration de l'OMC (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6^{ème} édition, p 185-184-187.

Table de lecture 26 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Streptococcus spp.* Groupe viridans (En médecine vétérinaire)

Antibiotiques testés	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Pénicilline (<i>Streptococcus non S. pneumoniae</i>) groupe viridans	10 UI	-	-	-	≥4	0,25-2	≤0,12	MH +5% de sang de mouton, incubé sous atmosphère en CO ₂
<i>Streptococcus canis</i> (groupe G, β hémolytique)	10 µg	-	-	≥24	-	-	≤0,12	
Penicilline-novobiocine (<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. uberis</i>)	10 UI/ 30 µg	≤14	15-17	≥18	≥4/8	2/4	≤1/2	
Ampicilline	10 µg	≤18	19-25	≥26	≥8	0,5-4	≤0,25	
<i>Streptococcus canis</i> ; (groupe G, β hémolytique)	-	-	-	-	≥0,5	-	≤0,25	Ces valeurs sont inspirées de la pharmacocinétique et des données pharmacodynamiques, pour les chiens, la dose de l'amoxicilline modifiée est : 22 mg /kg toutes les 12 heures par voie per os.
<i>Streptococcus equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i>	-	-	-	-	≥0,5	-	≤0,25	Ces valeurs sont inspirées de la pharmacocinétique (utilisant des doses cliniques acceptables) et des données pharmacodynamiques, pour les chevaux, la dose de l'ampicilline sodium modifiée est : 22mg /kg en IM.
Céfotaxime	10 µg	≤18	19-25	≥26	≥8	0,5-4	≤0,25	
Tétracycline	30 µg	≤18	19-22	≥23	≥8	4	≤0,25	L'interprétation pour Tétracycline est valable pour doxycycline
Erythromycine	15 µg	≤15	16-20	≥21	≥1	0,5	≤0,25	
Vancomycine*	30 µg	-	-	≥17	-	-	≤1	La détection de la résistance à la vancomycine exige une incubation de 24h.
Chloramphénicol*	30 µg	≤17	18-20	≥21	≥16	8	≤4	

Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved standard –Third Edition M31-A3 .Vol.28 N°8
* Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiologie

Annexe 06

Collaboration de l'OMC (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6^{ème} édition, p 185-184-187.

184

Table de lecture 23 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus* spp. (En médecine vétérinaire) :

Antibiotiques testés	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Pénicilline	10UI	≤28	-	≥29	≥0,25	-	≤0,12	
Pénicilline+Novobiocine	10UI/30 µg	≤14	15-17	≥18	≥4/8	2/4	≤1/2	Traitement des mammites pendant la lactation
Amoxicilline+Acide clavulanique*	20/10 µg	≤19	-	≥20	≥8/4	-	≤4/2	
Oxacilline								
<i>S.aureus</i>	1 µg	≤10	11-12	≥13	≥4	-	≤2	Tester le disque de céfoxitine à 30 µg pour détecter la résistance à la métiline des <i>S.aureus</i> et <i>S.C.N</i> La résistance à la céfoxitine (et à l'oxacilline) signifie la résistance à toutes les β-lactamines NB : **** recommandation pour la mise en évidence de la résistance à la métiline
<i>S.C.N</i>	1 µg	≤17	-	≥18	≥0,5	-	≤0,25	
Céfoxitine****	30 µg	≤21	-	≥22	≥8	-	≤4	
<i>S.aureus</i>								
<i>S.lugdunensis</i>								
Erythromycine	15 µg	≤13	14-22	≥23	≥8	1-4	≤0,5	
Néomycine/ Kanamycine	30 µg	≤13	14-17	≥18	≥4	32	≤16	La réponse pour la néomycine est valable pour la kanamycine
Gentamicine**	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4	
Enrofloxacin	5 µg	≤16	17-22	≥23	≥4	1-2	≤0,5	
Sulfisoxazole	250 ou 300 µg	≤12	13-16	≥17	≥5/2	-	≤2/6	La réponse pour le sulfisoxazole est valable pour les sulfonamides
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤10	11-15	≥16	≥4/76	-	≤2/38	-Valable pour Triméthoprim/ Sulfadiazine -La valeur ≤2/38 peut être utilisée pour les isolats des infections du tractus urinaire.
Tétracyclines	30 µg	≤14	15-18	≥19	≥16	8	≤4	Valables pour chlorotétracyclines, oxytétracyclines et doxycyclines
Vancomycine**	30 µg	-	-	≥15	≥16	4-8	≤2	La détection de la résistance à la vancomycine exige une incubation de 24h.
Bacitracine	130 µg	<15	-	≥15	≥2	-	<2	
Clindamycine	2 µg	<14	15-20	≥21	≥4	1-2	≤0,5	La réponse pour la Clindamycine est valable pour la lincomycine. La clindamycine est plus active sur la plupart des souches de <i>Staphylococcus</i>

Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved standard -Third Edition M31-A3. Vol.28 N°8. February 2008.
Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement, NCCLS document M31-S1. Vol.24 N°17. May 2004
Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition, NCCLS document M31-A2. Vol.22 N°06 May 2002.

* Antibiotique testé seulement pour la recherche des β-lactamases ** Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiologie
*** Antibiotique testé seulement pour la recherche de la métiline **** Pour la mettre en évidence de la résistance à la métiline, le CLSI recommande dans son communiqué de février 2008 de compléter cette résistance à l'aide d'un disque de céfoxitine 30 µg (FOX)

http://www.sante.dz/aam

Table de lecture 24 : Valeurs critiques de la céfoxitine pour la détection des souches de souches de *Staphylococcus* spp. et *aureus* métilino résistantes * (En médecine vétérinaire):

Antibiotiques testés	Organismes	Diamètres critiques (mm)		Commentaires
		R	S	
Céfoxitine (30µg)	<i>S.aureus</i> and <i>S.lugdunensis</i>	≤21	≥22	- Si le diamètre de la zone d'inhibition est < 21 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥22 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est sensible à l'oxacilline
	<i>S.C.N</i> sauf <i>S.lugdunensis</i>	≤24	≥25	- Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 24 mm, la souche de <i>S.C.N</i> est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥25 mm, la souche de <i>S.C.N</i> est sensible à l'oxacilline

www.sante.dz/aam

Annexe 07

Notice de la boîte de plasma de lapin du laboratoire vétérinaire

(*) Certaines préparations de bouillon ordinaire, nonensemencées mélangées au plasma de lapin, peuvent entraîner une coagulation de celui-ci. Il est donc indispensable de faire au préalable un témoin bouillon-plasma si l'on n'utilise pas le bouillon Staphylocoagulase.

c) Résultats attendus

Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma en un temps variant d'une demi-heure à 24 heures. La prise en masse du plasma est généralement totale, au point que le tube peut être retourné. Un caillot moins compact visible avant la 24^{ème} heure doit être considéré comme positif.

5- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITÉ DU TEST

- Aspect du lyophilisat : limpide **beige rosé**.
- Les performances culturales du Plasma de lapin sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	RESULTAT DE LA COAGULATION EN 24 H A 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-

6- CONTRÔLE QUALITÉ DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

7- LIMITES D'UTILISATION

Le milieu doit être observé toutes les heures pendant les 4 premières heures. En effet certaines souches de *S. aureus* produisent de la fibrinolysine qui lyse les zones de coagulation. Au bout de 24 heures cette réaction peut entraîner une fausse réaction négative.

7

Résumé : Vue l'importance essentielle du lait cru, en tant que nutriment essentiel pour la santé humaine, et vu son important rôle dans l'industrie agroalimentaire pour la fabrication des produits laitiers, il nécessite une étude concernant les mammites et les bactéries qui en sont responsables. C'est dans ce sens là que ce projet d'étude à été mené. Ce travail s'est étalé sur une période de 3mois, du mois du mars au mois de mai de l'année 2016. Les prélèvements du lait cru ont eu lieu dans la ferme expérimentale de l'université de Mostaganem. Les résultats obtenus à l'issue de cette étude à permis de mettre en évidence la présence des bactéries du genre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalaxiae* ce qui vient confirmer la présence de mammite dans l'élevage. D'où l'intérêt de prendre toutes les mesures qui participeraient et à améliorer les conditions hygiénique pour obtenir un lait sain.

ملخص: نظرا للأهمية الحليب الطازج الذي يعتبر من المغذيات الأساسية لصحة الإنسان، و نظرا لدوره الهام في صناعة المواد الغذائية لتصنيع منتجات الألبان، يتطلب دراسة حول التهاب الضرع والبكتيريا المسؤولة عنه ومن هذا المنطلق يأخذ مشروع بحثي طريقه، وقد استغرق هذا العمل فترة ثلاثة أشهر من شهر مارس حتى شهر ماي 2016، حيث أخذت عينات من الحليب الطازج من البقرتين المتواجدين في المزرعة التجريبية لجامعة مستغانم حيث كشفت نتائج التحاليل وجود بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية التي تؤكد وجود التهاب الضرع في البقرتين المتواجدين في المزرعة. نأخذ بعين الاعتبار الأسباب و الاحتياطات اللازمة حتى نحصل على حليب صحي