

Université
Abdelhamid Benbadis
Mostaganem

Faculté des Sciences
de la Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم

كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°/SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

FATAH AMINA

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Spécialité: Exploitation des écosystèmes microbiens laitiers

THÈME

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION
DES BACTERIES RESPONSABLES
DES MAMMITES CHEZ LES BOVINS.
CAS DE DEUX FERMES
DE LA WILAYA DE MOSTAGANEM**

Soutenu publiquement le 06/07/2017

DEVANT LE JURY

Mr S.NEMICHE	Président	M.C.A	U. Mostaganem
Mr D.BENMILOUD	Examineur	M.A	U. Mostaganem
Mme N.RECHIDI-SIDHOUM	Encadreur	M.A.A	U. Mostaganem
Mr D.BOUCHERF	Co-Encadreur	Docent	U. Mostaganem

*Thème réalisé au niveau de laboratoire de Recherches
Des Sciences et Techniques de Production Animale de l'université de Mostaganem.*

Année Universitaire 2016/2017



Au début et avant tout, je remercie « ALLAH » le tout puissant de nous avoir guidé tout au long de nos années d'études et de nous avoir donné le courage et la santé pour réaliser ce travail.

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus distingués :
A Mme N. RECHIDI-SIDHOUM et à Mr D. BOUCHERF
pour avoir bien voulu diriger les travaux de la présente
recherche.*

*A Mr A. HOMRANI pour avoir bien voulu mettre à ma
disposition le laboratoire et les produits concernant la
recherche ainsi que Mr S. NEMICHE et Mr M. KERKLOUD
pour leurs précieuses aides et leurs conseils qui ont
contribué à la réalisation de ce mémoire.*

*A Mr D. BENMILOUD qui a aimablement accepté de faire
partie de ce jury pour juger ce modeste travail.
A tous les enseignants qui m'ont accompagné pendant
mon cursus universitaire*

*A Mr NABIL le vétérinaire de la ferme expérimentale de
Hassi- Mamèche pour son aide.*

*Je remercie également tous ceux qui ont contribué de près
ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

Dédicace



*Je dédie ce modeste travail en premier lieu à mes parents
qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours*

*A mon cher papa Abdelkader qui m'a beaucoup aidé afin
de réaliser mon mémoire*

*A ma chère maman qui m'a éclairé le chemin à suivre dans
la vie*

*A mes frères : Fethi, Kamel, Abdelatif, et ma sœur : Nour
El Houda*

A mes chers neveux : Manel, Fouad, Asmaa, Ilham, Amir

A mes belles sœurs : Nawel, Soumia, Siham

A toute ma famille sans exception

*A mes amies : Ikram, Souad, Houria, Romaisa, Namira,
Salima, Naziha*

*A tous mes collègues de la promotion 2^{ème} année master
Exploitation des écosystèmes microbiens laitiers*

*A tous ceux qui m'ont aidé dans l'élaboration de ce
mémoire*

Amina



Sommaire

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Liste des abréviations

Introduction1

Chapitre I : Généralités sur les bovins.....4

Chapitre II : Les différents types de mammites bovines.....26

Chapitre III : Diagnostic des infections mammaires.....51

Chapitre IV : Matériel et méthodes.....64

Chapitre V : Résultats et discussion101

Conclusion142

Références bibliographiques

Annexes

Table des matières

Résumé

Comme le lait est un aliment de base, il doit satisfaire des exigences qualitatives pour le consommateur et pour l'industrie laitière et d'autres quantitatives pour les éleveurs. Pour atteindre ces objectifs les éleveurs doivent contrôler et prévenir, surtout les mammites sub-cliniques qui représentent 98% des infections de la mamelle. Pour cela, une étude a été menée, afin de détecter précocement les mammites sub-cliniques, par l'isolement et la caractérisation des germes pathogènes, dans deux fermes laitières de petites tailles, situés dans la wilaya de Mostaganem. Les prélèvements de lait effectués au niveau des deux fermes nous ont permis de réaliser une étude microbiologique des deux échantillons. A l'issue de ce travail nous avons constaté que les deux troupeaux de vaches présentent des signes de mammites sub-cliniques. L'étude de certains paramètres pouvant prédisposer ou favoriser la maladie, a montré que les vaches allaitantes sont moins touchées que les laitières, constat que nous avons fait sur le terrain à la base des moyens et des conditions de traite où la notion d'hygiène n'est pas observée. Une formation adéquate des éleveurs sur les méthodes de détections précoces des mammites et sur les mesures d'hygiène à suivre dans la conduite des vaches laitières permettra de diminuer de façon significative l'apparition de mammites et les pertes financières qui en découlent.

Mots- clés : Vache laitière ; mammite; étude microbiologique ; germes pathogènes ; mesures d'hygiène.

ملخص

بما أن الحليب يعتبر غذاء أساسي وجب عليه تلبية احتياجات نوعية للمستهلك و لوحداث تحويل الحليب، وأخرى كمية للمربين. من أجل تحقيق هذه الأهداف وجب على المربين المراقبة والوقاية خاصة من التهابات ضرع البقر والتي لا تظهر أعراضها، علما أن هذه الأخيرة تمثل 98% من إصابات الضرع. من أجل ذلك قمنا بدراسة للكشف المبكر عن هذا النوع من الأمراض عن طريق عزل ومعرفة خصوصيات الجراثيم المسببة للمرض، وذلك على مستوى مزرعتين صغيرتين مختصتين في إنتاج الحليب والتي تقع في ولاية مستغانم. عينات الحليب المتحصل عليها على مستوى المزرعتين سمحت لنا بإنجاز دراسة ميكروبيولوجية عليها. بعد الانتهاء من هذا العمل لاحظنا ان كلا القطيعين من البقر تظهر أعراضا تدل عن إمكانية وجود التهاب داخلي غير مرئي. دراسة بعض الجوانب التي يمكن أن تعرض أو تحفز الإصابة بالمرض، بينت أن الأبقار المرضعة هي أقل إصابة من الأبقار الحلوب، وهذا ما لاحظناه في الميدان على أساس إمكانيات وظروف عملية الحلب بحيث أن معايير النظافة غير معمول بها. إن التكوين المناسب للمربين على استخدام طرق الكشف المبكر لإلتهابات الثدي واتباع تدابير النظافة في تسيير البقر الحلوب سيمكن من تقليل ظهور التهابات الثدي بصورة ملموسة وكذلك تخفيض النفقات الناجمة عنها.

الكلمات المفتاحية: البقرة الحلوب، التهاب الثدي، دراسة ميكروبيولوجية، الجراثيم المسببة للمرض، معايير النظافة.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Ingestion de matière sèche par vache en seconde moitié de lactation (% de poids vif et kg par jour)	10
Tableau 2 : Plan de prophylaxie.....	12
Tableau 3 : Proportions de cellules de l'immunité dans la mamelle.....	18
Tableau 4 : Flore originelle du lait cru.....	23
Tableau 5 : Germes contaminant le lait cru.....	24
Tableau 6 : Sources et niveaux de contamination du lait.....	24
Tableau 7 : Caractéristiques des différents types de mammites.....	30
Tableau 8 : Fréquence des blessures des trayons selon le type d'étable.....	35
Tableau 9 : Interprétation du leucocytostR (indication figurant sur le flacon du réactif)	56
Tableau 10 : Situations épidémiologiques types. Localisation des principales bactéries responsables de mammite au sein de la mamelle.....	60
Tableau 11 : Résultat de bactériologie sur le lait de mammite de différentes études.....	60
Tableau 12 : Caractérisation épidémiologique du modèle contagieux et du modèle environnemental.....	61
Tableau 13 : Caractérisation épidémiologique des sous modèles à staphylocoques ou à streptocoques.....	61
Tableau 14 : Caractérisation épidémiologique des sous modèles environnementaux à entérobactéries ou à streptocoque.....	62
Tableau 15 : Résultats des enquêtes menées dans les deux fermes.....	73,74
Tableau 16 : Germes pathogènes responsables des mammites.....	77
Tableau 17 : Procédure de la coloration de Gram.....	85
Tableau 18 : Les enzymes et l'identification bactérienne.....	91
Tableau 19 : Technique RM et VP en milieu de Clark et Lubs.....	94
Tableau 20 : Propreté et hygiène, indices comparatifs entre les 2 fermes.....	102
Tableau 21 : Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale sur milieu PCA	113
Tableau 22 : Dénombrement des staphylocoques sur milieu Chapman	113
Tableau 23 : Dénombrement des coliformes fécaux sur milieu VRBG	113
Tableau 24 : Dénombrement des streptocoques sur milieu Slanetz	113
Tableau 25 : Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale sur milieu PCA.....	124
Tableau 26 : Dénombrement des staphylocoques sur milieu Chapman.....	124
Tableau 27 : Dénombrement des coliformes fécaux sur milieu VRBG.....	124
Tableau 28 : Dénombrement des streptocoques sur milieux Slanetz, Mac Conkey et Désoxycholate.....	124
Tableau 29 : Reconnaissances des germes pathogènes présents dans les 2 échantillons.....	125
Tableau 30 : Résultats des tests d'identification biochimique des germes des deux fermes.....	131
Tableau 31 : Résultats de l'antibiogramme des Staphylococcus succinis (échantillon 1) et Staphylococcus aureus (échantillon 2).....	133
Tableau 32 : Résultats de l'antibiogramme des Streptococcus pyogènes (échantillon1) et Streptococcus agalactiae (échantillon 2).....	134
Tableau 33 : Types de germes isolés.....	138

Liste des figures

Fig.1 : La race locale brune de l'atlas.....	5
Fig.2 : La race Holstein.....	5
Fig.3 : La race pie rouge Montbéliard.....	6
Fig.4 : La race Fleckvieh.....	6
Fig.5 : Conformation intérieure des mamelles de la vache, coupe sagittale passant par les quartiers gauches.....	13
Fig.6 : Acinus mammaire.....	14
Fig.7 : Innervation et irrigation artérielle et veineuse de la mamelle, coupe sagittale.....	14
Fig.8 : Schéma de la structure de la mamelle des bovins.....	15
Fig.9 : Les cellules sécrétrices (cellules alvéolaires) et les canaux forment le système sécréteur de la glande mammaire.....	15
Fig.10 : Conformation et structure du trayon chez la vache.....	16
Fig.11 : Coupe longitudinale de l'extrémité du trayon chez la vache.....	17
Fig.12 : Coupe d'un trayon : le canal du trayon est étroit et court, il occupe uniquement l'extrémité du trayon, ce qui le rend très fragile.....	17
Fig.13 : La peau du trayon : elle est sans poil, ce qui facilite son nettoyage mais la rend aussi plus sensible aux traumatismes et aux agressions chimiques.....	17
Fig.14 a : Courbes schématiques de l'incidence des mammites.....	20
Fig.14 b : Courbes schématiques de l'incidence des mammites.....	20
Fig.15 : Vache choquée au cours d'une mammite gangréneuse.....	27
Fig.16 (a) : Les mouches véhiculent toutes sortes de germes pathogènes, tels que <i>Trueperella pyogenes</i> qui est responsable de la mammite d'été.....	29
Fig.16 (b) : <i>Musca autumnalis</i> , cette mouche est accusée de transmettre <i>Staphylococcus aureus</i> aux génisses.....	29
Fig.17 : Mamelle déséquilibrée.....	31
Fig.18 : Mamelle décrochée.....	31
Fig.19 : Trayon conique.....	31
Fig.20 : Lésions du trayon de type vasculaire.....	32
Fig.21 : Traite mécanique, manchon trayeur mal placé.....	33
Fig.22 : Lésions du trayon de type hyperkératosique (évolution lente, 20-60 jours).....	33
Fig.23 : Proportion de chaque groupe d'agents pathogènes isolés lors de mammites cliniques.....	44
Fig.24 : Proportion de chaque groupe d'agents pathogènes isolés lors de mammites subcliniques.....	45
Fig.25 : Coloration bleue du trayon. Ce trouble circulatoire, souvent observé chez les primipares, n'a aucune incidence sur la santé des mamelles.....	51
Fig.26 : Congestion du trayon : sa détection nécessite sa palpation pour détecter une éventuelle anomalie.....	51
Fig.27 : Microhémorragies sur un trayon.....	52
Fig.28 : Anneau de compression : cette lésion survient fréquemment sur les vaches présentant de l'œdème mammaire, et ceci sans aucune conséquence.....	52
Fig.29 : Examen des premiers jets dans un bol à fond noir.....	53
Fig.30 : Sachet de 25 papiers indicateurs de Ph.....	54
Fig.31 : Plateau Leucocyttest R.....	55
Fig.32 : Testeur de lait utilisant la conductivité pour détecter une mammite.....	58
Fig.33 : Vue par satellite des 2 zones d'étude, les 2 fermes étant distantes d'environ 50 km..	64
Fig.34 : Vue par satellite montrant la situation de la ferme expérimentale et du laboratoire LSTPA.....	65
Fig.35 : Les 3 vaches laitières de race Pie noire dans l'aire d'exercice.....	65

Fig.36 : Les veaux à l'abreuvoir.....	65
Fig.37 : Préparation du fourrage vert (sorgho).....	66
Fig.38 : Préparation des litières sèches en paille.....	66
Fig.39 : Alimentation des vaches en sorgho (vert) et foin (sec).....	66
Fig.40 : Abreuvoir rempli d'eau de forage.....	66
Fig.41 : La vache Janella (concernée par le prélèvement) porte un numéro d'identification...	67
Fig.42 : Plantes fourragères et arbres fruitiers.....	67
Fig.43 : Autres animaux de la ferme (les chiens).....	67
Fig.44 : Vue par satellite de la ferme de Hadjadj.....	68
Fig.45 : L'étable assure plusieurs fonctions.....	69
Fig.46 : Toit en tôles et ouvertures colmatées.....	69
Fig.47 : Tenues de travail et bottes mal rangées.....	69
Fig.48 : Caniveaux mal entretenu.....	69
Fig.49 : Les vaches dans l'enclos.....	70
Fig.50 : baignoire à usage d'abreuvoir dans l'enclos.....	70
Fig.51 : Vaches laitières pie noire.....	70
Fig.52 : Les 3 veaux placés en isolement.....	70
Fig.53 : Espace réservé à la traite	71
Fig.54 : Bottes de foin.....	71
Fig.55 : produit pour le traitement des vaches.....	71
Fig.56 : Tuyau pour le nettoyage.....	71
Fig.57 : Les terres agricoles entourant la ferme.....	72
Fig.58 : Présence d'un chien dans l'étable	72
Figures 59 a et b : prélèvement de lait à la ferme.....	77
Fig.60 : Dilutions en cascades.....	78
Fig.61 : (a) Antibiogramme, (b) schéma montrant les différentes parties d'un antibiogramme.....	98
Fig.62 : Colonies bactériennes blanches, dilution 10^{-1}	103
Fig.63 : Colonies bactériennes blanches, dilution 10^{-2}	103
Fig.64 : Colonies bactériennes violettes, dilution 10^{-1}	103
Fig.65 : Colonies bactériennes violettes, dilution 10^{-2}	103
Fig.66 : Colonies bactériennes dorées, dilution 10^{-1}	104
Fig.67 : Colonies bactériennes dorées, dilution 10^{-2}	104
Fig.68 : Colonies bactériennes noires, dilution 10^{-1}	105
Fig.69 : Résultat du test BHIB, M : échantillon 01, dilution 10^{-1} et T : échantillon témoin....	105
Fig.70 : Absence de coagulation dans M : l'échantillon 01 est de coagulase négative (-).....	106
Fig.71 : NC : puits non chauffé (+), CH : puits chauffé (-), T : puits témoin.....	107
Fig.72 : Test de catalase (+), pour les staphylocoques (a) avant la réaction et (b) après la réaction.....	107
Fig.73 : Test d'oxydase négatif (-), pour les staphylocoques (a) avant la réaction et (b) après la réaction.....	108
Fig.74 : Colonies bactériennes roses, dilution 10^{-1}	109
Fig.75 : Colonies bactériennes roses, dilution 10^{-2}	109
Fig.76 (a, b) : Test de présomption, M : échantillon 01, trouble, T : tube témoin (Roth).....	109
Fig.77 (a, b) : Test de confirmation des streptocoques fécaux, M : échantillon 01, trouble, T : tube témoin.....	110
Fig.78 : Zones hémolytiques sur gélose au sang.....	110
Fig.79 : Zones d'inhibition des streptocoques à la bacitracine.....	111
Fig.80 : test de catalase(-), pour les streptocoques.....	112
Fig.81 : test d'oxydase positive pour les streptocoques.....	112
Fig.82 : Colonies bactériennes blanches, dilution 10^{-1}	114

Fig.83 : Colonies bactériennes blanches, dilution 10^{-3}	114
Fig.84 : Colonies bactériennes sur milieu VRBG , dilution 10^{-1}	115
Fig.85 : Colonies bactériennes sur milieu VRBG , dilution 10^{-2}	115
Fig.86 : Colonies bactériennes sur milieu désoxycholate, dilution 10^{-2}	115
Fig.87 : Colonies bactériennes dorées, dilution 10^{-1}	116
Fig.88 : Colonies bactériennes dorées, dilution 10^{-2}	116
Fig.89 : Résultat du test BHIB, B: échantillon 02, (trouble), dilution 10^{-1} et T : échantillon témoin.....	116
Fig.90 : B : l'échantillon 02 est de coagulase positive (+).....	117
Fig.91 : NC : puits non chauffé (+), CH : puits chauffé (+), T : puits témoin(+).	118
Fig.92 : Test de catalase(+), pour les staphylocoques.....	118
Fig.93 : Test d'oxydase négatif (-), pour les staphylocoques.....	119
Fig.94 : Colonies bactériennes blanches, dilution 10^{-1}	120
Fig.95 : Colonies bactériennes blanches, dilution 10^{-2}	120
Fig.96 (a, b) : test de présomption, B : échantillon 02, (trouble), T : tube témoin (Rothe)....	120
Fig.97 (a, b) : Test de confirmation des streptocoques fécaux, B : échantillon 02, (trouble), T : tube témoin.....	121
Fig.98 : zones hémolytiques sur gelose au sang.....	121
Fig.99 : Zones d'inhibition des streptocoques résistants à la bacitracine.....	122
Fig.100 : Test de catalase(-) pour les streptocoques.....	123
Fig.101 : test d'oxydase positive pour les streptocoques.....	123
Fig.102 : Staphylocoques aureus Gram+, cocci en grappes.....	126
Fig.103 : Streptocoques fécaux Gram+, cocci en chainettes.....	126
Fig.104 : Coliformes fécaux (Escherichia Coli), bacille Gram (-).....	126
Fig.105 : Tests d'identification biochimiques pour les streptocoques (échantillon 1).....	127
Fig.106 : Tests d'identification biochimiques pour les coliformes (échantillon 1).....	128
Fig.107 : Tests d'identification biochimiques pour les streptocoques (échantillon 2).....	128
Fig.108 : Tests d'identification biochimiques pour les coliformes (échantillon 2).....	129
Fig.109 : M (échantillon 1), B (échantillon 2), présence anneau rouge pour les 2 tubes de droite, absence d'anneau pour les 2 tubes de gauche.....	130
Fig.110 : Antibiogramme de l'échantillon 1, Staphylococcus succinis.....	132
Fig.111 : Antibiogramme de l'échantillon 2, Staphylococcus aureus.....	132
Fig.112 : Antibiogramme de l'échantillon 1, Streptococcus pyogènes	133
Fig.113 : Antibiogramme de l'échantillon 2, Streptocoques agalactiae.....	133
Fig.114 : Résultats de la Technique PCR	137

Liste des annexes

Annexe 1 : Formules des milieux de culture

Annexe 2 : Documents et tables pour l'interprétation des antibiogrammes

Annexe 3 : Arrêté Algérien Interministériel du 24 Janvier 1998

Annexe 4 : Les caractères microbiologiques des germes responsables des mammites chez les bovins.

Annexe 5 : Indice de propreté des vaches et règles pratiques d'hygiène de traite.

Annexe 6 : Questionnaire utilisé pour l'enquête.

Annexe 7 : Exemples de documents pour la conduite des vaches laitières.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADH : Arginine dihydrolase

B : Bacitracine

BHIB : Brain Heart Infusion Broth (Bouillon Cœur-Cerveille)

CCSI : Concentration Cellulaire Somatique Individuelle

CCST : Concentration Cellulaire Somatique de Tank

CMN : Clindamycine

CMT : California Mastitis Test

DNase : Désoxyribonucléase

ERY : Erithromycine

FIL : Fédération Internationale de Laiterie

FMAT : Flore Mésophile Aérobie Totale

FOX : Cefoxilline

ISO : International Organization for Standardization

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

LDC : Lysine Décarboxylase

LSTPA : Laboratoire des Sciences et Techniques de Productions Animales

MH : Mueller Hinton

MS : Matière Sèche

NR : Nitrate Réductase

NRA : Nitrate Réductase de type A

NRB : Nitrate Réductase de type B

ODC : Ornithine Décarboxylase

ONP : Ortho Nitro Phénol

ONPG : Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside

OX1 : Oxacilline

P : Penicilline

PCA : Plat Count Agar

PCR : Polymerase Chain Reaction

PNDA : Plan National de Développement Agricole

RM : Rouge de Méthyle

RP : Rouge de Phénol

SCN : Staphylocoque à Coagulase Négative

SPN : Spiramycine

SXT : Trimethoprim sulfaméthoxazole

TDA : Tryptophane Désaminase

TET : Tétracycline

Trp : Tryptophane

TSI : Triple Sugar Iron

UFC : Unité Formant Colonies

UI : Urée Indole

VAN : Vancomycine

VP : Vosges- Proskauer

VRBG : Violet Red Bile Glucose Agar

Introduction :

Les infections intra-mammaires ou mammites sont des maladies d'origines diverses à facteurs de risques majeurs qui touchent particulièrement les élevages bovins laitiers en Algérie et dans le monde. Les mammites sont en termes de fréquence la première dominante pathologique de ces élevages avant les autres troubles comme celui de la reproduction et les boiteries ou d'autres maladies bovines comme la brucellose et la fièvre aphteuse. La prévalence des mammites est jusqu'à présent mal connue et nécessite des recherches approfondies.

Les mammites en élevage bovin laitier sont la principale cause de pertes économiques (Dumas et *al.*, 2004). Pour des raisons sanitaires, le lait est non produit ou non commercialisé ce qui entraîne un moindre paiement de celui-ci pour sa moindre qualité, une réforme des vaches incurables et un coût élevé des soins. C'est aussi la première cause de consommation d'antibiotiques avec deux traitements par vache et par an en moyenne, et la première source de pollution du lait par des antibactériens (Durel et *al.*, 2004 ; Serieys, 2004).

Les mammites représentent par conséquent un coût économique très important. La moitié de ce coût est due à des pertes directes : baisse de production laitière, réformes des vaches atteintes et incurables, lait écarté et frais vétérinaires. L'autre moitié est liée à des coûts indirects comme l'hébergement et l'alimentation des bêtes atteintes, les pénalités de paiement et le remboursement des dettes pour les jeunes éleveurs ou la perte de temps pendant la traite estimée à 4 heures par mammite. Les mammites font l'objet d'une consommation importante d'antibiotiques pour leur traitement (en lactation et au tarissement) mais aussi leur prévention (au tarissement).

Actuellement toutes les équipes de recherches versées dans la filière lait s'organisent pour améliorer les plans de lutte contre les mammites et leur prévention afin de réduire les quantités d'antibiotiques utilisés et de limiter l'antibiorésistance.

Problématique : Est-ce que l'état de salubrité des fermes laitières peut avoir une influence sur l'apparition des mammites ?

Hypothèse : Le manque d'hygiène provoque l'apparition des mammites.

Introduction

Pour atteindre l'objectif visé par notre recherche soit l'isolement et la caractérisation des bactéries responsables des mammites chez les bovins nous avons réparti notre travail en cinq parties.

Après une première partie consacrée à des généralités sur les bovins, les races typiques existantes en Algérie, la nature et la qualité des rations fourragères, les lieux d'hébergement et le suivi sanitaire, nous exposeront en détail l'organe mamelle, sa structure et son fonctionnement. Nous compléterons ce chapitre par une définition du lait, sa flore et les sources de contamination.

Le deuxième chapitre comportera une étude bibliographique sur les mammites bovines, la définition, la classification et les origines.

Dans le troisième chapitre nous présenterons les méthodes de diagnostic des infections mammaires.

Le quatrième chapitre est consacré au matériel utilisé et aux méthodes d'analyse bactériologiques sur les mammites.

Dans le cinquième chapitre nous présenterons les résultats obtenues dans la pratique et nous terminerons enfin par une discussion des résultats pratiques et par une conclusion.



Chapitre I
Généralités sur les bovins

1. Les races bovines existantes en Algérie : locales et importées

1.1. Les races exploitées :

En Algérie, la composition du troupeau a fortement changé avec l'introduction, depuis 1970, des races Pie-Noire, Pie-Rouge et Tarentaise. Les croisements, souvent anarchiques, et l'insémination artificielle à base de semences importées ont fortement réduit le sang de races locales qui ne subsistent en mélange que dans les régions marginales (montagnes, élevage bovin en extensif) (Abdelguerfi, 1997; Guerra, 2008).

Le cheptel bovin est constitué principalement de trois races : les races locales, les races hautes productrices et les races améliorées ou mixte (Bendiab, 2012).

1.1.1. Les races locales :

Les races locales représentées par la brune de l'Atlas (figure n° 1), se trouvent dans les zones montagneuses et le nord de l'Algérie. Comparativement aux races importées, les races locales sont caractérisées par l'adaptation aux conditions difficiles du milieu. En effet, elles sont adaptées à la marche en terrains difficiles, aux variations des régimes alimentaires, à la résistance à la sous-alimentation et aux maladies (Yakhlef, 1989; Eddebarh, 1989).

La brune de l'Atlas est la race locale la plus ancienne, elle est présente en Algérie depuis l'Antiquité. Sa robe est grise, fauve ou brune, rehaussée de noir. C'est une vache de petite taille aux jambes fines, parfaitement adaptée aux climats arides et facile à nourrir. De tous temps, son rôle fut essentiel auprès des populations : animal de trait, fournissant cuir et viande (la chair de ses veaux est réputée), elle produit certes seulement 4 à 5 litres par jour, de lait, mais la qualité de ce dernier est incontestable par sa richesse en matières grasses (Guerra, 2008).

On trouve encore ces vaches de race pure qui se répartissent en quatre rameaux principaux :

- La chélifienne, caractérisée par un pelage fauve, vit dans les monts du Dahra.
- La Sétifienne, à pelage brun foncé qui s'adapte bien aux conditions rustiques est localisée dans les monts des Babors.
- La Guelmoise, à pelage gris foncé, que l'on trouve dans les régions de Guelma et de Jijel. Elle compose la majorité du cheptel bovin algérien vivant en zone forestière.
- La Cheurfa, à pelage gris clair, qui vit en bordure des forêts, dans la région de Guelma et sur les zones lacustres de la région de Annaba (Nadjraoui, 2001).

De la même famille, il existe également, en plus petit nombre, *la Djerba*, brun foncé, qui peuple la région de Biskra, ainsi que la blanche *kabyle* (blanc) et *la Chaouia*, proches parentes de la Guelmoise et de la Cheurfa.



Fig.1 : La race locale brune de l'atlas (Bendiab, 2012).

1.1.2. Les races hautes productrices :

A partir des années 1970, l'Algérie, dans le souci d'améliorer la production de lait, a importé de nombreuses génisses de races réputées pour leur productivité : en tête, la Pie-noire, ou plus exactement la Prim'Holstein (figure n° 2), originaire du nord de l'Europe, viennent ensuite la Pie-rouge de l'Est et la Pie rouge Montbéliarde (figure n° 3), en effectif plus réduit, auxquelles s'ajoutent depuis peu la Fleckvieh (figure n° 4), originaire de Suisse et enfin la tarentaise, une race peut-être issue de vaches africaines qui s'est répandue en France, et particulièrement adaptée au climat de montagne (Guerra, 2008).



Fig. 2 : La race Holstein (Bendiab, 2012).



Fig. 3 : La race pie rouge Montbéliard (Bendiab, 2012).



Fig. 4 : La race Fleckvieh (Bendiab, 2012).

1.1.3. Les races améliorées ou mixtes :

Elles sont issues de multiples croisements entre la race locale et les différentes races importées pour l'amélioration de la production, ces races importées ont un potentiel génétique élevé mais leurs performances se trouvent diminuées par rapport à leurs pays d'origine. Les races bovines améliorées sont représentées par la Frisonne Hollandaise Pie noire, très bonne laitière, très répandue dans les régions littorales. Elle constitue 66% de l'effectif des races améliorées. La Frisonne Française Pie noire est également très répandue et bonne laitière. La Pie rouge de l'Est et la Pie rouge Montbéliarde ont un effectif plus réduit (Nadjraoui, 2001).

1.1.4. Un cheptel très diversifié :

Les races locales « brunes de l'Atlas » réunissent quant à elles 34 % du total, soit environ 330.000 têtes.

Les races sélectionnées qui ont été importées représentent aujourd'hui environ 300 000 têtes, sur un total de 950.000 vaches élevées en Algérie (chiffres 2011), soit 28 %. Elles sont dites « bovins laitiers modernes »

Mais à ces races précédemment citées, il faut encore ajouter celles qui ont été croisées ou métissées (races améliorées) pour bénéficier à la fois des qualités des races locales et des rendements laitiers des races étrangères. C'est le cas du dernier tiers du cheptel, avec 320.000 têtes.

Géographiquement, notons que la moitié de l'élevage bovin de races locales et races croisées se trouve dans un rectangle du Nord Est du pays qui comprend 8 wilayates : Tarf, Annaba, Skikda, Jijel, Souk Ahras, Guelma, Mila, Sétif (Guerra, 2008).

➤ **Les chiffres clé :**

- 950 000 vaches
 - 215 000 éleveurs
- 1 860 000 tonnes de lait (sur un total de 2, 5 millions de tonnes comprenant également les laits de chèvres, de chammelles et de brebis) (Guerra, 2008).

2. L'alimentation (nature, quantité et qualité) :**2.1. Alimentation des vaches laitières en Algérie :**

L'alimentation de la vache laitière est différente d'un type d'élevage à un autre et même d'une exploitation à une autre selon la nature des ressources alimentaires disponibles, selon la région, et aussi selon la saison. En effet, on distingue deux périodes qui déterminent le régime alimentaire pour les vaches laitières :

- La période de stabulation durant l'hiver : les animaux reçoivent la paille de céréales, le foin de prairie ou d'avoine comme ration de base. Les quantités distribuées sont variables d'une exploitation à l'autre et plus importantes par rapport aux autres saisons. En plus du fourrage grossier, les vaches reçoivent des quantités de concentré à l'étable comme complémententation tout le long de l'année. Les quantités distribuées de

concentré sont variables en fonction de la saison et selon l'exploitation. En effet, elles sont en moyenne de 2,17 kg / vache / jour avec un maximum de 12 kg / vache / jour. Les concentrés utilisés sont soit simples (son de blé), soit composés essentiellement de son de blé, d'orge, de soja et de maïs avec ou sans consommation de matière verte.

- La période de pâturage des prairies et des jachères au printemps, des chaumes en été et des repousses d'herbes en automne : durant cette période qui s'étale du mois de Mars jusqu'à Septembre en général, les vaches reçoivent des quantités très faibles de fourrage grossier ou ne reçoivent plus auprès de quelques unités. Généralement la ration est basée sur l'herbe de pâturage au printemps et les chaumes en été. Les fourrages verts font partie de l'alimentation des vaches durant cette période au sein des exploitations ayant un potentiel fourrager et des périmètres irrigués. Pour les cultures estivales, le sorgho fait partie de la ration de base durant la période allant du mois de Juillet au mois de Septembre. Alors que, le maïs contribue à la ration de base aux mois de Juillet et d'Août. Le concentré est distribué à l'étable comme aliment complémentaire.

Chez tous les éleveurs enquêtés, l'abreuvement des animaux se fait une seule fois par jour pendant les périodes hivernales, et deux à trois fois pendant les périodes chaudes à partir des eaux souterraines ou superficielles.

Il faut noter que la conduite de l'alimentation des vaches des exploitations est différente d'un type d'élevage à un autre. En effet, l'alimentation chez les exploitants n'ayant pas de surfaces fourragères est basée sur la paille comme fourrage grossier distribué tout le long de l'année et le pâturage des jachères au printemps et des chaumes en été.

Par contre, ceux qui possèdent des surfaces réservées aux fourragères, utilisent les fourrages verts dans le rationnement des bêtes. L'alimentation en vert utilisée est l'orge en vert et l'herbe de prairie et de la jachère.

Tandis que pour d'autres exploitations, l'alimentation en vert est basée sur l'herbe de la jachère, l'orge en vert exploité au printemps et les fourrages estivaux (sorgho et maïs).

La plupart des documents que nous avons consultés comme les thèses et les travaux de recherches dans le domaine d'alimentation des élevages bovins ne précisent pas exactement la qualité et la quantité des rations alimentaires distribuées aux vaches laitières. Les données

recueillies lors des enquêtes de terrain étant en général fausses, les éleveurs ne travaillant pas sur des bases scientifiques et la conduite d'une alimentation rationnelle n'étant jamais respectée, c'est le constat que nous avons fait personnellement lors des visites effectuées dans quelques fermes de la région de Mostaganem.

Nous présentons un extrait sur une conduite d'alimentation spécifique aux vaches laitières qui repose sur des bases scientifiques, tiré à partir du document 'Guide d'alimentation des vaches laitières (Guerra, 2008).

2.2. Guide d'alimentation des vaches laitières :

La production de lait d'une vache laitière dépend de quatre principaux facteurs :

a) le potentiel génétique, b) le programme d'alimentation, c) la conduite du troupeau, et d) la santé. Alors que le potentiel génétique des vaches s'améliore constamment, nous devons perfectionner l'alimentation et la conduite du troupeau pour permettre à chacune de produire à la mesure de ses aptitudes héréditaires. Un bon programme d'alimentation pour vaches laitières doit indiquer les aliments qui sont appropriés, les quantités nécessaires, ainsi que la manière et le moment de les servir (Wheeler, 1993).

2.2.1. Consommation de matière sèche (MS) :

Amener la vache à consommer de grandes quantités d'aliments est la clé d'une production de lait abondante et efficace. En choisissant les aliments on doit viser à assurer le maximum de consommation. Tous les éléments nutritifs (sauf l'eau) requis pour la production de lait se trouvent dans la matière sèche (MS) des aliments. Une forte consommation de matière sèche se traduit par un grand apport d'éléments nutritifs et une haute production laitière.

Le tableau 1 indique le maximum de MS totale (fourrage et mélange de concentrés) qu'une vache laitière peut consommer dans la seconde moitié de sa lactation. Dans ce tableau, la MS totale est exprimée en pourcentage du poids vif de la vache et en kg par jour. Une vache de 550 kg donnant 30 kg de lait peut consommer 3,7 % de son poids vif en MS chaque jour, soit à peu près 20,4 kg. Une plus grosse vache (650 kg) ayant une production laitière similaire ne peut consommer que 3,4 % de son poids en MS (22,1 kg par jour). Des vaches plus grosses à production laitière supérieure peuvent consommer davantage de MS alimentaire (Wheeler, 1993).

Tableau 1 : Ingestion de matière sèche par vache en seconde moitié de lactation (% de poids vif et kg par jour) (Wheeler, 1993).

Production Laitière (Kg)	Poids vif de la vache (Kg)					
	450		550		650	
	%	Kg	%	Kg	%	Kg
10	2,6	11,7	2,3	12,7	2,1	13,7
20	3,4	15,3	3,0	16,5	2,8	18,2
30	4,2	18,9	3,7	20,4	3,4	22,1
40	5,0	22,5	4,3	23,7	3,8	24,7
50	5,6	25,2	5,0	27,5	4,4	28,6

Dans le cas de vaches en début de lactation, les valeurs du tableau 1 peuvent être réduites d'au plus 18 %, les vaches ayant moins d'appétit en début de lactation. En outre, toute difficulté au vêlage, la fièvre vitulaire, la rétention placentaire et la torsion d'estomac (volvulus) sont autant de facteurs qui font chuter la consommation de MS. Chez la plupart des vaches, la consommation de MS augmente graduellement après le vêlage pour atteindre un sommet à 10 ou 12 semaines de lactation.

La teneur de la ration totale en MS devrait se situer entre 50 et 75 %. Les rations plus humides ou plus sèches limitent la consommation de MS. Quand la proportion d'ensilage est forte, on doit s'attendre à une diminution de la consommation de MS de 0,02 % du poids vif de la vache pour chaque 1 % de réduction de MS dans la ration totale.

La consommation maximale de MS dépend de l'accès en tout temps à de l'eau fraîche et propre. L'eau doit être placée dans un endroit bien éclairé, à moins de 15 mètres de l'auge. Une vache boit environ 5 L d'eau par kilogramme de lait produit (p. ex., une vache produisant 40 L de lait boit 200 L d'eau). Les vaches ressentent la soif et la faim aussitôt après la traite. Une diminution de 40 % de l'apport d'eau entraînerait donc une chute de 16 à 24 % de consommation de MS et une forte diminution de la production laitière. Par temps chaud, les vaches ont besoin de plus d'eau.

Les vaches réduisent leur consommation de MS quand la température ambiante dépasse 24 °C. La diminution est généralement attribuable à une baisse de la consommation de fourrage. Les vaches commencent à ressentir intensément le stress de chaleur quand la température dépasse 27 °C et l'humidité dépasse 80 %, ou quand la somme des deux valeurs est supérieure à 100. Pendant les très chaudes journées d'été, la consommation de MS peut subir une baisse de 15 à 20 %. Pour rehausser la consommation de MS en été, il suffit de servir au moins 60 % de la ration en soirée et de s'assurer que les aliments et l'eau sont offerts dans un endroit ombragé (Wheeler, 1993).

2.3. Hygiène et santé :

Les maladies les plus fréquentes au sein des élevages étudiés sont les maladies respiratoires et les mammites. Il existe aussi d'autres maladies telle que, les métrites, la fièvre aphteuse et les boiteries mais à des faibles intensités. En cas de maladies, les éleveurs font appel au vétérinaire pour le traitement.

La vaccination des animaux est effectuée par l'inspection vétérinaire de la direction des services agricoles. Chaque six (06) mois, cet organisme fait un prélèvement de sang et une injection de la tuberculine pour ceux qui sont adhérents au programme du PNDA, et une vaccination contre la rage et une contre la fièvre aphteuse une fois par an.

En général, les mesures d'hygiène sont rarement prises en compte dans les exploitations visitées, surtout au niveau des étables et pour le matériel utilisé (Guerra, 2008).

2.4. Hygiène et prophylaxie :

Les mesures de prévention des maladies infectieuses et les vaccinations sont montrées dans le tableau 2. Au printemps au mois de Mai, une vaccination s'effectue contre la fièvre aphteuse et la rage, des dépistages contre les parasites internes au mois de mars et des dépistages brucellose et tuberculose au mois d'Avril. La désinfection des bâtiments d'élevage est réalisée chaque année en été, avec l'eau de javel et plus le chaulage des étables au mois d'Aout (Bendiab, 2012).

Tableau 2 : Plan de prophylaxie (Bendiab, 2012).

Type de vaccination ou de traitement des maladies	Période
Dépistage interne des vaches laitières Drogage à base de Panacur contre les parasites internes	Printemps : mois de Mars
Dépistage brucellose + tuberculose	Printemps : mois d'Avril
Vaccin anti aphteux et antirabique contre la fièvre aphteuse et la rage	Printemps : mois de Mai
Nettoyage des étables des animaux avec l'eau et l'eau de javel, déparasitage externes	Eté : mois de Juillet
Chaulage des étables	Eté : mois d'Aout

3. Les mamelles :

Rappels sur l'anatomie de la mamelle et ses moyens de défenses.

3.1. Anatomie de la mamelle :

Le pis de la vache est composé de deux paires de mamelles séparées par le sillon inter mammaire, formant quatre quartiers. La division entre les quartiers avant et arrière est faite par une fine membrane conjonctive. Chaque quartier est indépendant anatomiquement des autres.

Le pis est maintenu en suspension par deux types de lames (Figure n° 5) : les lames latérales qui s'insinuent sur la tunique abdominale (elles assurent une stabilité transversale) et les lames médiales qui s'adosent deux à deux (quartiers gauches contre quartiers droits). Elles forment le ligament suspenseur du pis. De l'appareil de suspension, partent les septa qui s'enfoncent dans le parenchyme et le partagent en lobes. Il y a 12 lobes par quartier.

Ces 12 lobes par quartier induisent les 12 conduits lactifères qui convergent dans le sinus lactifère. Ce sinus permet l'accumulation entre les traites de 150 à 500 ml de lait. Chaque lobe est composé de très nombreux acini mammaires, formes de lactocytes (Figure n°6), qui synthétisent le lait. Il faut filtrer 300 litres de sang pour faire 1 litre de lait.

La mamelle est irriguée par une artère de chaque côté : l'artère honteuse externe (Figure n°7). Cette dernière se divise en 3 branches. Pour une même source artérielle, il y a 3 gros collecteurs veineux : la veine honteuse externe, la veine mammaire crâniale, la veine

honteuse interne. La veine mammaire crâniale draine le pis et emmène le sang très loin dans la veine thoracique interne. A la base du pis, il y a un cercle veineux que l'on qualifie de complet. Les collecteurs sont anastomoses. Ces nombreux collecteurs veineux permettent d'avoir toujours une bonne irrigation en cas d'écrasement d'une des veines quand la vache est couchée (Angoujard, 2015).

La mamelle possède aussi un système lymphatique. La lymphe transporte les déchets à l'extérieur de la glande et permet un afflux important de polynucléaires neutrophiles. La lymphe passe par les nœuds lymphatiques rétro mammaires puis est emmenée vers le bassin. Lorsque la lymphe est bloquée dans la mamelle, un œdème se forme. C'est le cas au vêlage pour certaines génisses quand la présence d'une trop grande quantité de lait comprime les vaisseaux lymphatiques (Degueurce, 2004 ; Crevier-Denoix, 2010).

La mamelle est innervée par les 4 premières paires de nerfs lombaires. Le nerf majeur du pis est le nerf génito-fémoral.

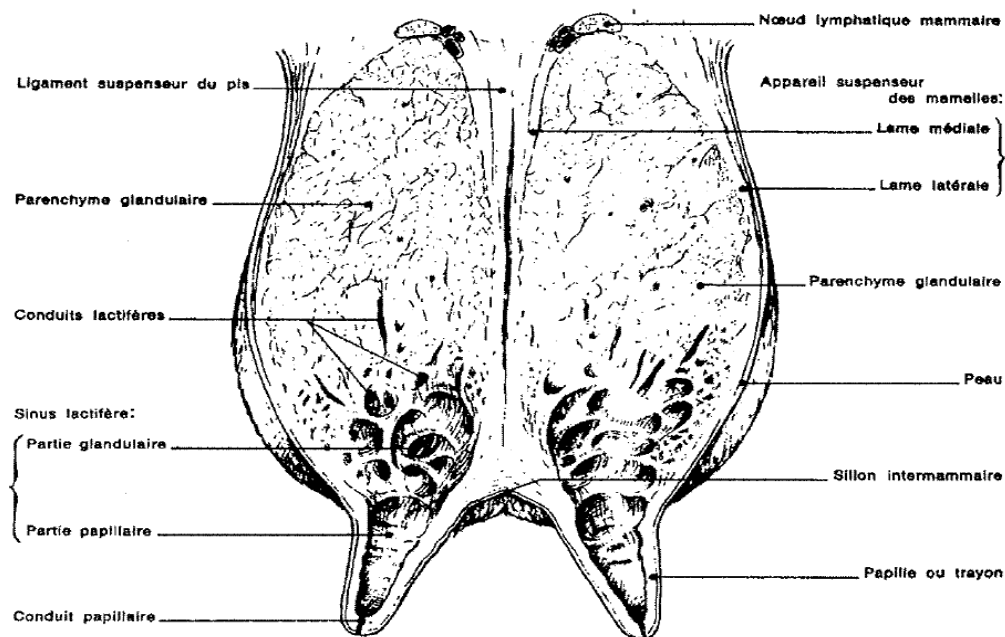


Fig.5 : Conformation intérieure des mamelles de la vache, coupe sagittale passant par les quartiers gauches (Barone, 1968).

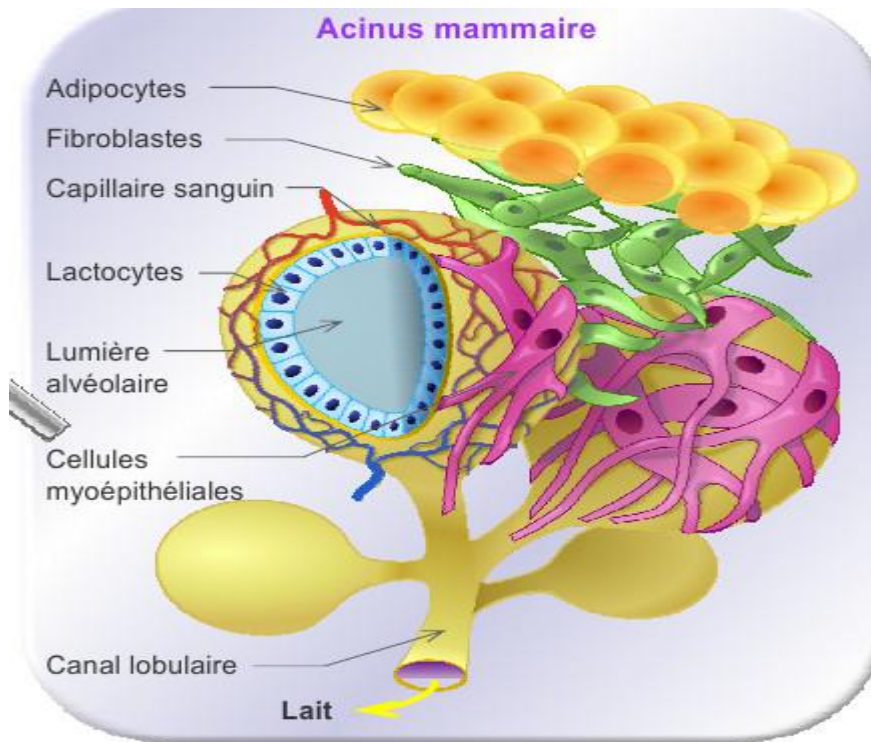


Fig. 6 : Acinus mammaire (Constant, 2014).

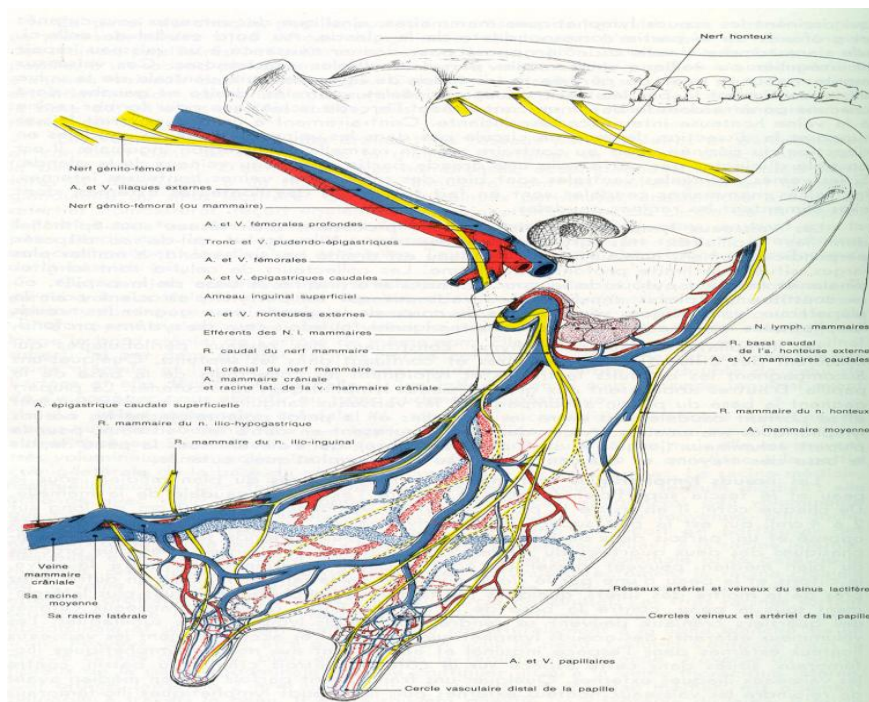


Fig.7 : Innervation et irrigation artérielle et veineuse de la mamelle, coupe sagittale (A : artère, V : veine, R : rameau, N : nœud) (Barone, 1968).

La mamelle des bovins est constituée de quatre quartiers indépendants. Ils contiennent les alvéoles glandulaires ou acini mammaires, qui, formées de lactocytes, synthétisent le lait.

Les alvéoles sont entourées par un tissu parenchymateux, et sont reliées à la citerne de la glande, d'un volume moyen de 400 ml, via les tubules et les canaux galactophores (figures n°8 et 9).

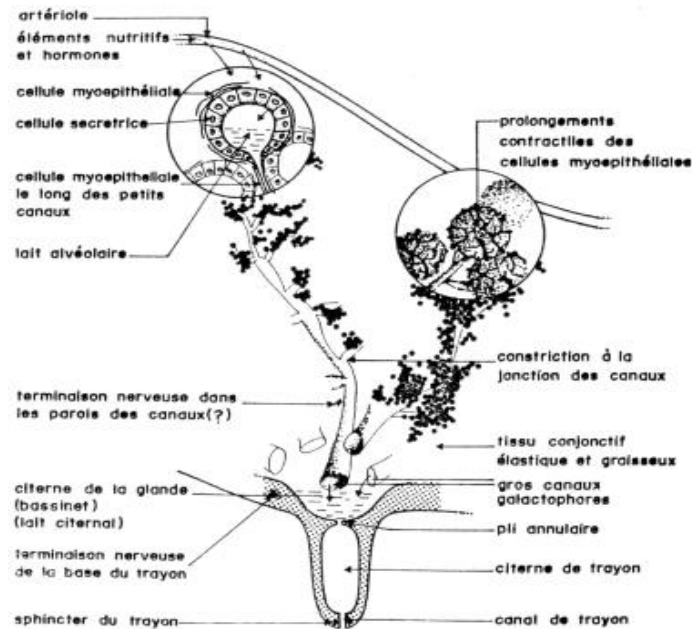


Fig.8 : Schéma de la structure de la mamelle des bovins (Gandon, 2010).

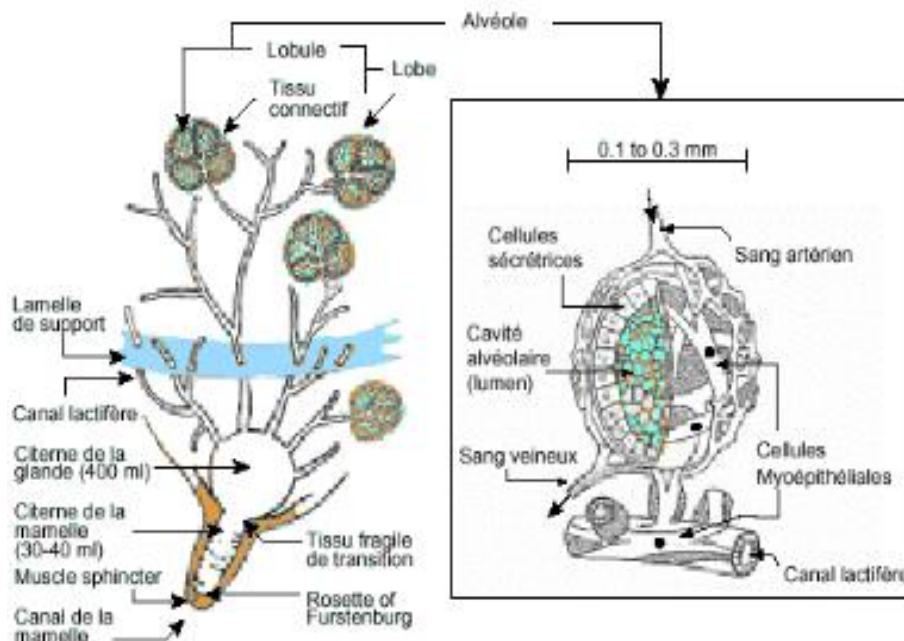


Fig.9 : Les cellules sécrétrices (cellules alvéolaires) et les canaux forment le système sécréteur de la glande mammaire (Michel et Wattiaux, 2000).

3.2. Trayon :

Chaque quartier se termine par un trayon. Il se compose d'une citerne du trayon (partie glandulaire du sinus lactifère) en communication avec la citerne de la glande (partie papillaire du sinus lactifère) *via* le relief annulaire. A son extrémité se situe le conduit papillaire ou canal du trayon (Figure n°10).

La muqueuse du trayon est plissée et contient des fibres musculaires lisses (qui participent à l'excrétion du lait). L'ostium papillaire conduit au canal du trayon. Il mesure 1 cm de long. A l'entrée du canal, les plis de la muqueuse vont se concentrer et former la rosette de Furstenberg qui est un filtre passif pour les agents pathogènes. A l'extrémité du canal, un muscle lisse circulaire formant un sphincter permet la fermeture de celui-ci (Degueurce, 2004 ; Crevier-Denoix, 2010).

L'extrémité distale du canal du trayon est caractérisée par la présence d'un muscle circulaire lisse formant un sphincter. Lorsque celui-ci se resserre les replis du canal du trayon s'imbriquent les uns dans les autres pour en obstruer l'ouverture (figure n° 11,12 et 13).

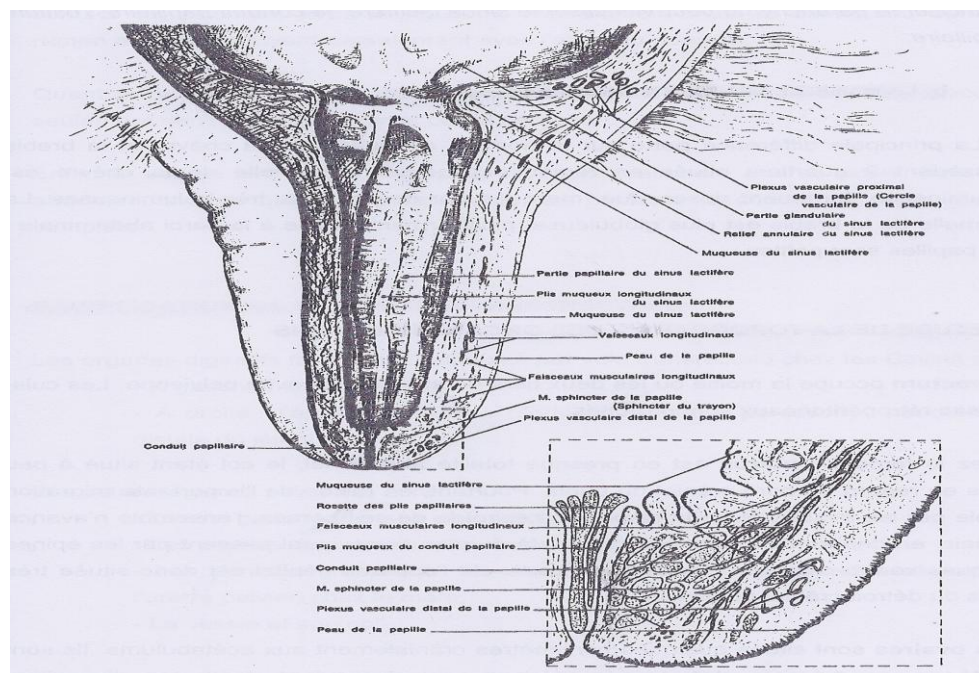


Fig.10 : Conformation et structure du trayon chez la vache (Barone, 1968).

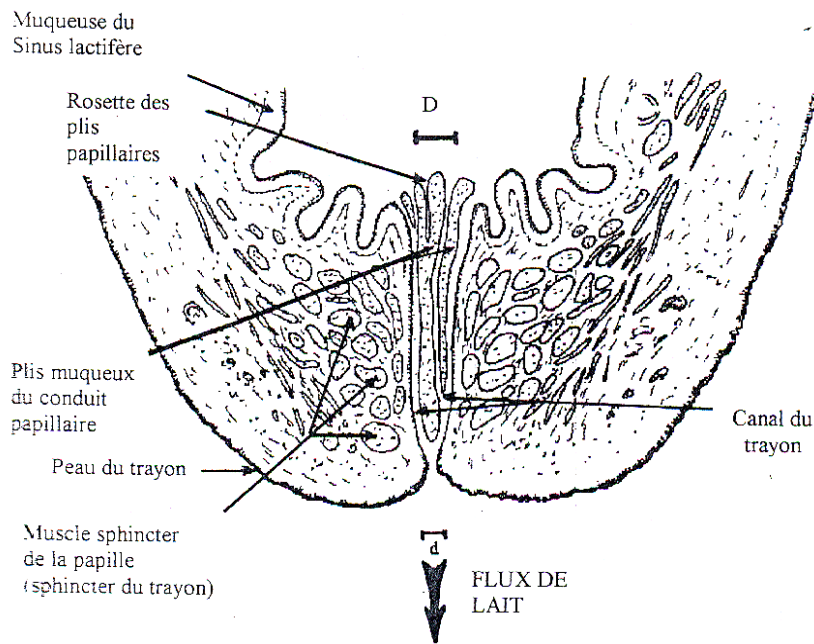


Fig.11 : Coupe longitudinale de l'extrémité du trayon chez la vache (Gandon, 2010).



Fig.12 : Coupe d'un trayon : le canal du trayon est étroit et court, il occupe uniquement l'extrémité du trayon, ce qui le rend très fragile (Remy, 2010).



Fig.13 : La peau du trayon : elle est sans poil, ce qui facilite son nettoyage mais la rend aussi plus sensible aux traumatismes et aux agressions chimiques (Remy, 2010).

3.3. Les défenses de la mamelle :

3.3.1. Le canal du trayon :

Comme on l'a vu précédemment, l'anatomie du canal du trayon permet d'obstruer hermétiquement l'extrémité distale de la mamelle. Cette première barrière est présente en continu sauf lors de la traite et pendant 30 à 60 minutes après celle-ci, où la mamelle est particulièrement sensible aux infections. En plus de cette conformation l'épithélium du canal produit, en continu, de la kératine qui vient occuper la lumière du canal. Il a été montré qu'elle fixait les germes jusqu'à leur expulsion lors de la traite. Elle contient de plus des acides gras et des protéines, qui in vitro possèdent une activité bactériostatique voire bactéricide, mais leur rôle dans la défense de la mamelle est incertain.

Une détérioration du canal du trayon et particulièrement de son sphincter (hyperkératose) ou simplement un diamètre naturellement plus important sont des facteurs de risques reconnus de nouvelles infections ce qui montre l'importance de cette barrière passive (Remy, 2010 ; Smith, 2008).

3.3.2. Les défenses cellulaires :

Les cellules de l'immunité que l'on retrouve dans la mamelle sont les macrophages, les polynucléaires, en particulier les neutrophiles, et les lymphocytes. Cependant leurs proportions varient en fonction du statut infectieux de la mamelle, comme le montre le tableau n° 3.

Tableau 3 : Proportions de cellules de l'immunité dans la mamelle.

Cellules de l'immunité	Mamelle saine	Mamelle infectée
Polynucléaires	0 à 11%	50 à 90%
Macrophages	66 à 88%	0,2 à 2%
Lymphocytes	10 à 27 %	2,8 à 5,1%

Ainsi on s'aperçoit que les principales cellules luttant contre l'installation de l'infection sont les macrophages alors que ce sont les neutrophiles qui luttent contre l'infection une fois qu'elle est établie.

Les macrophages phagocytent les germes et présentent les anticorps aux lymphocytes T, qui vont alors sécréter des cytokines, et acquérir leurs capacités : cytotoxique et mémoire.

Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en cellules mémoires.

Les polynucléaires neutrophiles sont essentiels à l'élimination des germes. Leur réponse à l'infection peut être séparée en quatre phases : le recrutement, la phagocytose, la destruction intra-cellulaire des germes, et l'apoptose.

Une fois l'infection circonscrite, les neutrophiles subissent l'apoptose et les fragments qui en résultent sont phagocytés par les macrophages (Meunier, 1999 ; Smith, 2008).

3.3.3. Les défenses non cellulaires :

Elles comprennent les molécules à activités antimicrobiennes présentes dans la mamelle, le complément, et les immunoglobulines. Les immunoglobulines sont en faible concentration dans le lait sain, mais leur concentration augmente rapidement lors d'une infection. Elles proviennent de la synthèse dans la mamelle par les plasmocytes, et majoritairement de la circulation sanguine, ce qui est permis par l'augmentation de perméabilité des cellules épithéliales et des jonctions serrées qui les relie lors d'une inflammation. Elles ont pour fonction d'opsoniser les bactéries, de neutraliser les toxines ou de se fixer sur les récepteurs bactériens impliqués dans l'adhérence aux cellules épithéliales (Remy, 2010 ; Smith, 2008).

Le complément est présent en très faible concentration dans la mamelle mais peut jouer un rôle important de part sa précocité d'action sur les souches dites séro-sensibles, qui sont cependant assez rares parmi les germes responsables de mammites (Meunier, 1999).

Parmi les molécules à activité antimicrobienne présentes dans la mamelle, les plus importantes sont les lactoferrines (et son homologue sanguine la transferrine dont la concentration est faible dans la mamelle). Elles séquestrent le fer, ce qui inhibe la croissance des bactéries qui ont besoin de cet élément pour se multiplier comme les coliformes. Elle agit aussi en détruisant la membrane cellulaire des bactéries. On peut aussi citer le lysozyme, les lactopéroxydases (effet bactériostatique sur les streptocoques), et la xanthine qui ont aussi une activité antimicrobienne. Comme les immunoglobulines elles sont en faible concentration dans une mamelle saine, mais augmentent rapidement suite à une infection, par synthèse au niveau des cellules épithéliales. De plus dans le lait sain la présence de citrate inhibe leur activité, alors que dans le lait de mammites, beaucoup moins riche en citrate, elles retrouvent leur activité. Leur rôle est plus important durant la période sèche (tarissement) (Meunier, 1999).

3.3.4. Particularité de la période sèche :

La compréhension des changements qui ont lieu pendant la période sèche est essentielle pour expliquer l'épidémiologie des infections mammaires. En effet pendant cette

période on observe dix fois plus de nouvelles infections que lors de la lactation (figure n°14a) (Bradley et al., 2004).

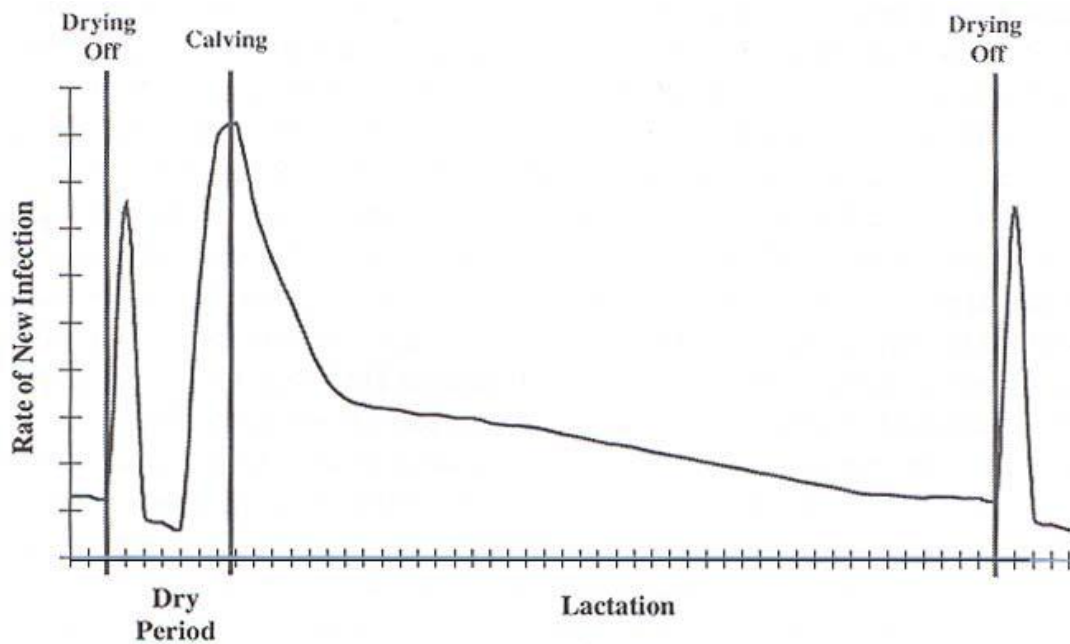


Fig.14a : Courbes schématiques de l'incidence des mammites (Bradley et al., 2004 ; Serieys et al., 1997).

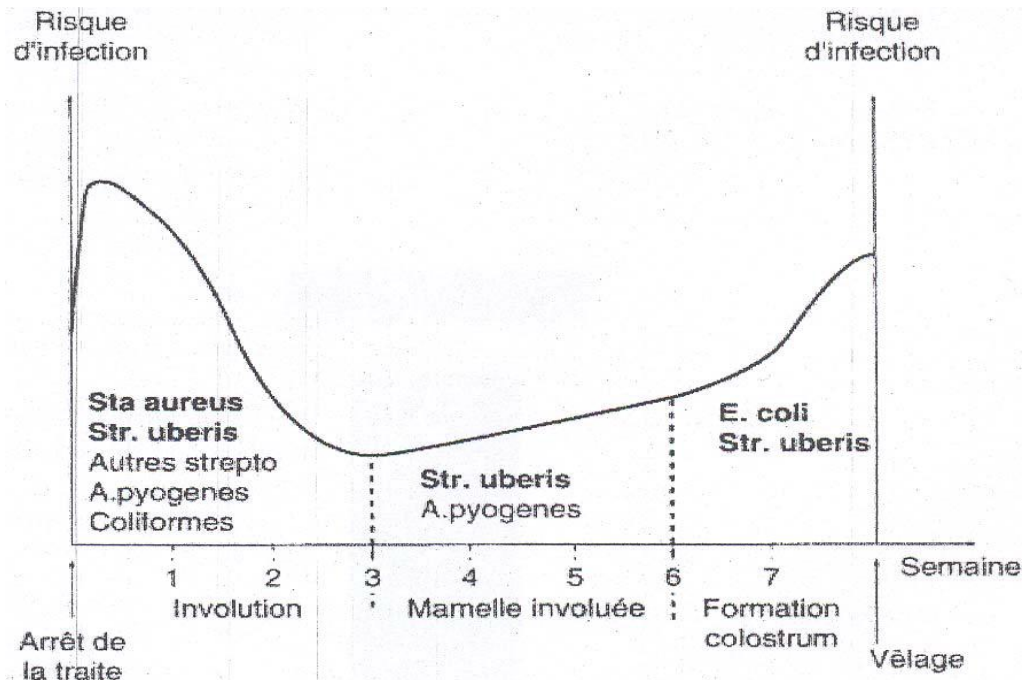


Fig.14b : Courbes schématiques de l'incidence des mammites (Bradley et al., 2004 ; Serieys et al., 1997).

Ainsi, même pendant le tarissement, on observe des variations de la sensibilité de la mamelle aux infections (figure n°14b). Ces observations sont dues à des modifications de l'importance relative des défenses de la mamelle.

En effet, le canal du trayon est scellé pendant la période sèche par un bouchon de kératine, mais ce bouchon prend plusieurs jours pour se former et disparaît sept à dix jours avant le vêlage. Les variations dans la vitesse de mise en place de ce bouchon peuvent expliquer en partie les sensibilités individuelles aux nouvelles infections. En effet à 10 jours on observe 50% des animaux qui n'ont pas encore de bouchon fonctionnel, et 5% des vaches n'auront toujours pas de bouchon à 60 jours. Il est intéressant de noter que dans les élevages biologiques, où il n'y a pas de traitement systématique au tarissement, seul 20% des trayons ont formé un bouchon de kératine. En effet il est suspecté que les corynébactéries très fréquentes en fin de lactation (prévalence de 35% en moyenne) pourraient inhiber la formation de ce bouchon.

Pendant la période sèche, on observe une diminution de la concentration en citrate ainsi qu'une augmentation de la concentration en lactoferrine (passant de 20 à 200µg/ml pendant la lactation à 10 mg/ml pendant la période sèche), qui est donc plus active que pendant la lactation (Meunier, 1999).

De par la diminution du volume des sécrétions présentes dans la mamelle durant la période sèche, on observe une augmentation de la concentration en leucocytes. De plus il y a moins de globules gras, et de caséine qui inhibent en partie l'activité des phagocytes.

Ces modifications qui augmentent la résistance à la mamelle, mettent cependant plusieurs jours à se mettre en place, alors que la traite avec son effet de flush des germes est arrêtée, ce qui explique pourquoi la phase d'involution de la mamelle est particulièrement à risque. Pendant la phase de colostrogenèse, on observe une évolution inverse avec une disparition du bouchon de kératine, une dilution des leucocytes et le retour des globules gras et de la caséine, ce qui explique pourquoi cette phase est aussi à risque.

4.Généralités sur le lait :

4.1. Définition du lait :

Selon le congrès international de la répression des fraudes alimentaires de Genève en 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 est un liquide alimentaire, opaque blanc mat, légèrement bleuté ou plus ou moins jaunâtre, à l'odeur peu marquée et au goût douceâtre, sécrété, après parturition par la glande mammaire des animaux mammifères femelles, pour nourrir leur(s) nouveau-né(s) (Mazyoyer, 2007).

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 d'élevage, 2009).

L'importance et la nature des bactéries contaminant 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).

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).

4.2. Flore originelle :

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées acténines à activité limitées dans le temps (1 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 de streptocoques lactiques et de 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 Sutherland, 2001).

Le tableau n°4 regroupe les principaux microorganismes originels du lait et leurs proportions relatives.

Tableau 4 : Flore originelle du lait cru (Vignola, 2002).

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

4.3. 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, et d'une flore pathogène dangereuse du point de vue sanitaire (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 (Tableau n°5).

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 et Vierling, 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'infection du pis : *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium 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 de la maladie du charbon, *Coxiella burnetii*, agent de la fièvre, et quelques virus (Leyral et Vierling, 2007).

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 (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks) (Leyral et Vierling, 2007).

Le tableau n° 5 représente les sources de contamination du lait cru.

Le tableau n° 6 représente les niveaux et les sources de contamination du lait chez les bovins.

Tableau 5 : Germes contaminant le 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
Entérobactéries	Plantes, fèces, eaux usées	Certaines espèces
Pseudomonas	Eau, sol (très répandu)	Oui
Alcaligènes, Flavobacterium, etc...	Eau, sol (très répandu)	Oui
Levures	Sol, plantes, résidus de lait (très répandu)	Oui

Tableau 6 : Sources et niveaux de contamination du lait (Crema, 2003).

Sources de contamination	Normal	Anormal
Pis	<100 germes/ml	10 ⁵ et plus germes/ml
Environnement	1000 à 5000 germes/ml	10 ⁴ et plus germes /ml
Ustensiles à lait	1000 à 30.000 germes/ml	10 ⁵ et plus germes/ml
Refroidissement et durée de stockage	Pas d'augmentation significative	5x10 ⁵ et plus germes/ml



Chapitre II
Les différents types
de mammites bovines

1. Définition d'une mammite :

Une mammite est une inflammation qui touche un ou plusieurs quartiers de la mamelle de la vache, elle est provoquée généralement par une infection bactérienne. Les mammites peuvent aussi être causées par des levures comme le *Candida*, des algues microscopiques, elles peuvent aussi apparaître suite à un traumatisme de la mamelle, ou encore suite à des désordres physiologiques, mais ces derniers cas sont beaucoup plus rares. L'infection mammaire peut prendre diverses formes suivant qu'elle soit associée ou non à des signes cliniques : on distingue les mammites cliniques associées à des symptômes inflammatoires et les infections sub-cliniques pour lesquelles les symptômes n'apparaissent pas (Gedilaghine,2005).

2. Différents types de mammites :

2.1. Les mammites cliniques :

Ce sont des infections mammaires avec la présence de symptômes fonctionnels et locaux : on observe une modification du lait dans son aspect, sa texture et dans la quantité produite, ainsi qu'une inflammation du ou des quartiers atteints avec rougeur, tuméfaction, chaleur et douleur.

Les ganglions rétro-mammaires peuvent être hypertrophiés, on parle alors de mammite aigue. Dans certains cas, des symptômes généraux liés à l'intoxication et une bactériémie précoce s'ajoutent aux précédents, on parle de mammite suraigüe (François et Debreil, 2008).

2.1.1. Les mammites suraiguës :

Elles apparaissent brutalement et évoluent rapidement vers des symptômes de gravité majeures. Pour ce genre de mammites on récupère, lors des traites, un lait généralement aqueux de couleur jaunâtre à rouge foncé, voire purulent et très diminué en quantité.

On remarque que le quartier infecté est souvent congestionné et chaud mais parfois c'est l'inverse, il est totalement flasque et froid. L'état général du bovin est fortement altéré avec état de choc, polypnée, hyperthermie ou hypothermie, déshydratation, in ruminant, évoluant couramment vers le décubitus et la mort de l'animal (François et Debreil, 2008).

On distingue deux formes de mammites suraiguës :

➤ **Mammites dites colibacillaires :**

Ce sont les mammites suraiguës les plus observées. Elles sont dites colibacillaires car souvent causées par une infection à entérobactéries.

La vache est soit debout mais choquée, dans un état d'hyperthermie, de déshydratation, de tachypnée, ou de tachycardie avec parfois des diarrhées plus ou moins

aqueuses, soit en décubitus (corps allongé à l'horizontale) avec normo thermie ou hypothermie qui est le résultat de l'état de choc (figure n° 15) provoqué par les endotoxines bactériennes et une bactériémie. La mamelle ne présente pas toujours de signes locaux à part la modification de la sécrétion lactée, mais parfois cette dernière peut être retardée par rapport aux symptômes généraux. Dans certains cas, le quartier est flasque et mou et ne produit plus de lait (François et Debreil, 2008).



Fig.15 : Vache choquée au cours d'une mammite gangréneuse (Remy, 2010).

➤ **Mammites gangréneuses :**

Ce sont des mammites avec une très forte inflammation du quartier, suivie d'une nécrose (dégât cellulaire) de celui-ci. Le trayon et le quartier deviennent bleutés, noirâtres et froids. Le lait est en faible quantité de couleur rouge foncé à café et contient des gaz d'odeur nauséabonde. Sans traitement, l'évolution vers la mort de l'animal est inévitable. Dans tous les cas, le quartier atteint part en lambeaux durant plusieurs semaines et ne produira plus de lait. *Staphylococcus aureus* et les germes anaérobies (*Clostridium spp*) sont à l'origine de ce type d'infection (François et Debreil, 2008).

2.1.2. Les mammites aiguës :

Ce sont les mammites les plus courantes, elles sont caractérisées par une inflammation du quartier plus ou moins marquée, et une sécrétion de lait modifiée avec présence de petites portions durcies ou caillées de sang ou de lait, les grumeaux. Une hyperthermie (*élévation locale ou générale de la température du corps au-dessus de la valeur normale*) n'est pas systématique. L'évolution est plus lente, et en l'absence de traitement, une chronicité apparaît

avec enkystement des bactéries dans le parenchyme mammaire. On rencontre toutes les espèces bactériennes responsables d'infections mammaires lors d'isolement (François et Debreil, 2008).

2.1.3. Les mammites chroniques :

Elles sont secondaires à une mammitte aigue. La mamelle est modérément enflammée et évolue vers la fibrose (la fibrose survient à la suite d'une destruction substantielle des tissus ou lorsqu'une inflammation a lieu à un endroit où les tissus ne se régénèrent pas, la fibrose est la transformation fibreuse de certains tissus à l'origine d'une augmentation du tissu conjonctif (tissu de soutien et de remplissage)). Elle devient atrophique (qui s'accompagne d'une diminution de volume) et présente des zones d'induration (dures) à la palpation.

L'évolution est lente vers un tarissement du quartier. Dans certains cas le quartier reste inflammatoire, dur et chaud avec peu ou pas de sécrétion lactée. Cette dernière présente souvent deux phases : une plus ou moins aqueuse et l'autre, du pus en amas obstruant le canal du trayon. Le quartier n'est alors plus qu'un vaste abcès. La perte du quartier est inévitable. Tous les germes responsables de mammites peuvent être rencontrés avec une prédominance des Gram positifs (François et Debreil, 2008).

2.2. Les mammites sub-cliniques :

Ce sont des infections mammaires sans symptômes apparents. Le lait n'est pas modifié mais on peut observer toutefois la présence de quelques grumeaux en début de traite, lors des premiers jets. On n'observe aucune inflammation du quartier. Les germes responsables sont essentiellement Gram positifs, mais on peut aussi rencontrer des mammites sub-cliniques à entérobactéries. Ces mammites sont détectées par les examens complémentaires, et surtout par les résultats des comptages cellulaires individuels fournis par la laiterie ou le contrôle laitier. Elles peuvent résulter d'une infection primaire ou être secondaires à une mammitte aigue non totalement guérie d'un point de vue bactériologique. Elles sont beaucoup plus fréquentes que les infections cliniques, plus graves car difficilement détectables (François et Debreil, 2008).

2.3. Les mammites d'été :

Ces mammites surviennent le plus souvent de juin à septembre au pâturage. Elles touchent fréquemment les vaches tarées et les génisses, même si le terme de leur gestation est éloigné. Les vaches allaitantes sont également concernées. Les animaux atteints présentent un trayon gonflé et le quartier devient rapidement dur et douloureux. Les sécrétions lactées prennent une consistance épaisse, purulente et dégagent une odeur nauséabonde. Des abcès se développent dans les quartiers atteints et peuvent percer à travers la peau ou vers d'autres

quartiers. Il est possible que la mammite ne devienne apparente qu'après la mise-bas suivante. Dans les cas les plus graves, un avortement peut accompagner le tableau clinique (François et Debreil, 2008).

Le plus souvent, la mammite est due à une bactérie appelée *Arcanobacterium pyogenes*. L'infection est véhiculée par des mouches (figure n°16 (a) et (b)) qui se posent sur les trayons et transmettent le germe aux quartiers. Les plaies sur les quartiers ou les trayons constituent un facteur favorisant.



Fig. 16 (a) : Les mouches véhiculent toutes sortes de germes pathogènes, tels que *Trueperella pyogenes* qui est responsable de la mammite d'été (Von Tavel, 2015).



Fig. 16 (b) : *Musca autumnalis*, cette mouche est accusée de transmettre *Staphylococcus aureus* aux génisses (Remy, 2010).

3. Caractéristiques pathologiques des mammites :

Les caractéristiques pathologiques sont résumées dans le tableau n°7.

Tableau 7 : Caractéristiques des différents types de mammites (Duval, 2008).

Type de mammite	Symptômes caractéristiques
Clinique aiguë	Inflammation de la mamelle, fièvre de plus de 39C°, sujet faible et déprimé, manque d'appétit. Rendement laitier baisse drastiquement. Suit souvent le vêlage et, de façon moins grave, le tarissement.
Clinique suraiguë	Quartier enflé, chaud, rouge, douloureux. Le lait passe difficilement. Fièvre de plus de 41C°, la vache n'a pas d'appétit, frissonne et perd du poids rapidement. La lactation est souvent interrompue.
Clinique subaiguë	Aucun changement apparent du pis, présence de caillots dans le lait, surtout dans les premiers jets. Sujet bien portant.
Infra clinique	Aucun symptôme. 15 à 40 cas pour un cas clinique. Le lait est d'apparence normale. Le seul changement est la détection de l'agent pathogène à l'analyse et l'accroissement du compte somatique. Surtout causée par <i>Staphylococcus aureus</i> .
Chronique	Attaques cliniques répétées mais peu fortes, généralement sans fièvre. Lait grumeleux, quartiers enflés parfois. Le quartier peut devenir dur (indurations fibreuses). Les traitements antibiotiques ne fonctionnent souvent pas.
Gangréneuse	Le quartier affecté est bleu et froid au toucher. La décoloration progresse du bas vers le haut. Les parties nécrotiques tombent du corps. La vache en meurt souvent.
Contagieuse	Mammite provoquée par des bactéries comme <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Streptococcus agalactiae</i> , dont les vaches infectées sont la source principale.
Environnementale	Mammite provoquée par des bactéries comme les coliformes (<i>E. coli</i> , etc.), dont la source principale est un environnement contaminé le plus souvent par du fumier.

4. Origine des mammites : Etiologie des mammites bovines :

Les causes des infections mammaires sont multiples. On distingue les causes prédisposantes et les causes déterminantes.

4.1. Les causes prédisposantes :

Elles sont représentées par les facteurs intrinsèques et les facteurs extrinsèques.

4.1.1. Les facteurs intrinsèques :

a) Les facteurs anatomiques :

➤ Les grosses mamelles :

D'après Dupont (1980), les vaches laitières ayant des mamelles volumineuses ou présentant des anomalies du trayon (figures n° 17,18,19 et 20) sont plus disposées à faire des infections mammaires (Soedji, 1996).

Les mamelles pendulaires, les longs trayons, les trayons ayant un canal de diamètre très large de même que les trayons ayant perdu l'élasticité du sphincter prédisposent les animaux à faire des mammites (Poutrel, 1985).



Fig.17 : Mamelle déséquilibrée (Bouaziz, 2005)



Fig.18 : Mamelle décrochée (Bouaziz, 2005)



Fig.19 : Trayon conique (Bouaziz, 2005)

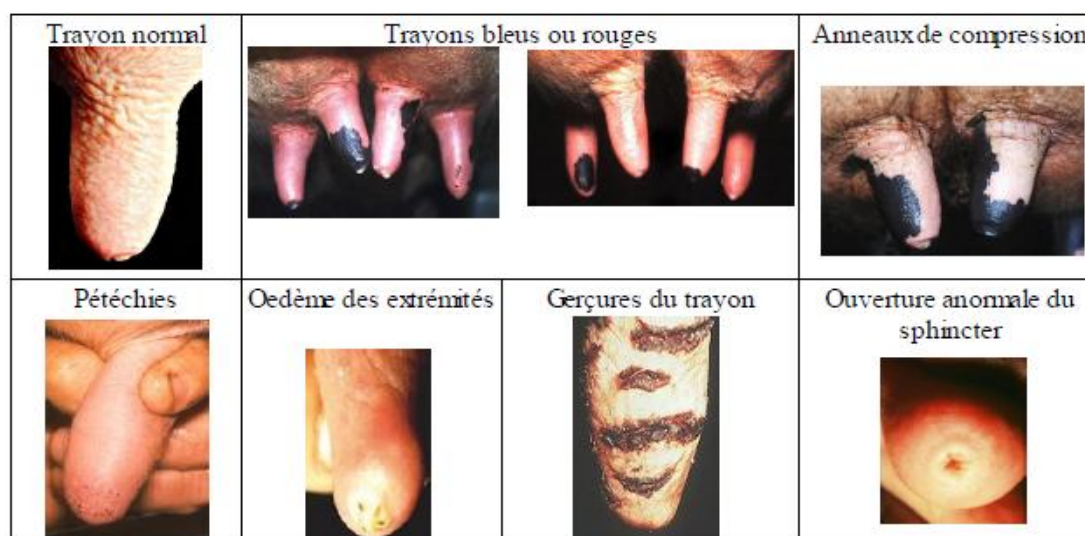


Fig. 20 : Lésions du trayon de type vasculaire (Durel *et al.*, 2011).

➤ **Les quartiers postérieurs :**

Ils sont les plus exposés aux traumatismes et aux agressions environnementaux. En conséquence, ils prédisposent la mamelle aux infections. En effet, selon Poutrel (1985), dans un élevage atteint de mammites, 60 % des cas cliniques concernent les quartiers postérieurs.

➤ **L'état général de la vache :**

D'après la Fédération Internationale de Laiterie (F.I.L.) cité par Poutrel (1985), l'infection de la mamelle par voie endogène est exceptionnelle. Cependant, l'excrétion de micro-organismes variables dans le lait sans qu'il y ait réellement mammite est parfois rencontrée ou probable dans certaines pathologies telles que brucellose, tuberculose, paratuberculose, salmonellose, chlamydie, maladies parasitaires ...

En outre, la cétose et l'acidose compromettent la réponse immunitaire et prédisposent à l'apparition de mammites (Wolter, 1992).

➤ **Les facteurs liés à la traite :**

D'après Chaffaux *et al.* (1985) et Diop (1981), la contamination des trayons pendant la traite est essentiellement due à la machine à traire et à la lavette. En effet, lorsque ces dernières sont les mêmes pour tous les animaux, elles favorisent le transfert des micro-organismes d'une vache à une autre ou d'un quartier à un autre du même animal.

D'après Dupont (1980), National Mastitis Council (1985) et Poutrel (1985), des erreurs de traite notamment une traite brutale, une traite insuffisante, une surtraite et/ou un vide trop important peuvent conduire à la destruction partielle de la kératine du canal du trayon (figures n° 21 et 22). Ces erreurs peuvent également favoriser l'impact des gouttelettes de lait chargées en bactéries.

Les animaux âgés et les animaux à traite rapide perdent l'élasticité du sphincter et ont un large diamètre du canal du trayon. En conséquence, ce canal reste ouvert même en dehors de la traite. Cela prédispose ces animaux à faire des infections mammaires (National Mastitis Council, 1985).



Fig.21 : Traite mécanique, manchon trayeur mal placé (Bouaziz, 2005).

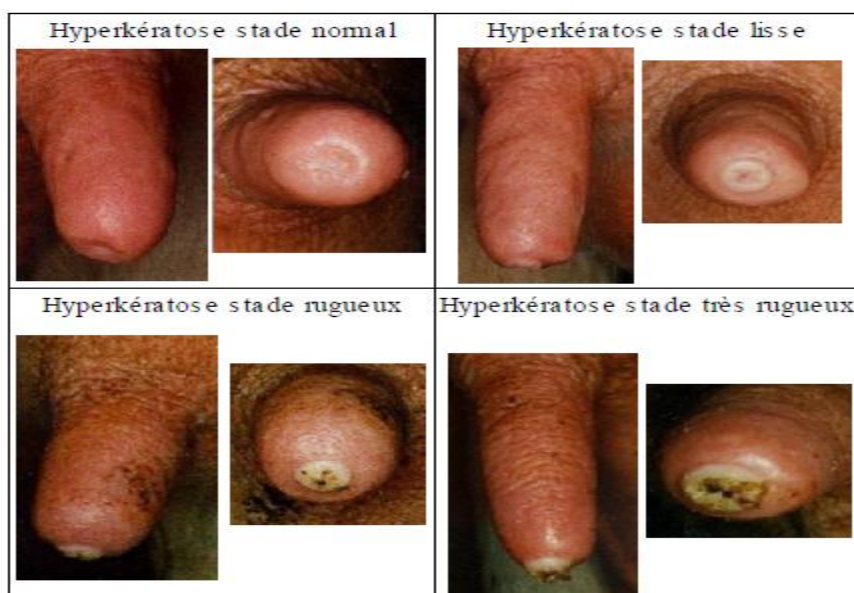


Fig.22 : Lésions du trayon de type hyperkératosique (évolution lente, 20-60 jours) (Durel *et al.*, 2011).

b) Les facteurs physiologiques**➤ La race :**

D'après Dupont (1980), les races ayant des aptitudes particulières ou sélectionnées par l'homme pour leur haut niveau de production sont prédisposées aux mammites.

➤ L'âge et le rang de lactation :

La réceptivité de la mamelle à l'infection augmente avec le nombre de lactations. En effet, la fréquence des mammites augmente avec l'âge (Dupont, 1980 ; National Mastitis Council, 1985) :

- 19 % à la première lactation ;
- 49 % à la deuxième lactation ;
- 66 % à la troisième lactation.

➤ Le stade de lactation :

Les mammites surviennent à n'importe quel stade de lactation. Cependant selon Poutrel (1985), les mammites cliniques apparaissent à la quatrième semaine de lactation alors que les mammites chroniques surviennent à la période du tarissement et au début de la lactation suivante.

4.1.2. Les facteurs extrinsèques :**a) La machine à traire :**

Elle représente une possibilité de contamination des trayons et constitue un vecteur de propagation des mammites.

Selon Bazin (1983), Diop (1981), Dupont (1980) et National Mastitis Council (1985), l'action de la machine à traire est triple :

- destruction des barrières naturelles contre l'infection (peau, sphincter, kératine du canal et rosette de Fürstenberg) ;
- diminution importante de la résistance organique par congestion mammaire, stase laiteuse et traumatisme accidentels ;
- propagation de germes d'une vache malade à une vache saine ou d'un quartier malade à un quartier sain du même animal.

b) L'habitat et l'environnement :

D'après Serieys (1985) sont particulièrement en cause le type de logement, les dimensions des stalles, des logettes ou de l'aire paillée, les systèmes d'attache en étable entravée, les sols et les séparations des stalles et des logettes. Ces différents éléments participent à l'augmentation des blessures des trayons.

Les micro-organismes qui contaminent les litières ont le plus souvent, mais non exclusivement, une origine fécale. Les plus importants sont les entérobactéries *Escherichia coli* et *Streptococcus uberis* (Baudet *Et Al.*, 1994 ; Poutrel, 1985 ; Rainard, 1985 ; Serieys, 1985).

Les excréments permettent la contamination des litières ; mais ce sont les facteurs de logement tels que la nature de la litière, l'ambiance du bâtiment, le comportement des animaux, ... qui favorisent la multiplication microbienne dans la litière (Dupont, 1980 ; Rainard, 1985).

En effet, le bâtiment par sa conception, son utilisation, son entretien détermine l'environnement physique, social et microbiologique du troupeau pendant une longue période de l'année, il joue un rôle important dans la pathologie et en l'occurrence dans les mammites (Serieys, 1985).

Selon Manton cité par Serieys (1985), pendant la stabulation, il y a d'une part une plus forte contamination microbiologique de l'environnement notamment des litières et d'autre part une incidence plus élevée des blessures des trayons (tableau n°8).

Tableau 8 : Fréquence des blessures des trayons selon le type d'étable (Serieys, 1985).

Type d'étable	Nombre d'exploitations	Nombre de vaches	P. cent de vaches avec blessures des trayons
Stabulation entravée			
* avec paille	1 149	28048	3,40
* avec grilles	706	20995	5,35
Stabulation libre			
* avec logettes	279	13 236	1,85
* avec paille	88	3454	1,09
Total ou moyenne	2222	65733	3,59

c) L'alimentation :

Le rôle de l'alimentation est très controversé. Certains mécanismes de résistance naturelle à l'infection pourraient être modifiés par l'alimentation : la synthèse des "antibiotiques internes" et celle de la substance kératinisée bactériostatique du canal du trayon seraient perturbées par une alimentation défectueuse.

En effet, d'après Dupont (1980), Poutrel (1985) et Wolter (1992), les troubles de l'équilibre nutritionnel (herbe riche en phytoestrogènes ou en azote) favorisent le passage à l'état aigu des infections mammaires latentes ou subcliniques.

Plommet et Roguinsky cités par Dupont (1980) émettent l'hypothèse suivante : l'excès d'azote inhiberait la synthèse des acides gras insaturés présents dans le revêtement interne du canal du trayon. De même, les carences ou les déséquilibres minéraux diminueraient la phagocytose.

d) L'hygiène générale :

D'après Chaffaux *et al.* (1985), Lerondelle (1985), Ralnard (1985) et Serieys (1985), une litière souillée, des déjections dans le caniveau, une humidité permanente des litières, des râteliers, des abreuvoirs et des alimenteurs divers souillés, de même que la non désinfection des locaux surtout le local de vêlage sont des conditions qui favorisent l'augmentation de la fréquence de l'infection des mamelles par les micro-organismes environnementaux à savoir les entérobactéries (*E. coli Klebsiella, Entrobacter ...*) et *Streptococcus uberis*.

Une mamelle malpropre, une main mouillée avec les crachats avant la traite (traite manuelle) et l'utilisation du même mouchoir ou gant de toilette pour nettoyer toutes les mamelles favorisent également l'apparition des mammites (Chaffaux *et al.*, 1985 ; Diop, 1981; Dupont, 1980).

4.2. Les causes déterminantes :

➤ Les germes impliqués lors de mammites :

La grande majorité des mammites bovines est d'origine infectieuse. Il existe cependant quelques rares cas de mammites traumatiques, chimiques ou physiques. L'infection de la mamelle se fait par voie exogène principalement, la voie endogène est décrite notamment pour les mycoplasmes mais est rare. Les mammites mycosiques (*Candida*) ou causées par des algues (*Prototheca*) sont très peu courantes.

On classe les espèces bactériennes responsables d'infections mammaires en deux groupes, les pathogènes majeurs et les pathogènes mineurs.

4.2.1. Les pathogènes majeurs :

Les pathogènes majeurs sont les bactéries responsables des mammites cliniques et subcliniques, et sont les plus couramment isolées. Ils regroupent les coques Gram positifs

(*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*...), les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*...) et les entérocoques, plus rares (*Enterococcus faecalis*...).

Aujourd'hui on constate la prédominance de trois pathogènes majeurs qui sont par ordre décroissant *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Dans une étude française sur 618 prélèvements de lait pour analyse bactériologique entre novembre 2005 et juillet 2007, 70 % des isolats appartiennent à seulement quatre espèces bactériennes dont les *Staphylococcus* coagulase négatifs qui sont des pathogènes mineurs, *Streptococcus uberis* représentant 25 % des isolats, *Escherichia coli* : 18 % et *Staphylococcus aureus* : 13 %. Mais d'autres bactéries peuvent être isolées comme *Arcanobacterium pyogènes*, *Pseudomonas aeruginosa*, des mycoplasmes et des bactéries anaérobies (Debreil, 2008 ; Gandon, 2010).

a) **Streptococcus agalactiae (St. agalactiae) :**

St. agalactiae est un coque Gram positif, très répandu il y a quelques dizaines d'années, mais dont la prévalence a particulièrement chuté depuis l'application du plan anglais (particulièrement l'hygiène de traite et le traitement systématique au tarissement). Il est capable d'adhérer aux cellules épithéliales mammaires, en particulier dans les canaux galactophores, où il provoque une inflammation locale conduisant (en absence de traitement) à l'obstruction de ces canaux et donc à une diminution de la production laitière avec présence de zones fibrosées dans la mamelle (ce mécanisme est commun à tous les streptocoques et même aux staphylocoques au niveau des canaux galactophores). L'infection tend à devenir chronique avec une hausse notable de la concentration cellulaire dans le lait. Le taux cellulaire est ainsi multiplié par 12,6 en moyenne (Van De Leemput ; Beurrier, 2005).

b) **Streptococcus dysgalactiae (St. dysgalactiae) :**

St. dysgalactiae est un coque Gram positif, spécifique des bovins, que l'on retrouve sur la peau, les lèvres et les muqueuses, ainsi que dans les fèces. La source principale des infections se trouve dans l'environnement, mais une transmission de vache à vache lors de la traite est aussi possible. Il est responsable de mammites cliniques aiguës sans répercussion sur l'état général, ainsi que d'une multiplication du taux cellulaire de l'ordre de 5,7 (Wolter, 1992).

c) **Streptococcus uberis (St. uberis) :**

St. uberis est un coque Gram positif, longtemps considéré comme peu invasif, mais dont la proportion lors de mammites cliniques ou subcliniques a doublé depuis 1985. Comme *St. dysgalactiae*, on le retrouve sur la peau, les muqueuses et les fèces. On a remarqué que 15% des vaches présentaient une excrétion fécale de ce germe. Ainsi il est

particulièrement présent dans les litières et les pâtures exploitées intensivement. Il est la cause à la fois de mammites cliniques et subcliniques, et induit une multiplication du taux cellulaire par 9,1 en moyenne.

Il a pour particularité de pouvoir se multiplier sur la kératine et d'être résistant à la lactoferrine, ce qui explique pourquoi il est le principal germe retrouvé lors d'infection pendant la période sèche. En effet l'infection se produit généralement dans les trois premières semaines du tarissement, puis on observe une multiplication du germe pendant la phase involuée.

Des études faisant appel à l'identification génomique des souches, ont montré que *St.uberis* pouvait évoluer selon deux pathotypes : l'un ayant pour source l'environnement (nombreuses souches impliquées), et l'autre les mamelles des vaches infectées (une seule souche responsable de toutes les infections du troupeau). Effectivement Matthews *et al.*, ont observé que certaines souches étaient capables, *in vitro*, *via* des microfilaments d'envahir les cellules épithéliales mammaires, ce qui pourrait être une piste pour expliquer ces deux pathotypes (Bradley *et al.*, 2007).

d) Staphylococcus aureus (S. aureus) :

S.aureus est un coque Gram positif, responsable principalement de mammites subcliniques, mais aussi de mammites cliniques et gangréneuses. Lors de mammites subcliniques, le taux cellulaire individuel est multiplié par 5,2 en moyenne. Dans une étude, Lam *et al.* ont observé que dans un même élevage les cas cliniques étaient dus à un à six génotypes différents, contre plusieurs dizaines lors d'infection à *Escherichia coli*, ce qui montre que lors d'une épidémie de mammites à *S. aureus*, il s'agit d'un petit nombre de souches, généralement un seul, ce qui témoigne d'une source d'infection commune, qui ne peut être que la mamelle d'une vache déjà infectée.

Il est présent sur la peau et les muqueuses, mais son réservoir principal est la mamelle des vaches infectées (à noter aussi que Roberson *et al.* ont isolé des staphylocoques dorés depuis la peau du trayeur, l'air et le matériel de traite, en plus des sites précédemment cités, allant jusqu'à conclure à la nature ubiquitaire de ce germe). Il est capable d'adhérer, voire d'envahir les cellules épithéliales mammaires, ainsi que le tissu interstitiel, et possède de nombreux moyens pour déjouer la réponse immunitaire : il peut résister à la phagocytose par les neutrophiles, produire une leucotoxine permettant à certaines souches de détruire les phagocytes ou de s'introduire au sein des leucocytes et de provoquer leur apoptose.

Quelques souches produisent une β -lactamase, les rendant résistantes à la famille des β -lactamines (moins de 30 % des souches de *S. aureus* sont résistantes aux pénicillines; une

étude de De Oliveira trouve un chiffre similaire, 35,6% de germes synthétisant une pénicillinase, mais il a aussi montré que 21,3 autres pour cent de germes sont aussi capables de synthétiser cette enzyme après induction par la pénicilline, soit au final environ 50% de *S. aureus* sont résistants aux β -lactamines), d'autres sont capables de s'organiser en biofilm les rendant inaccessibles à la réponse immunitaire et aux antibiotiques. Ces caractéristiques expliquent pourquoi les infections à *S. aureus* sont souvent persistantes et difficilement curables. En effet dans leur étude Lam *et al.* ont observé que 24,6% des vaches avaient eu plus d'une mammite, sur le même quartier avec le même germe (Van De Leemput, 2005).

e) Entérobactéries :

Cette famille comprend de nombreux genres, parmi lesquels trois sont impliqués fréquemment en pathologie mammaire : *Escherichia* (en particulier *E. coli* germe le plus fréquent de cette famille), *Klebsiella*, et *Enterobacter*. D'autres germes de cette famille peuvent aussi être à l'origine de mammites (*Serratia*, *Proteus*, et *Salmonella*) mais de façon moins fréquente.

Il s'agit de bacilles Gram négatifs, généralement à l'origine de mammites cliniques aiguës (symptômes locaux et généraux) et subaiguës (symptômes locaux uniquement). On observe dans ces cas, une guérison clinique spontanée en 2 à 3 jours, et bactériologique pour 66 % des quartiers en moins de 10 jours. Elles peuvent aussi être à l'origine, dans moins de 10% des cas, de mammites suraiguës (avec une atteinte très importante de l'état général), dites à coliformes, car un cas sur deux est dû à *E. coli*.

Lors d'une épidémie de mammites à entérobactéries, on retrouve de très nombreuses souches différentes (jusqu'à 69) dans un même élevage, ce qui montre que l'infection se fait depuis une source multiple : l'environnement, qui constitue leur réservoir principal (Poutrel, 1985 ; Van De Leemput, 2005).

Cependant Lam *et al.* ont observé que 9% des quartiers ayant présenté une mammite dans leur étude, ont eu plus d'un cas clinique dû à la même souche d'*E. coli*, signant la présence d'une infection persistante. Döpfer *et al.* ont d'ailleurs observé que certaines souches d'*E. coli* à l'origine d'infections persistantes, étaient capables de pénétrer à l'intérieur des cellules épithéliales. Mais ce type d'infection reste anecdotique, et les nouvelles infections se font depuis l'environnement et particulièrement pendant la période sèche et autour du vêlage. En effet Bradley et Green ont montré que 71 % des mammites à entérobactéries ont lieu sur des quartiers dont la même souche (utilisation de marqueurs génomiques) avait déjà été isolée au tarissement, avant ou après le vêlage. Ces observations indiquent que la bactérie a pénétré

dans la mamelle lors du tarissement, mais sans expression clinique. Les symptômes induits par ces infections ne sont apparus que tardivement durant la lactation.

Les entérobactéries sont capables de se multiplier dans un lait sain (en particulier dans la citerne du trayon), mais ils sont sensibles :

- à la phagocytose par les neutrophiles (qui, s'ils sont déjà présents, protègent la mamelle d'une nouvelle infection),
- au complément,
- à la lactoferrine du lait lors d'inflammation, ce qui explique les guérisons spontanées.

Cependant certaines souches de *Klebsiella* et d'*E. coli* présentent une capsule polysidique autour de leur paroi, ce qui leur permet d'échapper aux immunoglobulines, et les rend moins sensibles aux neutrophiles et au complément. Le pouvoir pathogène de ce germe est lié d'une part au lipopolysaccharide (LPS) libéré lors de la mort bactérienne, (pouvant survenir lors de la multiplication bactérienne, mais aussi du fait des défenses de l'organisme), à l'origine de la réaction inflammatoire et d'une endotoxémie, et d'autre part à la sécrétion d'agents cytotoxiques pour l'épithélium mammaire par *E. coli*. On observe aussi dans 30 à 40% des cas graves (mammites aiguës à suraiguës) une bactériémie. Ces infections sont caractérisées par la très forte inflammation qu'elles induisent. Ainsi la hausse du taux cellulaire est la plus importante avec ces germes : il est multiplié par 16,9 en moyenne, contre 5 à 9 fois pour les autres pathogènes majeurs.

De façon beaucoup moins fréquente on observe également des cas de mammites dues à un autre genre d'entérobactéries : *Serratia*. Les deux espèces retrouvées lors de mammites à *Serratia* sont *S. marcescens* et *S. liquefaciens*. Même si elles appartiennent au groupe des entérobactéries, elles sont à l'origine principalement de mammites subcliniques, parfois subaiguës. Ces mammites sont difficiles à traiter avec des antibiotiques, et on observe ainsi une durée moyenne de l'infection de l'ordre de 55 jours (mais certaines peuvent durer jusqu'à 10 mois). Dans les troupeaux atteints, jusqu'à 15% des vaches peuvent être infectées, ce qui entraîne une hausse notable du taux cellulaire de tank. L'infection a lieu pour 50% pendant la première moitié du tarissement, pour 30% pendant la seconde, et pour 20% en lactation. Cette spécificité peut s'expliquer par le fait que ces bactéries sont capables de capter le fer nécessaire à l'activité de la lactoferrine. Ces germes ont pour source principale l'environnement (litière et eau) (Poutrel, 1985 ; Van De Leemput, 2005).

4.2.2. Les pathogènes mineurs :

Les pathogènes mineurs ne sont normalement qu'exceptionnellement responsables de mammites cliniques mais plutôt responsables d'infections subcliniques. Ce sont surtout les *Staphylococcus* coagulase négatifs (*Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*...). Longtemps considérés comme pathogènes mineurs comme décrit dans cette classification traditionnelle, ils sont devenus des pathogènes majeurs responsables de mammites cliniques et chroniques, avec de fortes inflammations du quartier ainsi que des mammites subcliniques.

Les staphylocoques coagulase négatifs sont des germes de la flore cutanée normale. La source d'infection est en général un défaut d'hygiène au moment de la traite, où ils colonisent le canal du trayon à la faveur d'une blessure. La pathogénie est encore mal connue. Ces germes sont en général plus prévalents sur les primipares. La colonisation de la mamelle des primipares s'est réalisée bien avant le vêlage (Poutrel, 1985 ; Van De Leemput, 2005).

a) *Arcanobacterium pyogenes* :

Il s'agit d'un germe anaérobie, responsable des mammites d'été. Lors de cette pathologie il intervient en association avec d'autres germes (en particulier *Fusobacterium necrophorum*). La transmission se fait depuis le tractus génital, les lésions du trayon, de la mamelle, ou de toutes autres blessures, vers le canal du trayon via une mouche *Hydroateia irritans*. Les mammites d'été ont lieu principalement sur les génisses et les vaches tarées.

Après le canal du trayon, l'infection se propage à tout le parenchyme mammaire pour former des abcès atteignant l'ensemble du quartier. Cette infection évolue généralement soit vers la chronicité, soit vers la destruction du quartier. A noter qu'en absence de traitement on observe 50 % de mortalité (Wolter, 1992 ; Van De Leemput, 2005).

b) *Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN)* :

Ce groupe comprend de nombreuses espèces dont les plus fréquemment isolées lors de mammites sont : *S. hyicus*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. sciuri*. Il s'agit du groupe de germes le plus souvent isolé dans le lait de vaches *à priori* sans symptômes, c'est pour cette raison qu'on a l'habitude de le classer parmi les pathogènes mineurs. En effet il est responsable d'un doublement du taux cellulaire en moyenne, ce qui est assez faible en comparaison des pathogènes majeurs, et très rarement de mammites subaiguës.

Il existe de nombreuses études épidémiologiques dont certaines se contredisent. En effet ce groupe renferme de nombreux germes dont certains n'ont pas le même comportement. Ainsi il a été montré que selon la nature du germe, sa source pouvait aussi bien être la mamelle, la peau des vaches ou du trayeur ou même l'environnement.

Lors d'infections persistantes, les germes généralement rencontrés sont : *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, et *S. simulans*. Lors de mammites subcliniques, le germe le plus isolé a été *S. epidermidis*. Par contre, aucune association n'a été trouvée entre les espèces de SCN et la production laitière ou le taux cellulaire. Cependant ce germe est de plus en plus fréquemment isolé, ce qui pose la question de savoir quelle est sa place dans la pathologie mammaire (Van De Leemput, 2005).

c) Nocardia :

Nocardia asteroides est l'espèce la plus fréquemment isolée au sein du genre, mais d'autres représentants sont aussi responsables de mammites. Elle était à l'origine de cas sporadiques assez fréquents dans les années 80 mais devenue assez rare aujourd'hui. La mammite se présente sous une forme suraiguë résistante aux traitements. Elle évolue vers une fistulisation du quartier accompagnée d'un fort amaigrissement de l'animal ou la mort dans 15% des cas. La source de ces germes se trouve dans l'environnement : la litière, l'eau ou les fourrages (Schmitt et al., 2007).

d) Mycoplasma bovis :

Aucun cas de mammites à mycoplasme n'a été rapporté depuis 20 ans en France, mais elles sont assez fréquentes dans d'autres pays (USA, Canada, Royaume-Uni, Danemark...) (61). Il s'agit généralement de mammites sub-cliniques et subaiguës, résistantes aux traitements antibiotiques classiques, s'accompagnant parfois de kérato-conjonctivite, d'arthrite ou de symptômes respiratoires (ces symptômes étant principalement rencontrés chez les veaux nourris avec du lait issu de vaches infectées). La source de ces germes est principalement la mamelle des vaches infectées (l'infection touchant souvent plus d'un quartier), et l'appareil respiratoire ou uro-génitale de certaines vaches. Il s'agit d'un germe très contagieux : jusqu'à 80% du troupeau peut être atteint en quelques semaines (Schmitt et al., 2007 ; Van De Leemput, 2005).

e) Pseudomonas aeruginosa :

Elle est à l'origine de mammites cliniques aiguës voire quelquefois suraiguës. La survenue des mammites est généralement sporadique, mais elles peuvent toucher parfois plus du tiers du troupeau. Dans ce cas, la source de l'infection est souvent l'eau utilisée pour nettoyer le matériel de traite. La bactérie est capable de résister aux défenses de l'organisme via la formation de biofilm : c'est pourquoi les chances de succès d'un traitement sont faibles à nulles (Van De Leemput, 2005).

f) *Listeria monocytogenes* :

C'est une bactérie importante dans le cadre de la sécurité sanitaire des aliments, mais qui reste très rare en élevage : 5% des laits de tank sont contaminés mais seulement 10% d'entre eux le sont à cause d'une infection mammaire. Il s'agit dans ce cas de mammites subcliniques (Schmitt et al., 2007).

g) Levures :

Les levures responsables d'infections mammaires appartiennent aux genres *Cryptococcus* et *Candida* (*Candida krusei* étant la plus fréquemment isolée). Elles sont à l'origine de mammites cliniques subaiguës s'aggravant suite à l'utilisation d'antibiotiques, évoluant ensuite vers la chronicité, et ne pouvant pas être traitées (absence d'antifongique actif dans la mamelle sur le marché). Elles ont pour source l'environnement, et en particulier l'alimentation, la peau, les fèces des animaux, le sol, et les plantes. L'infection a généralement lieu lors d'injection intra-mammaire avec une seringue ou un produit contaminé d'où l'importance de la désinfection de la peau et de l'entrée du canal du trayon lors de toute injection intra mammaire (Schmitt et al., 2007 ; Van De Leemput, 2005).

h) *Prototheca* :

Il s'agit d'algue unicellulaire, dont la principale espèce responsable de mammites est *Prototheca zopfii*. Elle induit des mammites subcliniques ou aiguës, résistantes aux antibiotiques. La concentration cellulaire est augmentée et la production fortement diminuée.

On la retrouve sur les sols, les plantes, les eaux stagnantes ou vives (rivière, mer), l'eau des abreuvoirs, les zones boueuses ainsi que dans les fèces des vaches infectées chroniquement (seule 18% des vaches infectées ne présentent pas d'excrétion fécale). La contamination a principalement lieu depuis l'environnement mais peut aussi avoir lieu lors de la traite (Schmitt et al., 2007 ; Van De Leemput, 2005).

i) *Bacillus cereus* :

Ce germe est responsable de mammites suraiguës avec une gangrène du quartier et une hémolyse intra vasculaire, suivie de la mort dans les 24 heures. Les sources principales de l'infection sont les sols, l'eau et les végétaux et les litières (Guerra, 2008).

j) *Corynebacterium bovis* :

Ce germe est responsable de mammites subcliniques n'entraînant qu'une faible augmentation du taux cellulaire (multiplié par 1,5 en moyenne). Il a pour source le canal du trayon des vaches infectées. On a pu montrer que la présence de *C. bovis* dans les mamelles était protectrice contre une infection par les pathogènes majeurs (Van De Leemput, 2005).

k) Streptocoques environnementaux :

Ce groupe comprend de nombreux germes, comme *St. parauberis*, *St. equinus*, *St. salivarius*... Il s'agit de germes présents dans l'environnement, évoluant comme des pathogènes opportunistes. Ils sont à l'origine de mammites subcliniques et subaiguës, se résolvant en moyenne en 30 jours, mais pouvant aussi évoluer vers la chronicité (Van De Leemput, 2005).

5. Prévalence des germes responsables de mammites :**5.1. Lors de mammites cliniques :**

On remarque que le germe principalement retrouvé lors de mammites cliniques est *St.uberis* (figure n° 23), ce qui confirme son importance dans la pathologie mammaire d'aujourd'hui, alors qu'il y a vingt ans ce germe ne représentait que 13% des échantillons de mammites cliniques. *E. coli* arrive en seconde position, suivi des staphylocoques coagulases positives (dont le représentant principal est *S. aureus*). Parmi les germes inhabituels Marie-Anne Botrel a noté une prédominance des entérobactéries (*Serratia* et *Klebsiella*) (Bendiab, 2012 ; Angoujard,2015).

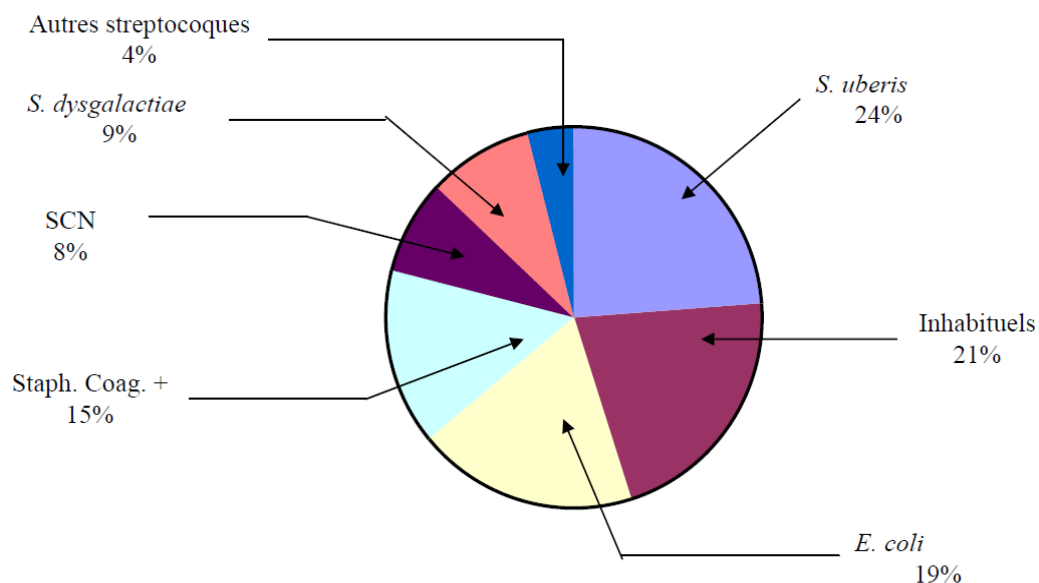


Fig.23 : Proportion de chaque groupe d'agents pathogènes isolés lors de mammites cliniques (Bendiab, 2012).

5.2. Lors de mammites subcliniques :

On s'aperçoit que lors de mammites subcliniques le germe le plus fréquent est *S. aureus*, loin devant les SCN et *St. uberis* (figure n° 24). On remarque aussi que *St. agalactiae* a disparu, alors qu'en 1985, on le retrouvait dans 7,2% des cas (5), alors que parallèlement les staphylocoques coagulases positives représentaient déjà 34 % des échantillons. Parmi les germes inhabituels isolés, on retrouve principalement des souches de *Bacillus* et de corynébactéries (Bendiab, 2012 ; Angoujard,2015).

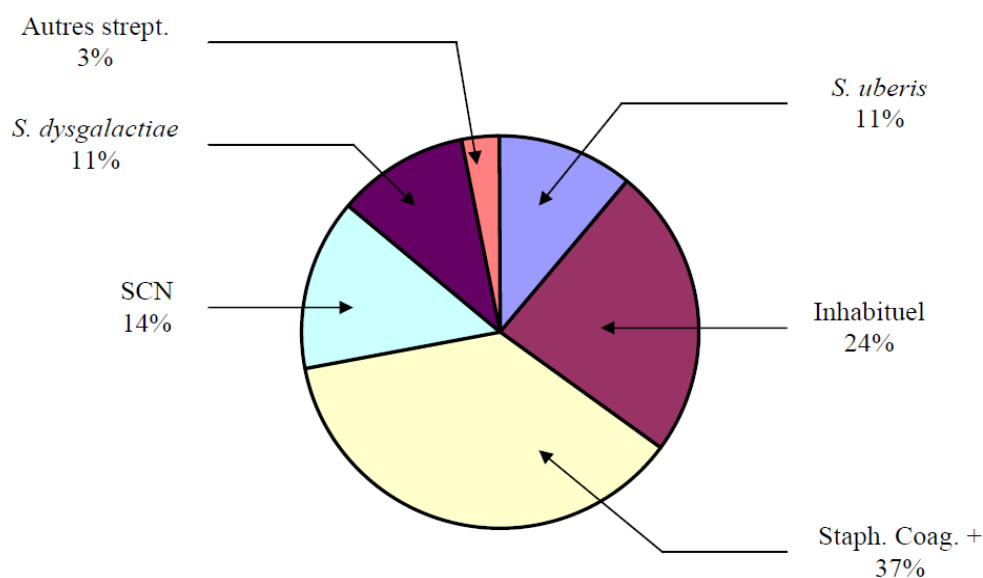


Fig.24 : Proportion de chaque groupe d'agents pathogènes isolés lors de mammites subcliniques (Bendiab, 2012).

6. Importance des mammites bovines :

6.1. Importance médicale :

Les mammites suraigües peuvent causer la perte de l'animal ou tout du moins du quartier atteint. Les mammites subcliniques sont souvent difficilement curables et entraînent la réforme de l'animal et son abattage précoce. Les mammites aiguës et suraigües altérant l'état général de l'animal, peuvent intervenir comme facteurs prédisposant à d'autres maladies de la vache laitière, comme les déplacements de caillette, des arthrites ou des endocardites secondaires au passage du germe dans la voie sanguine. D'autre part, les vaches atteintes de mammite même modérée, présentent des modifications de posture et une hyperalgie durable (de quelques jours à quelques semaines) (Debreil, 2008).

6.2. Importance sanitaire :

Le lait de mammite clinique n'est pas commercialisé mais celui des infections subcliniques peut entrer dans la production de fromage, lait et autres produits laitiers. La contamination de ceux-ci par certains germes (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*) peut être responsable de toxi-infections alimentaires en l'absence de pasteurisation (Debreil, 2008).

6.3. Importance économique :

Les infections mammaires en élevage bovin laitier sont la principale cause, loin devant la reproduction, de pertes économiques pour des raisons sanitaires : lait non produit, non commercialisé, moindre paiement du lait pour qualité cellulaire insuffisante, réforme des vaches non soignables, coûts des traitements et temps passé à les exécuter. Le coût moyen des mammites bovines, selon Araujo est de 78 € par vache et par an (52 € de pertes et 26 € de coûts de traitement). L'incidence moyenne des mammites est variable selon les études, d'environ 50 cas pour 100 vaches et par an en Grande-Bretagne et de 22 à 140 cas pour 100 vaches et par an en France, mais reste élevée malgré l'amélioration des conditions d'élevage et de traite.

Le paradoxe est que, malgré le coût très important des infections mammaires (2 fois plus que les maladies de la reproduction), elles sont les moins bien gérées par l'éleveur. Dans 95 % des cas, les mammites cliniques sont traitées par l'éleveur sans l'intervention du vétérinaire, alors que couramment les troubles de reproduction sont suivis par le praticien ou le technicien du centre d'insémination (Debreil, 2008).

7. Pathogénie des infections mammaires :

7.1. Pénétration des bactéries dans la mamelle :

A part le cas particulier des mammites tuberculeuses et brucelliques d'origine hématogène, les germes pathogènes pénètrent généralement dans le quartier par le canal du trayon. Celui-ci constitue une première barrière contre la colonisation de la mamelle : le sphincter à la base du canal assure l'étanchéité entre la mamelle et le milieu extérieur. Les cellules kératinisées de la muqueuse se desquament régulièrement, participant à l'élimination des germes en début de traite. Ainsi la pénétration des germes se réalise au moment où le sphincter est ouvert, durant la traite et surtout en fin de traite (le sphincter reste ouvert environ une demi heure après la traite), mais aussi à l'approche du vêlage, ou au tarissement où le sphincter laisse suinter voire couler un peu de lait par la pression de celui-ci (Debreil, 2008).

La pénétration des bactéries se produit suivant trois possibilités :

a) Au cours de la traite :

● **Par le phénomène d'impact :**

Une entrée d'air qui se réalise au niveau des manchons trayeurs provoque une baisse du niveau de vide dans la griffe et un reflux de lait sous forme de brouillard, vers les autres manchons où le niveau de vide est plus élevé. Le lait se dépose sur les trayons et peut même pénétrer le canal. Ce lait peut être contaminé par des germes d'un quartier malade ou par la présence de ceux-ci dans les manchons.

● **Par le phénomène de traite humide ou Reverse Flow :**

C'est le retour du lait qui vient d'être traité vers le trayon en raison d'un mauvais réglage des phases de massage de la machine à traire (Debreil, 2008).

b) Par la multiplication des germes présents sur le trayon :

Ces germes profitent de l'ouverture du trayon en post-traite pour pénétrer le canal. Les lésions du trayon et du sphincter (verruque, gerçure, blessure, éversion du sphincter) favorisant la multiplication des germes. Un contact précoce entre le trayon et l'environnement (pâturage, litière, etc...) est aussi un facteur prédisposant l'infection du canal par des pathogènes après la traite (Debreil, 2008).

c) Par l'introduction de germes par l'être humain :

Que ce soit par l'éleveur ou le vétérinaire, l'introduction dans le sinus lactifère de germes est réalisée par la mise en place de traitement intra mammaire ou de sondage du canal du trayon de manière non adéquate (défaut d'hygiène).

Après cette étape, les bactéries se retrouvent dans le lait intra mammaire. C'est le site infectieux obligatoire pour tous les types de mammites (Debreil, 2008).

7.2. Infection du quartier mammaire :

Lors de chaque traite, une évacuation du lait contribue à l'élimination des bactéries qui ont pu pénétrer le quartier. Le lait joue un rôle de véhicule et de milieu nutritif pour les germes.

Ceux-ci peuvent entre chaque traite envahir l'ensemble des canaux galactophores. Les bactéries qui ont la capacité d'adhérer à la surface des épithéliums, ne seront pas chassées par la traite. Cette propriété est probablement une condition nécessaire pour la colonisation de la mamelle de manière plus profonde et sa persistance dans le quartier. Il est possible que

certains germes aient une capacité de croissance telle qu'il ne soit pas nécessaire pour eux d'avoir des facteurs d'adhésion pour produire tout de même une infection.

La multiplication bactérienne engendre la production d'enzymes, de toxines qui sont responsables des lésions du tissu sécrétoire et de la modification qualitative du lait produit. Les défenses immunitaires se mettent en place plus ou moins rapidement suivant l'animal et la nature de l'infection. Une mamelle saine ne renferme que peu de cellules immunitaires. Ce sont surtout des macrophages.

Lors d'infection, la lésion des tissus mammaires provoque l'afflux de polynucléaires neutrophiles sanguins par diapédèse. Ils deviennent l'espèce cellulaire majoritaire dans le lait. Ce sont eux qui provoquent l'augmentation des taux cellulaires constatée dans le lait de mammite avec l'augmentation des cellules épithéliales desquamées, des lymphocytes et des macrophages. L'afflux massif des polynucléaires est responsable de l'apparition des caillots de fibrine et des grumeaux dans le lait de mammite. La mamelle possède entre autres, une auto-défense par la sécrétion de lactoferrines, le lysozyme, et le système lacto-peroxydase-thiocyanate-peroxydase dans le lait, qui limite la fixation des agents pathogènes sur les cellules épithéliales et leur multiplication (Debreil, 2008).

7.3. Guérison ou persistance de l'infection :

Suivant les pouvoirs pathogènes de la bactérie et l'efficacité des défenses immunitaires, l'infection mammaire peut évoluer vers une guérison spontanée ou vers l'extension dans le cas de mammite clinique. Certaines bactéries, après adhésion à la surface des cellules épithéliales, peuvent y pénétrer et s'y multiplier. Cette localisation intracellulaire est associée à des infections de type chroniques et récurrentes. Certaines souches de *Staphylococcus aureus* en pénétrant dans les cellules épithéliales, sont capables de provoquer une apoptose (phénomène sous contrôle normalement hormonal qui se produit en fin de lactation, occasionnant une réduction de la production laitière). D'après Lafont *et al.*, Middleton *et al.* ont montré que lors d'infection expérimentale par *Staphylococcus aureus*, la production lactée chute de manière significative par rapport à des vaches saines. D'autres souches de staphylocoques sont connues pour résister à la bactéricidie des lysosomes, des macrophages et des polynucléaires et peuvent même s'y multiplier.

L'action des adhésines, exotoxines, invasives des bactéries associées au passage massif des polynucléaires, provoque la désorganisation des liaisons intercellulaires épithéliales et

autorise la pénétration de l'agent pathogène dans le parenchyme mammaire, et peut même atteindre les voies lymphatiques, sanguines et provoquer une septicémie.

Lors de localisation dans le parenchyme, il se produit une augmentation du tissu inter-alvéolaire au détriment des alvéoles producteurs de lait. Un tissu fibreux réactionnel et cicatriciel se met en place pour circonscrire le foyer infectieux. Le tissu croit avec l'ancienneté de l'infection, formant des nodules durs dans le quartier, qui sont palpables. La pénétration intracellulaire dans le parenchyme mammaire est signe de chronicité. L'apparition de fibrose détermine une incurabilité de l'infection, l'agent est quasi intouchable dans les micro abcès du parenchyme.

Lorsqu'un équilibre s'établit entre multiplication et persistance du germe et les défenses de la mamelle, on observe des mammites subcliniques sans symptôme. Dès que cet équilibre est rompu, l'expression clinique reprend.

L'évolution clinique d'une mammite dépend de la nature des bactéries en cause et du statut immunitaire du bovin (Debreil, 2008).



Chapitre III
Diagnostic des
infections mammaires

Le diagnostic clinique d'une mammite ne présente pas de difficulté lorsque l'on observe des symptômes. Le plus difficile est la détection aussi précoce que possible des premières modifications physiologiques lors d'infections mammaires, afin de mettre en œuvre rapidement un traitement.

1. L'examen clinique :

1.1 Examen clinique de la mamelle :

L'examen de la mamelle et de sa sécrétion est le moyen le plus simple et le plus évident du diagnostic de mammite. Il consiste, en premier lieu, en un examen visuel :

- a) On observe la symétrie, le volume, la couleur (hématome, congestion) des différents quartiers les uns par rapport aux autres ;
- b) On observe ensuite les trayons (présence de verrue, d'anneau, d'hyperkératose, d'éversion au niveau du sphincter) (figures n° 25, 26, 27 et 28).

Puis vient la palpation de l'ensemble de la mamelle et du quartier atteint, des ganglions rétro mammaires. On constate ainsi, une inflammation (chaleur), un œdème, des indurations (zones de fibrose dans le quartier), une douleur, adénite et éventuellement des indurations dans le canal du trayon ou une pyodermite d'échauffement entre l'intérieur de la cuisse et la mamelle (Durel et *al.*, 2004 ; Lepage, 2003).



Fig.25 : Coloration bleue du trayon. Ce trouble circulatoire, souvent observé chez les primipares, n'a aucune incidence sur la santé des mamelles (Remy, 2010).

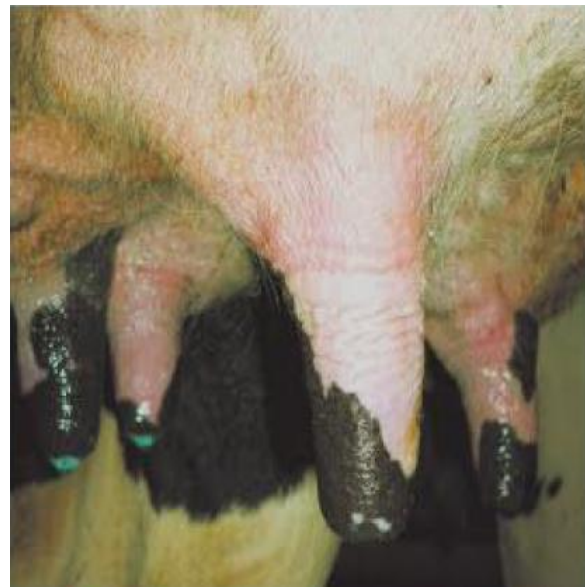


Fig.26 : Congestion du trayon : sa détection nécessite sa palpation pour détecter une éventuelle anomalie (Remy, 2010).



Fig.27 : Microhémorragies sur un trayon (Remy, 2010).

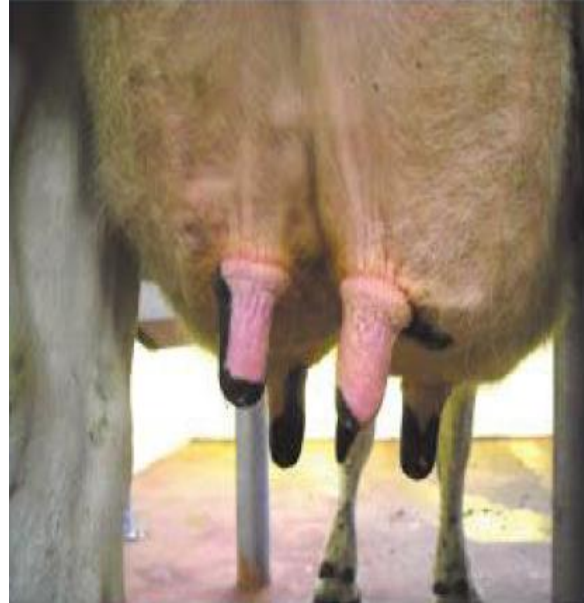


Fig.28 : Anneau de compression : cette lésion survient fréquemment sur les vaches présentant de l'œdème mammaire, et ceci sans aucune conséquence (Remy, 2010).

1.2 Examen de la sécrétion lactée :

On note toute modification de couleur, d'odeur, de consistance, de viscosité, d'homogénéité, et de quantité produite de la sécrétion mammaire.

Le colostrum est normalement jaunâtre, épais, le lait est blanc et homogène. Il peut prendre des teintes plus jaunâtres en fin de lactation par une augmentation de sa teneur en matières grasses ou rose à rouge vif lors d'hémolactation en début de lactation ou lors d'hématome causé par un choc.

Quand une mammite apparaît, on observe une modification de la coloration du blanc au jaune (couleur 'cidre' lors de mammites dite colibacillaires), au rouge sombre (lors de mammites gangréneuses). L'odeur se modifie aussi, de douce aigre (germes anaérobies), acide (colibacilles) à nauséabonde ('œuf pourri') lors de mammites pyogènes (Lepage, 2003). Le plus couramment, on observe une altération de l'homogénéité du lait, la présence de grumeaux, de gros amas de fibrine ou de pus, visible sur un bol à fond noir. Une baisse de production laitière est aussi observée lors d'infections mammaires : celle-ci peut être très importante lors d'infections aiguës, à très modérée lors d'infections subcliniques. L'examen clinique de la mamelle et du lait met en évidence un processus inflammatoire le plus couramment induit par une infection. Malheureusement, la nature des signes cliniques n'est

pas en relation avec la nature du germe en cause. Lors d'examens bactériologiques suite à des mammites colibacillaires (lait translucide jaunâtre, hyperthermie, altération de l'état général), seuls 46% des isolats correspondent à des colibacilles, et 44 % à des Gram positifs (Van De Leemput, 2007).

On peut avoir tout de même des profils cliniques généraux en fonction de la bactérie responsable de l'infection. Certains germes ont plutôt tendance à provoquer des mammites aiguës (colibacilles, entérobactéries) et d'autres n'engendrent que des signes frustes (les germes Gram positifs lors de mammites subcliniques).

D'autre part, l'apparition des symptômes peut être différée par rapport au début de l'infection. Ainsi l'utilisation systématique d'un bol à fond noir (figure n° 29) et la palpation de l'ensemble de la mamelle à la traite sont importants pour une détection aussi précoce que possible de l'infection.

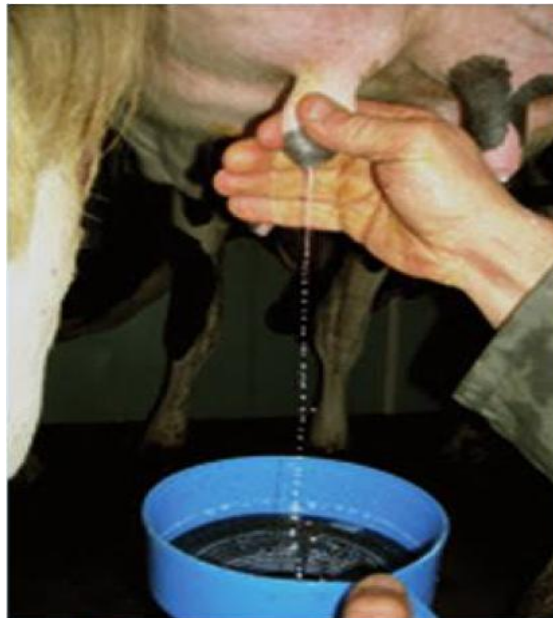


Fig.29 : Examen des premiers jets dans un bol à fond noir (Remy, 2010).

D'autres méthodes de diagnostic ont été développées afin d'améliorer la détection des infections par les éleveurs ou le praticien en complément de l'examen de la mamelle.

2. Le papier indicateur de pH:

Le seul disponible actuellement en France est distribué par Krusse, le Bovivet Indicator PaperR (figure n° 30). C'est un papier buvard présentant 4 zones pour les 4 quartiers. Chaque zone est traitée avec deux indicateurs colorés : le bleu de bromothymol et la nitrazine. Le premier vire du jaune au bleu dans une plage de pH de 6 à 7,6, et le second du jaune au vert de 6,4 à 6,8. Ce test consiste à déposer un peu de lait sur chaque zone et d'attendre deux

minutes. La coloration normale des zones, lorsqu'elles sont imbibées de lait issu d'une mamelle saine, est jaune verdâtre, ce qui correspond au pH du lait entre 6,5 et 6,7. Lorsqu'on approche d'un pH 7, observé en cas de mammite, la zone du buvard imprégnée de lait mammitieux, prendra une coloration de vert franc à vert bleuté. Cette indication est peu précise : on observe des variations physiologiques du pH du lait qui peuvent induire en erreur. Le colostrum est plus acide, et en fin de lactation le pH peut prendre des valeurs avoisinant le 7 (Lepage, 2003).



Fig.30 : Sachet de 25 papiers indicateurs de Ph (Bovivet).

3. Le California Mastitis Test (C.M.T.) :

Ce test est disponible en France sous le nom de LeucocyttestR. Il est basé sur l'utilisation d'un détergent (le Teepol à 10 %) et d'un colorant (le pourpre de bromocrésol) sur le lait.

3.1. Mode d'action :

Le tensio-actif du détergent provoque la lyse des cellules présentes dans le lait par destruction des parois. L'A.D.N. ainsi libéré forme un réseau qui enrobe les globules gras et les autres particules du lait, formant un gel plus ou moins dense en fonction de la quantité d'A.D.N. présent. L'indicateur coloré apporte comme dans le test précédent, une valeur de pH. Plus le nombre de cellules lysées est important, plus la quantité de contenu cellulaire présente dans le lait est élevée, et plus le pH augmente. L'action du détergent amplifie l'alcalinisation du lait mammitieux.

3.2. Méthode :

Ce test est facilement réalisable. Il consiste à prélever un peu de lait de chaque quartier dans quatre coupelles d'un plateau (figure n° 31). On garde environ 2 ml de lait par coupelle puis on ajoute une quantité égale de tensio-actif fourni et on assure le mélange par rotation. La lecture doit être immédiate. On apprécie la consistance et la couleur en fonction d'un tableau fourni avec le test (tableau n°9).



Fig.31 : Plateau LeucocyttestR

Tableau 9 : Interprétation du leucocytstR (indication figurant sur le flacon du réactif) :

Lecture			Interpretation	
Aspect	Score		Infection	Relation avec la numération cellulaire moyenne (x 10 ³ /mL)
	Valeur	Degré		
Consistance normale couleur grise	0	0	Absence	100
Leger gel disparaissant apres agitation couleur gris violace	1	+/-	Risque d'infection par pathogenes mineurs	300
Leger gel persistant et filaments grumeleux couleur gris violet	2	+	Mammite subclinique	900
Epaississement immediat, amas visqueux au fond de la coupelle	3	++	Mammite subclinique	27000
Gel epais consistance du blanc d'oeuf couleur violet fonce	4	+++	Mammite subclinique a la limite de l'expression clinique	8100

3.3. Valeur du test :

Différentes études ont été menées (Lepage, 2003), montrant la corrélation entre les résultats du test et le comptage cellulaire. Celle-ci semble meilleure avec un fort taux cellulaire. Des résultats douteux ou négatifs doivent être pris avec précaution. Un comptage cellulaire faible ne signifie pas forcément l'absence d'une infection. La réaction inflammatoire peut être différée ou de faible intensité. D'autre part, ce test est soumis à la subjectivité de l'opérateur. Son utilisation régulière permet de mieux apprécier les variations de consistance et de couleur. Les coupelles doivent être parfaitement propres, leur contamination peut fausser le résultat.

Comme pour le papier pH, la couleur n'est qu'indicatrice. Elle peut devenir violacée normale en phase colostrale et en fin de lactation. De même le colostrum est naturellement plus riche en cellules que le lait et peut induire en erreur.

En conclusion, ce test est facilement utilisable en élevage. Il permet de détecter des vaches à taux cellulaires élevés. La répétition de l'examen sur des vaches douteuses améliore le diagnostic d'infections mammaires (Ferrouiller et *al.*, 2004 ; Lepage, 2003). Il peut être aussi utilisable en contrôle de guérison, afin de vérifier que les taux cellulaires reviennent à des valeurs normales en un à trois mois après l'infection. Ce test ne permet pas de déduire la nature du germe en cause. Il peut être aussi utile, pour repérer le quartier atteint à la différence du C.C.S.I.(Concentrations Cellulaires Somatiques Individuelles) qui évalue l'état de santé des quatre quartiers (Ferrouiller et *al.*, 2004).

4. La conductivité électrique du lait :

C'est une méthode de diagnostic très récente. Elle est basée sur la capacité du lait à conduire le courant électrique, et aux variations observables lors d'infections mammaires. Le lait contient du chlore, du sodium et du potassium, qui sont des électrolytes. Dans une mamelle saine, la teneur de ces ions et le taux butyreux, évoluent durant la lactation. En phase colostrale, la concentration en chaque électrolyte et en matières grasses, est responsable d'une conductivité élevée du lait, puis celle-ci baisse rapidement pour augmenter de nouveau en fin de lactation (Durel et *al.*, 2004 ; Ferrouiller et *al.*, 2004).

En cas d'infection mammaire, le lactose et les ions potassium diminuent dans le lait, alors que les chlorures et le sodium augmentent pour assurer l'équilibre osmotique. Ces perturbations sont le résultat des altérations des jonctions cellulaires et des systèmes de pompage ionique membranaire, de la perméabilité des capillaires sanguins. L'arrivée des ions

chlorure et sodium s'accompagne de constituants sanguins comme l'albumine, et autres protéines solubles. La teneur en chlorure du lait est proportionnelle au degré d'infection (Lepage, 2003). Ainsi lors d'inflammation, la conductivité est modifiée.

Il existe un grand nombre de systèmes de mesure avec leur propre spécificité et sensibilité (figure n° 32). La connaissance de leurs caractéristiques est indispensable pour pouvoir interpréter les valeurs. Cette méthode permet un diagnostic très précoce avant l'apparition des premiers symptômes. Mais on observe des variations avec : la race de l'animal, le début et la fin de traite, l'alimentation et la technique de traite. Ceci nécessite des mesures précises pour un type d'animal, à un stade de traite, de manière régulière, etc...Ce test est utilisable par un éleveur formé à sa propre machine.



1. Vase Collecteur d'échantillons de lait
2. Revers de Protection.
3. Couvercle
4. Touches
5. Calculateur Interne
6. Bretelle de Sécurité.
7. Capteur Thermique.
8. Capteurs à Electrodes
9. Affichage Numérique
10. Châssis

Fig.32 : Testeur de lait utilisant la conductivité pour détecter une mammite (document de Brastel Co., Ltd., Japan).

5. Les concentrations cellulaires somatiques du lait :

Les contrôles de concentrations cellulaires somatiques individuelles (C.C.S.I.) et de tank (C.C.S.T.) sont effectués par les services de contrôle laitier dans les élevages qui présentent une importance économique pour la production de lait. Par contre pour la majorité des éleveurs, cet examen se fait auprès des laiteries de livraison. Pour les adhérents du contrôle laitier, une mesure mensuelle des C.C.S.I. et C.C.S.T. fait partie du compte-rendu des

résultats laitiers, avec les taux protéiques, les taux butyreux, la quantité de lait etc.... Un technicien prélève un échantillon de lait sur chaque vache (lait des quatre quartiers mélangés), celui-ci est analysé par un laboratoire spécialisé. Il mesure la concentration en cellules du lait (macrophages, leucocytes, cellules épithéliales). En cas d'infection, comme on l'a vu précédemment, le nombre de cellules augmente en fonction de la nature de l'infection. Les laiteries donnent des valeurs seuils de C.C.S.I., pour le paiement du lait, plus ou moins en rapport avec des valeurs pathologiques. Ainsi, en général, on considère l'absence d'infection mammaire en dessous de 300 000 cellules, et sa présence si les C.C.S.I. sont supérieurs à 800 000 cellules. Entre ces deux valeurs, on considère qu'il y a infection par un pathogène mineur ou mammite à expression subclinique (Bosquet, 2004). En pratique, ces valeurs sont surévaluées pour ne pas léser le producteur laitier, le paiement du lait étant indexé au taux cellulaire du tank. Des animaux en dessous de 300 000 cellules, peuvent être infectés avec *Staphylococcus aureus*, et ceux entre 300 000 et 800 000 cellules, sont considérés comme douteux mais ne sont pas forcément infectés (retour après infection à des valeurs normales de C.C.S.I. par exemple).

Le comptage cellulaire étant réalisé sur le mélange des quatre quartiers, on observe une dilution du taux cellulaire du quartier infecté, par les quartiers sains. Ainsi, sur une vache à faible taux cellulaire hors infection, la contamination d'un quartier par certains germes ne provoquant que très peu d'inflammation, peut passer comme une variation de C.C.S.I. non pathologique. Il est donc important pour établir un diagnostic de suivre les variations de C.C.S.I. sur plusieurs mois afin de conclure à une probable infection (Durel et *al.*, 2004).

Le comptage cellulaire de tank indique dans une certaine mesure, le type d'infection dans l'élevage : ainsi un C.C.S.T. élevé et peu de cas cliniques, est en faveur d'un nombre élevé de vaches atteintes avec des C.C.S.I. moyennement élevés. L'origine est probablement un germe contagieux, et à l'opposé, un C.C.S.T. faible et beaucoup de cas cliniques sont en faveur d'infections mammaires aiguës sporadiques, de courtes durées par des germes d'environnement.

L'analyse des comptages cellulaires permet de classer les infections mammaires des élevages, en type environnemental ou contagieux (tableaux n°10, 11 et 12). Ceci autorise une prédiction de la nature du germe en cause et d'adapter des protocoles de traitement et de prophylaxie à mettre en œuvre. Ce n'est pas un diagnostic de certitude mais une aide précieuse dans l'étude globale des infections mammaires dans l'élevage (tableaux n°12,13 et 14).

Tableau 10 : Situations épidémiologiques types. Localisation des principales bactéries responsables de mammite au sein de la mamelle [D'après Faroult ; Lepage (2006)].

	Lait	Phagocytes	Cellules épithéliales	Parenchyme sans fibrose	Parenchyme avec fibrose	Sang
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+ Si infection chronique avec souche spécifique excrétion dans le lait intermittente	-	-	+ Si bactériémie précoce en cas de mammite aiguë
<i>Streptococcus</i>	+	-	+ Certaines souches d'infection chronique	+ <i>Streptococcus uberis</i> précocement	+ Sur <i>Streptococcus uberis</i> et mammite ancienne ou récidive	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+ Dans certains cas	+	+ Précocement	+ Sur ancienne infection ou vache âgée	-

Tableau 11 : Résultat de bactériologie sur le lait de mammite de différentes études [d'après Bosquet (2004)].

	Étude en Mayenne de juin 2001 à mars 2005 (87)	Étude à Gavray (Manche) de mai 2007 à janvier 2008	Étude en France de 2005 à 2007 (12)	Étude anglaise BRADLEY <i>et al.</i> (19)
<i>Staphylococcus coagulase négatif</i>	8 %	32 %	14,5 %	17,8 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	20 %	16 %	13,3 %	13,9 %
<i>Streptococcus uberis</i>	35 %	24 %	25,4 %	29 %
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7 %	0	-	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>		0 (1cas)	-	-
<i>Escherichia coli</i>	23 %	19 %	17,6 %	18 %
<i>Klebsiella spp</i>	-	0,04 %	5 %	-

Tableau 12 : Caractérisation épidémiologique du modèle contagieux et du modèle environnemental [d'après Bosquet (2004)].

Critères	Modèle contagieux	Modèle environnemental
Comptage cellulaire	- CCST > 200 000 - moins de 85 % de CCSI < 300 000	CCST < 200 000 plus de 85 % de CCSI < 300 000
Incidence de cas cliniques	Faible à modérée (< 30 cas / 100 vl / an)	Modérée à élevée (> 30 cas / 100 vl / an)
Sévérité des cas cliniques	Plus faible	Plus forte
Facteurs de risques	- Traite favorisant la contagion - Défaut de trempage - Crevasses, lésions sur les trayons - Tarrissement mal conduit - Réforme insuffisante	- Stabulation longue - Logement défectueux - Défaut de lavage, essuyage des trayons - Défaut d'hygiène des traitements intramammaires

Tableau 13 : Caractérisation épidémiologique des sous modèles à staphylocoques ou à streptocoques [d'après Bosquet (2004)].

Critères	Sous modèle à staphylocoques	Sous modèle à streptocoques
Séries de CCSI > 300 000	Longues >4 mois	Moyennes 3- 4 mois
Rechutes	Fréquentes	+/- fréquentes
CCSI avant mammite clinique	Élevés en moyenne	En augmentation
Indice de guérison au tarrissement	Faible à modéré	Modéré à élevé
Sévérité des mammites cliniques	Faible à modérée	Modérée en moyenne
Quartier fibrosé après mammite	Fréquent	Rare
Facteurs de risques	Lésion du trayon, défaut de réforme	Perte de lait sur la litière, logement défectueux

Tableau 14 : Caractérisation épidémiologique des sous modèles environnementaux à entérobactéries ou à streptocoques [d'après Bosquet (2004)].

Critères	Sous modèle à streptocoques	Sous modèle à entérobactéries
Séries de CCSI > 300 000	Moyennes 2-3 mois	Courtes 1 -2 mois
CCSI avant mammite clinique	En augmentation	Faibles
CCSI après mammite clinique	Élevés	Faibles
Sévérité des mammites cliniques	Modérée en moyenne	Modérée à forte
Rechutes	Peu à assez fréquentes	Rares
Facteurs de risques	Perte de lait sur la litière, hygiène des bâtiments	Défaut d'hygiène autour du vêlage

6. le diagnostic étiologique des infections mammaires :

L'examen bactériologique :

Cet examen permet un diagnostic de certitude de l'infection mammaire. Il consiste en la mise en culture du lait afin de déterminer la nature du germe responsable de l'infection. Le praticien peut prescrire cet examen en réalisant un prélèvement de lait et en adressant rapidement, sous régime du froid, aux laboratoires de la région. On obtient un résultat entre 5 et 8 jours, ce qui permet sur plusieurs prélèvements, d'orienter sur la nature du germe, les mesures médicales et prophylactiques à mettre en œuvre.

Aujourd'hui plusieurs praticiens ont adapté une méthode simplifiée des techniques de laboratoire, autorisant un résultat entre 24 et 48 h, pour les germes majeurs d'infections mammaires (Durel et *al.*, 2004 ; Blains, 2004 ; Durel, Poutrel, 2006 ; Durel, Van De Leemput, 2007 ; Van De Leemput, 2007).



Chapitre IV
Matériel et Méthodes

1. Objectif :

L'objectif de notre étude est de réaliser une étude bactériologique du lait cru à partir d'échantillons prélevés sur des vaches laitières de deux fermes de la wilaya de Mostaganem (figure n°33), et ce, pour mettre en évidence la présence d'une flore pathogène. Le but de la caractérisation de cette flore est de mettre en évidence la présence d'une mammites subclinique, ce qui nous permettra de choisir les antibiotiques les plus efficaces aux traitements des vaches atteintes.

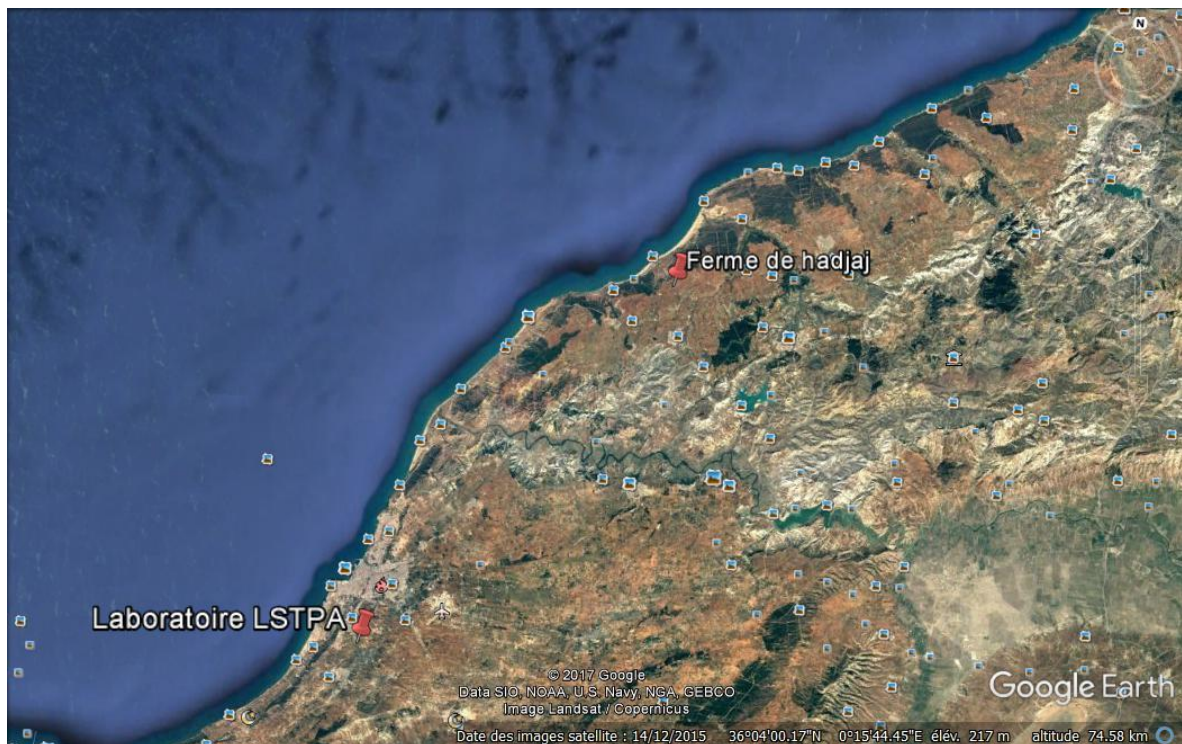


Figure 33 : Vue par satellite des 2 zones d'étude, les 2 fermes étant distantes d'environ 50 km (Google Earth,2017)

2. Présentation de la première zone d'étude :

2.1. Exploitation :

La première exploitation est située dans la daïra de Hassi-Mamèche. Il s'agit de la ferme expérimentale « élevage », rattachée à l'université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem. Cette ferme s'étend sur une superficie de 60 hectares et se trouve à une altitude de 141m au-dessus du niveau de la mer, de Latitude 35°51'39'' Nord et de Longitude 0°4'30'' Est. Son climat est de type méditerranéen, doux pendant l'hiver et sec et chaud pendant l'été (figure n°34).

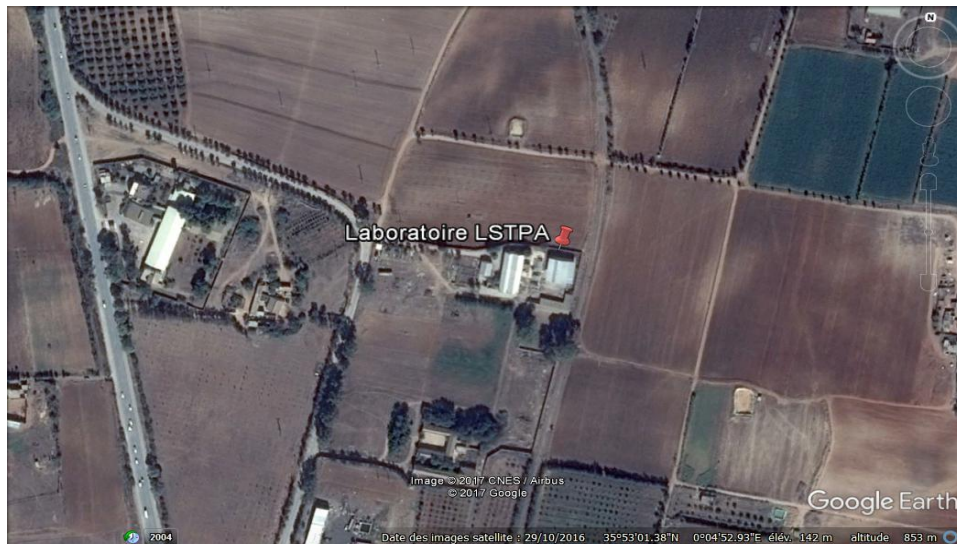


Figure 34 : Vue par satellite montrant la situation de la ferme expérimentale et du laboratoire. LSTPA (google earth,2017).

L'exploitation est constituée d'une étable ayant un espace réservé pour les veaux, d'une aire de repos dans laquelle on retrouve des box d'isolement pour les taurillons. La traite est réalisée dans l'étable.

2.2. Animaux :

Le troupeau est constitué de 3 vaches laitières et de 3 veaux (figures n°35 et 36). Les bovins sont issus de la race Holstein pie noire, importés de France et sont identifiés par des boucles d'oreilles portant leurs numéros d'identification (figure n°41 a et b).



Figure 35 : Les 3 vaches laitières de race Pie noire dans l'aire d'exercice.



Figure 36 : Les veaux à l'abreuvoir.

L'entretien est réalisé par 4 ouvriers qui s'occupent de la traite biquotidienne, de l'alimentation, de l'abreuvement et de l'hygiène des animaux (figures n°37, 38, 39 et 40).



Figure 37 : Préparation du fourrage vert (sorgho).



Figure 38 : Préparation des litières sèches en paille.



Figure 39 : Alimentation des vaches en sorgho (vert) et foin (sec).



Figure 40 : Abreuvoir rempli d'eau de forage.



Fig.41: La vache Janella (concernée par le prélèvement) porte un numéro d'identification.

En ce qui concerne l'environnement, il est composé d'un espace végétal, arbres fruitiers (muriers, figuiers, oliviers, pieds de vigne) et autres (palmiers, eucalyptus, lauriers sauvages), plantes fourragères. On trouve également un espace animal constitué d'ovins, de volaille et de chiens (figures n° 42, 43).



Figure 42 : Plantes fourragères et arbres fruitiers.



Figure 43 : Autres animaux de la ferme

(les chiens)

3. Présentation de la deuxième zone d'étude :

3.1. Exploitation :

La deuxième exploitation concernée par le prélèvement de lait se trouve dans la commune de Hadjadj (ex.Bosquet). Elle s'étend sur une superficie d'environ 2000 m² et se trouve à une altitude de 263m au-dessus du niveau de la mer, de Latitude 36°06'00'' Nord et de Longitude 0°20'00'' Est, son climat est de même type que celui de la première exploitation (figure n°44).



Figure 44 : Vue par satellite de la ferme de Hadjadj (google earth,2017)

La ferme, qui est une propriété privée, est composée de 2 bâtiments à savoir, une petite salle d'isolement des veaux et une grande étable qui assure plusieurs fonctions, salle de traite, de stabulation entravée pour les vaches, de stockage de fourrage (paille, concentré, etc..) et de matériels. Les bâtiments sont très vétustes, dalle bétonnée et en très mauvais état, toits en tôles ondulées, de nombreuses ouvertures parfois colmatées légèrement, des caniveaux au milieu et mal entretenus (figure n° 45, 46, 47 et 48) .



Figure 45 : L'étable assure plusieurs fonctions



Figure 46 : Toit en tôles
et ouvertures colmatées



Figure 47 : Tenues de travail et bottes
mal rangées



Figure 48 : Caniveaux mal entretenus

Un enclos, se trouve devant l'étable, il est utilisé comme aire d'exercice pour les vaches, pour leur alimentation et leur abreuvement (figure n° 49, 50).



Figure 49 : Les vaches dans l'enclos



Fig.50 : baignoire à usage d'abreuvoir dans l'enclos.

3.2. Animaux :

L'élevage est constitué de 8 vaches laitières et de 3 veaux (figure n° 51 et 52). Les bovins sont issus de la race Holstein pie noire et sont identifiés.



Figure 51 : Vaches laitières pie noire



Figure 52 : Les 3 veaux placés en isolement

L'entretien est réalisé par 2 ouvriers qui s'occupent de la traite biquotidienne, de l'alimentation, de l'abreuvement et de l'hygiène des animaux (fig. n° 53, 54, 55 et 56).



Figure 53 : Espace réservé à la traite



Figure 54 : Bottes de foin



Figure 55 : produit pour le traitement des vaches

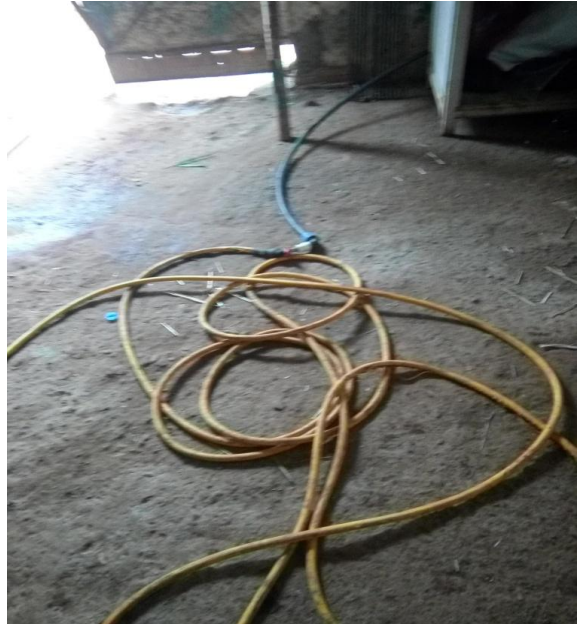


Figure 56 : Tuyau pour le nettoyage

En ce qui concerne l'environnement, il est composé en majorité de terres agricoles pour les cultures maraichères (figure n°57) et de vignoble, il n'existe pas d'espace réservé aux plantes fourragères. Pour les autres types d'animaux on trouve uniquement les chiens (figure n°58) et les chats.



Figure 57 : Les terres agricoles
entourant la ferme



Figure 58 : Présence d'un chien
dans l'étable

4. Présentation du laboratoire LSTPA :

Les analyses bactériologiques ont été effectuées dans le laboratoire des sciences et techniques de productions animales LSTPA, qui fait partie de la ferme expérimentale, comprend trois salles spécialisées dans les analyses microbiologiques en plus de deux salles, l'une pour les cours et l'autre pour les conférences, et d'autres locaux comme le bureau du directeur, le magasin pour les produits et le matériel. Le LSTPA est un lieu privilégié par les étudiants en Master et en Doctorat qui trouvent les moyens matériels nécessaires pour réaliser les analyses microbiologiques du lait et des produits laitiers dans le cadre de la recherche scientifique. Les étudiants sont encadrés par le directeur du LSTPA et un personnel enseignant de qualité. Chaque année différentes conférences et journées scientifiques y sont organisées dans l'intérêt des étudiants chercheurs.

5. Enquête de terrain :

Nous avons mené des enquêtes, au niveau de chacune des deux fermes, sous forme d'entretiens avec les éleveurs, avec les ouvriers et avec les vétérinaires chargés du suivi sanitaire des bovins. Nous avons complété ce travail par des visites de terrain, des observations visuelles et un questionnaire (Annexe n°6). Les résultats des enquêtes sont résumés dans le tableau n° 15.

Tableau 15 : Résultats des enquêtes menées dans les 2 fermes.

	Ferme 1	Ferme 2
1) Elevage :		
Registre d'élevage	Oui	Oui
Conception	Entravée	Entravée
Agrément	Oui (type sanitaire)	Oui (type sanitaire)
Nombre de bovins	Vaches (03), génisses (00), Reproducteurs (00), veaux (03), vêles(00)	Vaches (08), génisses (00), Reproducteurs(00),veaux (03),vêles(00)
Races exploitées	Pie noire (Holstein)	Pie noire (Holstein)
2) Environnement et habitat :		
Etat du bâtiment	Propre	Vétuste, non propre
Stalle	Bétonnée bon état	Bétonnée mauvais état
Présence de litières	Oui	Non
3) Locaux annexes :		
Local de mise bas	Non	Non
Présence de nurserie	Non	Non
Salle de traite	Non	Non
Stockage aliments	Oui	Non (stockage dans l'étable)
4) Alimentation :		
Pâturage	Oui	Non
Ration de base	Sorgho+paille+fouillage+ concentré+ luzerne	Mais+ sorgho+ soja+ paille+ fouillage+ concentré
Nombre de repas/ jour	02	02
5) Conduite de la reproduction		
Registre des vêlages	Oui	Oui (suivi par le vétérinaire)
Insémination	Artificielle	Artificielle
6) Conduite du troupeau		
Registre d'identification	Oui	Oui
Respect des contrôles de dépistage obligatoire	Oui, dernier contrôle en Mai 2017	Oui, dernier contrôle en janvier 2017
7) conduite de la traite		
Mode de traite	Mécanique à chariot	Mécanique à chariot
Horaire de traite	06 heures du matin et 18 heures de l'après midi	05 heures du matin et 15 heures de l'après midi
Propreté des	Oui	Non

trayons		
Nettoyage de l'équipement de stockage	Oui	Médiocre
Hygiène des trayeurs	Oui	Médiocre
8) Situation sanitaire		
Présence d'un Registre	Oui	Oui
Détection des mammites	Non	Oui
Contrôles bactériologique du lait	Non	Oui
9) Maladies observées en 2017		
Mammite	Non	Oui, un seul cas.
Avortement	Non	Non
Mortalité embryonnaire	Non	Non
Boiteries	Non	Non
Anoestrus	Non	Oui
Fièvre vitulaire	Non	Non
Autres	Diarrhée chez les vaches à leur mise en place, due au changement de l'alimentation	Indigestion due au rationnement (provoque l'acidose)

Remarque : La plupart des réponses données par les éleveurs ne sont pas fiables, car ils suspectent les personnes qui posent des questions comme étant des agents d'un certain service de contrôle de l'état (sanitaire, finances...). Le cas de mammite nous a été révélé par le vétérinaire chargé de la ferme de Hadjadj.

6. Prélèvement :

6.1 Premier prélèvement (ferme expérimentale) :

Nous avons réalisé le premier prélèvement le 25 Avril 2017 à 6H du matin par nos propres soins tout en respectant les conseils de notre directrice de mémoire sur les méthodes d'hygiène à suivre lors de la traite. Nous avons pris les précautions nécessaires pour

approcher la vache et la tranquilliser avant de procéder à l'opération du prélèvement. Le lait récolté est un mélange pris à partir des 4 pis de la vache. Nous l'avons transféré immédiatement au laboratoire LSTPA, sur place, pour procéder aux différentes analyses bactériologiques.

6.2 Deuxième prélèvement (ferme de Hadjadj) :

Nous avons réalisé le deuxième prélèvement le 11 Mai 2017 à 7H du matin, c'est un mélange pris des 4 pis de la vache. L'opération a été effectuée par nos soins sous la surveillance d'un agent trayeur de la ferme, les conditions d'hygiène lors de la traite ont été bien respectées. Le lait récolté a été placé dans une glacière et nous l'avons transféré au laboratoire LSTPA, le jour même, pour procéder aux différentes analyses.

6.3 Technique de prélèvement :

Une mamelle saine n'héberge pas de flore commensale. L'identification d'une bactérie montre la réalité d'une infection mammaire (Faroult et al.,2006 ; Van de Leemput, 2007) et quelques pathogènes mineurs comme *Corynebacterium bovis*, peuvent coloniser le canal du trayon mais sont éliminés à chaque traite.

Afin de bien caractériser le germe responsable de l'infection, il faut un prélèvement le plus stérile possible. Celui-ci peut être réalisé par le vétérinaire au moment d'une consultation ou par l'éleveur, mais une formation de ce dernier est souvent nécessaire afin d'éviter toute contamination par la flore du trayon ou par les mains du manipulateur (Faroult et al.,2006).

6.4 Matériel nécessaire :

Le prélèvement de lait ne nécessite qu'un matériel de base restreint (Besognet et al., 2007) :

- Pots de prélèvement stériles ;
- Gants d'examen ;
- Coton hydrophile ou compresses ;
- Alcool à 70° ;
- Papier absorbant ;
- Feutre indélébile si le pot de prélèvement est sans étiquette ;
- Glacière avec pains de glace si la bactériologie est réalisée plus tard.

6.5 Mode opératoire :

Le prélèvement est relativement simple, mais il doit être précis et rapide afin de ne pas le contaminer. La première étape est le nettoyage correct du trayon avec de l'eau tiède et du savon en utilisant une lavette. On essuie ensuite avec du papier absorbant et on renouvelle l'opération jusqu'à ce que le papier soit propre. Après avoir revêtu des gants, on procèdera à la désinfection du trayon, surtout le bout, avec un coton imbibé d'alcool à 70 °. Puis, on prend un flacon stérile entre le pouce et l'index et on oriente le bouchon vers le bas, on dévisse celui-ci avec la main droite. Le bouchon est placé immédiatement entre le pouce et l'index de la main gauche, protégeant l'ouverture du pot (Besognet et al., 2007).

On approche le flacon à l'horizontale du trayon, on élimine les premiers jets dans un récipient à part pour éviter une éventuelle contamination de l'environnement, puis on dirige 3 à 4 jets vers le flacon stérile, on rebouche celui-ci immédiatement (figures n°59 a et b). On identifie le flacon avec le numéro de la vache, le quartier de mamelle concerné et la date du prélèvement. Ce dernier est ensuite placé dans la glacière pour une bonne conservation avant l'arrivée au laboratoire.

La culture doit se faire dans les 48 heures en frais, sinon il y a mise en congélation. Celle-ci permet de garder les prélèvements sur une longue durée, mais il peut y avoir une fragilisation de certains germes avec une chute du nombre de bactéries présentes et donc une augmentation de cultures négatives (Houffschmitt, 2004).

Les prélèvements que nous avons effectués ont été réalisés dans les mêmes conditions d'hygiène et de sécurité mentionnées ci-dessus et l'analyse bactériologique a été effectuée le jour même.



(a)



(b)

Figures 59 (a et b) : prélèvement de lait à la ferme.

7. Analyse microbiologique :

7.1 Etude de la flore pathogène

Les espèces bactériennes impliquées dans les infections mammaires de la vache sont présentes sur l'animal lui-même ou dans son environnement. Par ailleurs, 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, les germes majeurs et les germes mineurs (Gabli, 2005). Le Tableau n°16 présente les germes majeurs, mineurs, environnementaux et contagieux impliqués dans la mammite clinique et sub-clinique.

Tableau 16 : Germes pathogènes responsables des mammites

(Descoteaux et Roy, 2004 ; Gabli, 2005).

Type de mammite	Germes majeurs	Germes mineurs	Germes environnementaux
Clinique	<i>Staphylococcus aureus*</i>	<i>Staphylocoques à coagulase négative</i>	<i>Escherichia coli</i>
	Streptocoque		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella hemolytica</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Mycoplasma bovis</i>		
Sub- clinique	<i>Staphylococcus aureus*</i>	<i>staphylocoques à coagulase négative</i>	<i>Escherichia-coli</i>
	Streptocoque	<i>Corynébactérium bovis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Escherichia coli</i>		
	<i>Bacillus cereus</i>		

*Les germes en gras sont contagieux

7.2 Méthodes :

7.2.1. Préparation des dilutions décimales :

a) Principe :

Nous avons préparé les dilutions décimales pour faciliter l'examen microbiologique selon les méthodes préconisées par le journal officiel (JORA n°70 , Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 Septembre 2004).

b) Préparation :

Après le prélèvement du lait cru, considéré comme suspension mère, et qui est homogénéisée par agitation avant d'être utilisée, on procède aux dilutions successives selon la méthode suivante (figure n°60) :

- La suspension mère est diluée successivement dans une solution physiologique stérile, l'eau peptonée.
- La dilution décimale en cascade est effectuée en transférant une prise d'essai de 1 ml de suspension à diluer dans un tube contenant 9 ml d'eau peptonée.
- Le nombre de dilutions nécessaires est choisi en fonction de la concentration attendue en microorganismes dans la suspension (Leyral, Joffin, 2001).

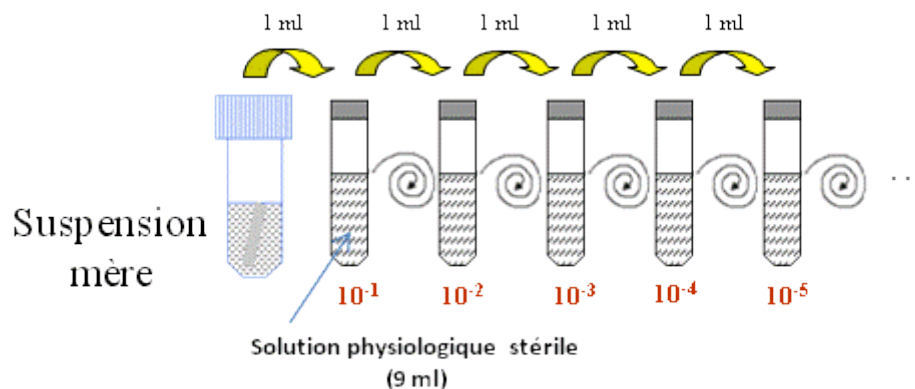


Fig.60 : Dilutions en cascades (Leyral, Joffin, 2001).

7.2.2. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale :

Le dénombrement de la flore aérobie totale est un indicateur de la qualité sanitaire globale d'un lait. Le dénombrement est réalisé sur gélose PCA (Plat Count Agar).

On prélève 1 ml de dilution 10^{-1} qui sera réparti en gouttes au fond de la boîte de Pétri. L'opération est renouvelée pour la deuxième boîte, et on continue de la même façon pour les autres boîtes jusqu'à la dilution 10^{-5} (Guiraud et Rosec, 2004 ; Dellaras, 2007).

Les gouttes sont ensuite recouvertes d'une couche de gélose PCA en surfusion, et le tout est homogénéisé avec des mouvements circulaires. On s'arrange pour que la gélose ne soit pas trop chaude de façon à ne pas tuer les bactéries. Une fois la gélose refroidie on met à incuber à 30°C pendant 72h (Guiraud et Rosec, 2004).

On considère que les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300. Au-dessus de 300 elles sont indénombrables, est en dessous de 30 on considère qu'elles sont trop rares pour être dénombrées.

Dénombrement par méthode directe :

Le comptage direct des colonies isolées est réalisé à partir des milieux gélosés, le nombre en unité UFC est donné par la formule suivante :

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1d}$$

Avec : N= nombre des Unités Formant Colonies (UFC/ml);

$\sum c$ = somme des colonies comptées sur les 2 boites de Pétri retenues ;

V= volume de l'inoculum utilisé (1 ml dans la masse, 0,1 ml en surface

d = dilution correspondant à la 1^{ère} boite de Pétri retenue, avec l'inoculum le moins dilué (selon la norme ISO 7218).

7.2.3. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux :

Le dénombrement a été réalisé sur 3 milieux différents à savoir VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar), désoxycholate et MacConkey.

a) Ensemencement dans un milieu VRBG :

On prélève 1 ml de dilution 10^{-1} qui sera réparti en gouttes au fond de la première boite de Pétri. L'opération est renouvelée pour la deuxième boite de dilution 10^{-2} et pour la troisième boite de dilution 10^{-3} .

Les gouttes sont ensuite recouvertes d'une couche de gélose VRBG en surfusion, et le tout est homogénéisé avec des mouvements circulaires. On s'arrange pour que la gélose ne soit pas trop chaude de façon à ne pas tuer les bactéries. Une fois la gélose refroidie on met à incuber à 37°C pendant 24h.

b) Ensemencement dans un milieu désoxycholate :

On applique une même méthode d'ensemencement que celle de la gélose VRBG et les mêmes conditions d'incubation.

c) Ensemencement dans un milieu MacConkey :

On applique une même méthode d'ensemencement que celle de la gélose VRBG mais l'incubation se fait à 44°C pendant 24h.

7.2.4. Recherche et dénombrement des staphylocoques :

Le dénombrement a été réalisé sur 2 milieux différents à savoir Chapman et Baird Parker.

a) Ensemencement sur milieu Chapman :

Le dénombrement a été réalisé sur milieu Chapman, en utilisant 3 dilutions différentes (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}).

On coule chacune des 3 boîtes de Pétri avec environ 15 ml de gélose Chapman fondue. Après solidification de la gélose, on ajoute respectivement, à chacune des boîtes un quantité de 0,1 ml de la dilution décimale correspondante. Puis on étale bien sur toute la surface de la boîte. Une fois les boîtes reposées on les incube à 37°C pendant 24 à 48 heures.

b) Ensemencement sur milieu Baird-Parker :

Le dénombrement a été réalisé sur milieu Baird-Parker, en utilisant 3 dilutions différentes (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}).

On coule chacune des 3 boîtes de Pétri avec environ 18 ml de gélose Baird Parker fondue. Après solidification de la gélose, on ajoute respectivement, à chacune des boîtes, 0,1 ml de la dilution décimale correspondante. Puis on étale bien sur toute la surface de la boîte. Une fois les boîtes reposées on les incube à 37°C pendant 24 à 48 heures.

7.2.4.1. Confirmation sur BHIB (bouillon cœur-cervelle):

On prend une colonie de staphylocoques à l'aide d'une anse de platine, en respectant la zone stérile et on l'introduit dans un tube de bouillon BHIB (5 ml) puis on incube pendant 24 heures à 37°C .

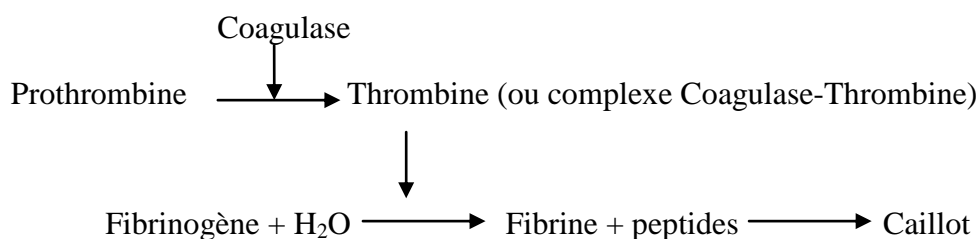
7.2.4.2. Test au plasma de lapin (coagulase) :

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable : la staphylocoagulase ou coagulase (Leyral et Joffin, 2001).

a) Principe :

La coagulase agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium, le complexe libère de la thrombine, enzyme active sur le fibrinogène, qui provoque la coagulation du plasma de lapin (Leyral et Joffin, 2001).

Les réactions se font selon le schéma suivant :



b) Technique :

Dans un tube à hémolyse stérile, on introduit 0,5 ml de plasma oxalaté et 0,5 ml d'une culture de 24 h en bouillon cœur-cerveau de la souche à étudier. On place le mélange à 37°C.

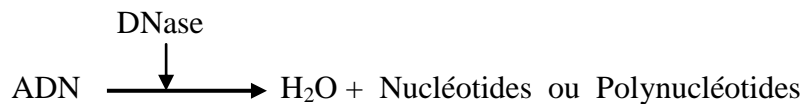
On effectue ensuite des lectures toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures.

7.2.4.3. Test de la DNase thermostable :

De nombreuses bactéries sont capables d'hydrolyser l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) . La mise en évidence chez un *Staphylococcus* d'une DNase thermostable suffit à l'identification de l'espèce *aureus* (Leyral et Joffin, 2001).

a) Principe :

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'ADN grâce à une enzyme : la DNase. La réaction catalysée est la suivante :



La mise en évidence pour un Staphylocoque d'une DNase thermostable (après chauffage à 100°C) suffit à l'identification de l'espèce *aureus*.

b) Technique :

Test réalisé en boîte de Pétri contenant un milieu avec ADN (Leyral, Joffin, 2001) .

On chauffe 15 min à 100°C une culture de 24h en bouillon cœur-cerveau (BHIB) du staphylocoque étudié. On laisse refroidir puis on remplit de bouillon un puits de 4 mm de diamètre environ, préalablement creusé dans la gélose, ensuite on incube pendant 24 h à 37°C. On réalise en parallèle un puits témoin négatif rempli de bouillon stérile et un puits rempli de bouillon non chauffé.

7.2.5. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :**- Sur milieu Slanetz :**

La culture des streptocoques est effectuée sur le milieu Slanetz que l'on a préparé par ajout de son additif, on réalise un ensemencement en surface. On coule le milieu Slanetz dans les boîtes de Pétri et après solidification de la gélose, on ajoute 3 gouttes (0,1 ml) de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) et on étale bien à l'aide d'un râtelier en verre. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 48 heures.

Pour le comptage, les boîtes de Pétri contenant des colonies rouges à marron et d'un diamètre supérieur à 0,5 mm sont retenues et doivent être considérées comme caractéristiques des streptocoques.

7.2.5.1. Test 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 (Leyral et Joffin, 2001).

Cette recherche se pratique en deux étapes :

Réalisation d'un test présomptif sur bouillon de Rothe suivi d'un test confirmatif sur bouillon de Litsky.

A partir de la dilution 10^{-1} , on a pris aseptiquement 1ml et on l'a versé dans un tube contenant 9 ml de milieu de Rothe, et on a mélangé l'inoculum dans le milieu, puis on l'a incubé à 37°C pendant 24 heures.

7.2.5.2. Test de confirmation (Eva Lytski):

Dans le cas où le test de présomption est positif (présence de trouble dans le tube), on fait un repiquage sur le milieu Eva Lytski et on incube à 37°C pendant 24 heures.

7.2.5.3. Recherche d'hémolyse par gélose au sang frais :

La lecture de l'hémolyse est un critère d'orientation, en particulier pour les streptocoques (Leyral et Joffin, 2001).

L'hémolyse se réfère à la répartition des érythrocytes ou globules rouges. En microbiologie, des bactéries peuvent être classées en fonction de leur capacité à induire une hémolyse sur un milieu de gélose au sang. Trois types d'hémolyse peuvent se produire et sont classés comme alpha, bêta et gamma hémolyse. Chaque type est caractérisé par les caractéristiques physiques et les différentiels des degrés variables de la lyse des cellules du sang du fait des hémolysines spécifiques, ou des produits chimiques qui provoquent une hémolyse, sécrétées par les bactéries particulières (Santé et maladie, 2015).

. α -hémolyse :

L'hémolyse alpha présente un changement de couleur dans la gélose d'abord rouge à une couleur vert très foncé. Ceci résulte de l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine par le peroxyde d'hydrogène sécrété par les bactéries. En outre, α -hémolyse n'entraîne pas de lyse complète des cellules sanguines et est donc souvent appelé hémolyse partielle ou incomplète (Santé et maladie, 2015).

. β - hémolyse :

L'hémolyse bêta se réfère à la lyse complète des cellules sanguines. Elle se présente comme une couleur jaune transparente sur le milieu de gélose au sang. Ce type d'hémolyse se produit en raison d'une enzyme produite par une bactérie appelée streptolysine. Cette enzyme interagit avec le cholestérol dans la membrane cellulaire et entraîne une détérioration de cette structure cellulaire protectrice (Santé et maladie, 2015).

. γ -hémolyse :

L'hémolyse Gamma est affichée par des bactéries qui n'induisent pas une hémolyse des cellules sanguines. Ces organismes sont appelés non hémolytiques et sont identifiables sur la base de l'absence de changement de couleur ou de transparence dans le milieu directement sous les colonies bactériennes (Santé et maladie, 2015).

Technique :

A partir d'une gélose de base au sang, à laquelle on a ajouté sur le champ 12,5 ml de sang frais prélevé sur un mouton de la ferme (pour éviter la coagulation), on a obtenu notre propre gélose au sang frais.

On a coulé par précaution une dizaine de boîtes que l'on a conservées au réfrigérateur pour éviter toute contamination.

Après avoir prélevé une colonie de l'ensemencement sur milieu Slanetz précédemment obtenu, on l'a ensemencée en surface de la gélose au sang par la méthode des stries dans une des boîtes préparées et on a incubé pendant 24 heures à 37°C.

7.2.5.4. Test de sensibilité à la bacitracine :

Quatre-vingt-quinze pour cent (95%) des souches de Streptocoques A sont sensibles à la bacitracine alors que seulement 4% des Streptocoques des autres groupes le sont. La recherche de la sensibilité à la bacitracine, en présence d'un Streptocoque bêta hémolytique, constitue un test d'orientation vers *S.pyogenes* (La Microbiologie, 2004).

Technique :

On ensemence massivement une gélose au sang avec souche prélevée sur milieu Slanetz. A l'aide d'une pince flambée, refroidie, on dépose un disque de bacitracine, dans la zone la plus dense de l'ensemencement. On incube à 37 °C pendant 24H.

8. Examen macroscopique :

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées : les colonies sont d'autant plus petites qu'elles sont rapprochées. La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies (Leyral, Joffin, 2001).

8.1. Aspect des colonies :

a) La taille :

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies.

Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant des micromètres oculaires (Leyral, Joffin, 2001).

b) La forme :

- Allure de contours (lisses, dentelés, déchiquetés, irréguliers) ;
- Relief (surface bombée, demi- bombée, plate) ;
- Centre (parfois surélevé, parfois ombiliqué (en creux)).

c) L'aspect de la surface :

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueuse, renvoyer la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

d) L'opacité :

Les colonies sont décrites comme :

- Opaques (ne laissent pas passer la lumière) ;
- Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli) ;
- Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre, on ne parle de gouttes de rosée (Leyral, Joffin, 2001).

e) La consistance :

Au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes) (Leyral, Joffin, 2001).

f) La couleur ou pigment :

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donne un aspect bien caractéristique à

la colonie (rose, jaune, rouge...), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu (Leyral, Joffin, 2001).

9. Examen microscopique :

9.1. Coloration de Gram :

La coloration de Gram est utilisée en microbiologie pour différencier les bactéries Gram positives et Gram négatives (Leyral et Joffin, 2001).

a) Technique :

La procédure de la coloration de Gram est donnée par le tableau n° 17.

Tableau 17 : Procédure de la coloration de Gram (Leyral et Joffin, 2001).

Étape	Procédure
Coloration par le violet de gentiane	On place le frottis fixé dans le flacon de violet de gentiane ; on laisse agir environ 1 mn ; on sort la lame.
Mordantage par le lugol	On recouvre le frottis de lugol ; on laisse agir environ 1mn ; on élimine l'excès de lugol et on rince la lame à l'eau distillée.
Décoloration par l'alcool	On recouvre le frottis d'éthanol et on laisse agir 10s ; on lave le frottis à l'eau distillée.
Recoloration par la fuchsine	On place le frottis dans le flacon de fuchsine ; on laisse agir 10s ; on sort la lame et on rince à l'eau distillée.
Séchage	On sèche la lame

b) Observations :

On examine à l'objectif x100, à l'immersion (avec une goutte d'huile), avec un éclairage important (diaphragme ouvert) (Leyral et Joffin, 2001).

On note :

- La morphologie.
- Indication sur la taille : taille moyenne, petite taille, grande taille
- Le Gram : bactéries à Gram positif (violet) ou à Gram négatif (rose)
- Le groupement : par 2, amas, chaînettes...

- La proportion de chaque type de bactéries (quand il y en a plusieurs...)

Il peut exister des situations intermédiaires en ce qui concerne la couleur des bactéries:

- "Gram faible" : bactéries à Gram positif qui se décolorent très facilement

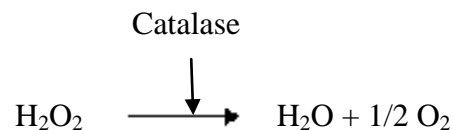
- "Gram variable" : présence dans une même souche de bactéries à Gram positif et de bactéries à Gram négatif.

- "Gram hétérogène" : différences d'intensité de coloration dans une même bactérie.

10. Recherche de la catalase :

a) Principe et intérêt :

Pendant leur respiration aérobie, 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 (Marchal et *al.*, 1991) :



La recherche de la catalase est un test fondamental pour l'identification des bactéries à Gram positif.

NB : pratiquement toutes les bactéries à Gram négatif sont catalase positif (+).

b) Technique :

On dépose une goutte de réactif, eau oxygénée (H_2O_2), sur une lame ; on dépose, à l'aide de l'anse de platine ou d'une pipette Pasteur boullée, une colonie isolée (ou plusieurs si petites colonies) de la souche à tester ; on observe l'apparition de bulles (Leyral et Joffin, 2001).

c) Résultats possibles :

- On obtient un dégagement gazeux, il y'a production d'oxygène (O_2) provenant de la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), la souche est de catalase positive (+).

- Absence de dégagement gazeux donc absence de production d'oxygène, la souche est de catalase négative (-) (Leyral et Joffin, 2001).

11. Recherche de l'oxydase :

a) Principe et intérêt :

Ce test est basé sur la production bactérienne d'enzyme oxydase intracellulaire. Les bactéries produisant l'enzyme oxydase oxyde ce réactif afin de former un composé violet la suspension devient alors violette après 30 à 60s si la couleur persiste pendant 15min environ le test est oxydase positive et si la coloration n'est pas modifiée le test est négatif (Delarras,2014).

La cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation. En présence d'oxygène ambiant, cette enzyme peut oxyder un substrat incolore en un produit facilement repérable car coloré.

La recherche de l'oxydase est un test fondamental pour l'identification des bacilles à Gram négatif (Leyral et Joffin, 2001).

b) Réactif :

Les substrats qui constituent le "réactif oxydase" peuvent être : de préférence l'oxalate de N-tétraméthyl paraphénylène diamine t ou de l'oxalate de N-diméthyl paraphénylène diamine (moins sensible) (Leyral et Joffin, 2001).

c) Technique :

Technique de l'oxydase par la méthode des disques : - On dépose un disque imprégné de réactif sur une lame, on l'imbibe avec une goutte d'eau distillée stérile. On prélève une colonie parfaitement isolée (plusieurs si petites colonies) avec une pipette Pasteur boulée et on l'écrase sur le disque pendant une dizaine de secondes. On observe immédiatement (Leyral et Joffin, 2001).

d) Résultats possibles :

- Apparition d'une coloration rose/violette, il y'a oxydation du réactif : la souche est oxydase positif (+) ;
- Absence de coloration rose/violette, pas d'oxydation du réactif : la souche est oxydase négatif (-).

12. Test TSI (Triple Sugar Iron):**12.1. Principe et intérêts :**

A l'aide d'une anse contenant des colonies prélevées, on ensemence la pente puis le culot d'un tube par piqûre centrale. L'incubation se fait à 30°C pendant 48 à 72h.

- Une coloration jaune de la pente indique un lactose positif.
- Une coloration jaune du Culot montre un glucose positif.
- Une coloration jaune de la zone intermédiaire indique un saccharose positif.

Ce test permet également la production de H₂S (noircissement de la zone joignant la pente et le culot) et de Gaz (bulles dans la gélose) (Marchal *et al.*, 1991).

C'est un milieu différentiel utilisé surtout pour distinguer les divers types de bactéries pathogènes entériques, bacilles gram (-). Il permet de détecter :

- La fermentation d'un des 3 sucres présents et ce, en surface et en profondeur dans le tube ;
- La production de gaz (au cours de la fermentation) ;
- La production de H₂S (gaz, sulfure d'hydrogène) ;

12.2. Interprétation des résultats possibles :

Trois résultats doivent être observés :

- Fermentation des sucres : la fermentation d'un des 3 sucres produit des composés acides qui font virer le milieu du rouge au jaune grâce au colorant *Rouge phénol*. Cette fermentation peut avoir lieu en surface (sur la pente de la gélose) et/ou en profondeur (dans le culot). Par convention, le résultat est noté sous forme de rapport : pente/culot = alcalin/acide= K/A avec K(alcalin) et A(acide).

Si un dépôt noir (voir production de H₂S) empêche de voir la couleur jaune ou rouge, on assume que le milieu est jaune (acide, A)

- Production de gaz : la fermentation peut être accompagnée de production de gaz qui se manifeste par des craques dans la gélose ou par le soulèvement de celle-ci.

- Production de H₂S : La production de H₂S se manifeste par l'apparition d'un dépôt noir dans la gélose.

13. Test de l'urée-indole :

Le milieu urée-tryptophane (urée-indole) est un milieu synthétique fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autres bactéries (Leyral et Joffin, 2001).

a) Intérêts :

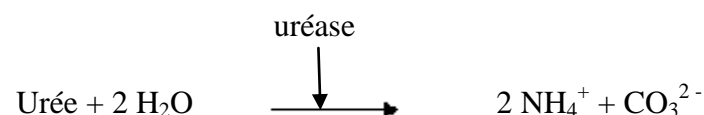
Le milieu urée-indole (UI) permet la recherche de trois activités enzymatiques (Leyral et Joffin, 2001) :

- L'uréase directement lisible par l'alcalinisation ;
- La tryptophane-désaminase (TDA) lisible, après addition de chlorure de fer III (FeCl₃), par un précipité ou coloration marron ;
- La production d'indole par un complexe tryptophane (indole révélé par le réactif de Kovacs).

b) Principe des différentes recherches :

- Mise en évidence de l'uréase :

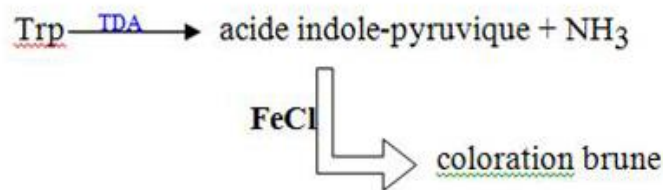
L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate.



Le carbonate d'ammonium ($\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$) va alcaliniser un milieu ensemencé avec une souche uréase (+). L'alcalinisation est mise en évidence grâce au rouge de phénol présent dans le milieu.

- Mise en évidence de la TDA :

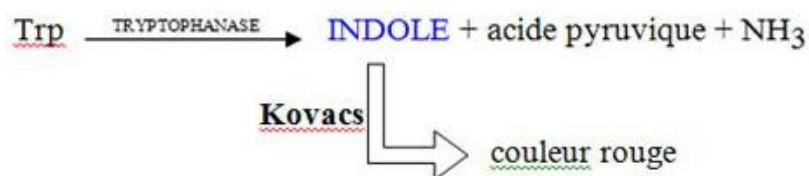
La tryptophane désaminase (TDA) est une enzyme qui dégrade (désamination) le tryptophane en acide indole-pyruvique et en gaz ammoniac (NH_3) (Leyral et Joffin, 2001).



L'acide indole-pyruvique est mis en évidence grâce à la coloration brune caractéristique qu'il donne avec le perchlorure de fer (FeCl_3).

- Mise en évidence de la production d'indole :

L'indole est le produit de l'hydrolyse du tryptophane par une enzyme, la tryptophanase. Il est mis en évidence grâce à la coloration rouge caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs (Leyral et Joffin, 2001).



14. Test ADH :

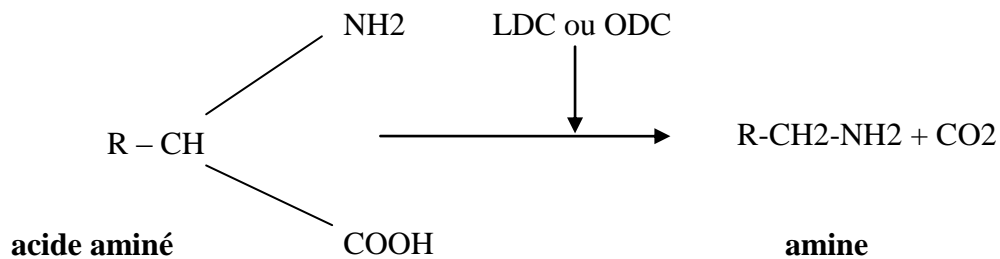
14.1. Mise en évidence des décarboxylases (LDC, ODC, ADH) :

La recherche des décarboxylases (LDC, ODC) et de l'arginine- dihydrolase (ADH) est d'une grande importance taxonomique pour la différenciation des entérobactéries et d'autre bacilles Gram négatif. Les deux types d'enzymes ont été rassemblés parce que leurs techniques de recherche sont identiques et ne permettent pas de distinguer, pour l'arginine,

décarboxylase de dihydrolase. Leurs caractéristiques sont cependant très différentes (Leyral et Joffin, 2001).

a) Principe :

Les décarboxylases bactériennes sont des enzymes qui catalysent les réactions de décarboxylation des acides aminés. (Leyral et Joffin, 2001)



Elles sont mises en évidence grâce aux produits alcalins formés (amines) détectés à l'aide d'un indicateur de pH. Trois de ces enzymes ont un intérêt pour l'identification bactérienne (différenciation des entérobactéries et autres bacilles à Gram négatif) (Tableau n°18):

- La lysine décarboxylase (**LDC**), l'ornithine décarboxylase (**ODC**) et l'arginine dihydrolase (**ADH**).

Tableau 18 : Les enzymes et l'identification bactérienne.

Substrats	Enzymes	Produits
Lysine	Lysine décarboxylase (LDC)	Cadavérine + CO ₂
Ornithine	Ornithine décarboxylase (ODC)	Putrescine + CO ₂
Arginine	Arginine dihydrolase (ADH)	Ornithine + CO ₂

b) Milieux :

Le milieu de culture utilisé est indiqué dans l'annexe n°1.

15. Test ONPG Hydrolase :

La recherche de la β -galactosidase est un des premiers tests enzymatiques réalisés en pratique. Il est particulièrement important pour les entérobactéries, à la mesure de la place du lactose dans l'étude de ces bactéries (Leyral et Joffin, 2001).

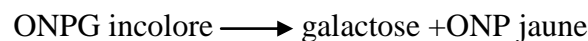
15.1. Recherche de la β -galactosidase :

a) Principe :

La dégradation du lactose par les micro-organismes passe par sa transformation en glucose. Elle n'est possible que si ces micro-organismes (bactéries) possèdent :

- une β -galactoside-perméase membranaire qui permet la pénétration du lactose au travers de la membrane plasmique (le lactose pénètre dans la bactérie grâce à une enzyme la **lactose perméase**) ;
- une β -galactosidase qui catalyse son hydrolyse en glucose et galactose (à l'intérieur de la bactérie, une autre enzyme, la **β -galactosidase**, scinde la molécule de lactose en glucose et galactose) (Leyral et Joffin, 2001).

Le test ONPG consiste à rechercher la présence de β -galactosidase. On utilise comme substrat, non pas le lactose, mais un autre β -galactoside l'ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG) qui présente l'avantage d'être hydrolysé en un produit coloré l'orthonitrophénol (ONP). Ceci est possible car la β -galactosidase n'est pas spécifique du lactose, mais des β -galactosides.



b) Technique :

Le test ONPG se fait sur milieu lactosé. On fait une suspension dense en eau physiologique (0,25 ml) de la souche à étudier, prélevée sur milieu de Kligler. On ajoute un disque imprégné d'ONPG. On place dans l'étuve à 37° C. On lit après 15 min, 30 min, 1h (jusqu'à 24 h) (Leyral et Joffin, 2001).

NB : plus la suspension est dense, plus la réaction sera rapide.

c) Résultats possibles :

On peut remarquer que plupart des réactions positives sont observées entre 15 et 30 mn.

- Il y'a apparition d'une coloration jaune, donc il y'a production d'ONP par hydrolyse de l'ONPG, d'où un test ONPG positif (+) : la souche est β -galactosidase positive (+) ;
- Pas d'apparition de coloration jaune, donc pas de production d'ONP par hydrolyse de l'ONPG, d'où un test ONPG négatif (-) : la souche est β -galactosidase négative (-) (Leyral et Joffin, 2001).

16. Tests RM (rouge de méthyle) et VP (Voges-Proskauer) :**a) Principe des 2 tests :**

Ces deux tests sont réalisés en milieu de Clark et Lubs, ce qui permet de faire l'étude des produits de fermentation du glucose (différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique »).

- Test RM :

Le test au rouge de méthyle, test ancien, nécessitant 48 heures d'incubation, est d'un intérêt taxonomique limité. Il permet de préciser l'évolution du pH en milieu glucosé (Leyral et Joffin, 2001).

Ce test est réalisable en 24 heures à la condition que le milieu de Clark et Lubs utilisé soit sous un faible volume, donc convenablement aéré et susceptible de bien libérer le gaz carbonique (CO₂) produit. Cela laisse supposer que :

- les bactéries RM (+) sont des bactéries produisant des acides organiques relativement forts (acide éthanoïque...) par la voie des acides mixtes ;
- les bactéries RM (-) sont des bactéries produisant des acides organiques relativement faibles et plutôt du CO₂ par la voie butane-diolique (Leyral et Joffin, 2001).

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

-Test VP :

Les micro-organismes excrètent de nombreuses substances, déchets de leur métabolisme. Parmi ces substances, l'acétoïne (ou 3-hydroxybutanone), produit d'une voie particulière de fermentation du glucose et du pyruvate, fait l'objet d'une recherche (Leyral et Joffin, 2001).

La réaction du VP est particulièrement utile à l'identification différentielle des bactéries pour le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia* des entérobactéries généralement VP (+), pour des *Streptococcus* et des *Bacillus* (Leyral et Joffin, 2001).

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne au cours de la fermentation butylène glycolique. En présence d'une base forte (soude ou potasse) et d'α-naphтол, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné.

Remarque : le test VP est beaucoup plus spécifique que le test RM qui ne donne qu'une idée globale du métabolisme.

b) Technique :

On ensemence un milieu Clark et Lubs avec quelques gouttes de suspension bactérienne et on étuve 24 à 48 heures à 37°C. Après vérification de la culture (présence de trouble du milieu), on réalise les tests. La procédure et les résultats possibles sont donnés par le tableau n°19.

Tableau 19 : Technique RM et VP en milieu de Clark et Lubs (Leyral et Joffin, 2001).

Technique	Résultats possibles
<p><u>Test RM :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - On transfère à l'aide d'une pipette Pasteur environ 0,5 ml de milieu Clark et Lubs dans un tube à hémolyse (non stérile) ; - On ajoute 1 goutte de rouge de méthyle puis on bouche le tube avec du coton cardé. 	<p>Coloration rouge :</p> <ul style="list-style-type: none"> - il y'a fermentation du glucose par la voie des acides mixtes (production d'acides forts) : souche RM (+). <p>Pas de coloration rouge :</p> <ul style="list-style-type: none"> -il n'y a pas de fermentation du glucose par la voie des acides mixtes : souche RM(-).

<p><u>TEST VP :</u></p> <p>-On transfère dans un tube à hémolyse (non stérile), à l'aide d'une pipette Pasteur, environ 0,5 ml de milieu Clark et Lubs; on ajoute, volume à volume, la soude et l'a-naphtol (environ 0,5 ml de chaque réactif) ;</p> <p>-On bouche le tube avec du cordon cardé, on agite et on incline le tube pour favoriser l'oxygénation du milieu ;</p> <p>- On attend 10 min avant de conclure à un résultat négatif.</p>	<p>Coloration rouge (en surface) :</p> <p>- il y'a fermentation du glucose par la voie butylène glycolique avec production d'acétoïne : souche VP (+).</p> <p>Pas de coloration rouge :</p> <p>- il n'y a pas de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique (pas de production d'acétoïne) : souche VP (-).</p>
--	--

17. Test Mannitol-mobilité :

a) Principe :

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité (Marchal *et al.*, 1991).

Ce test permet de lire :

- **La fermentation du mannitol** : Les bactéries mannitol (+) acidifient le milieu qui vire au jaune (teinte du rouge de phénol en milieu acide). L'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est en général insuffisante pour permettre le virage de l'indicateur, du fait de l'importance du pouvoir tampon du milieu. Ce milieu convient donc mieux à l'étude des bacilles à Gram négatif fermentatifs (Leyral et Joffin, 2001).

- **La mobilité** : du fait de la faible teneur en agar du milieu, les bactéries mobiles peuvent s'y déplacer : - les bactéries mobiles troublent le milieu ;

- les bactéries immobiles persistent près de la piqûre centrale (Leyral et Joffin, 2001).

b) Technique :

On ensemence les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et on incube à 30° C pendant 18 à 24 h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Marchal *et al.*, 1991).

Résultats possibles :

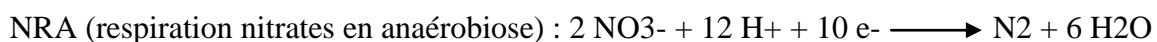
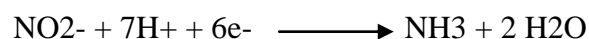
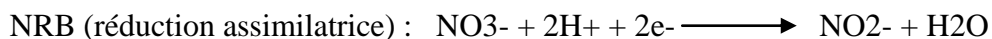
- **Pour le mannitol** : si l'indicateur rouge de phénol (RP) vire au jaune, la souche est mannitol (+) et s'il ne vire pas au jaune, la souche est mannitol (-) ;

- **Pour la mobilité** : si la souche diffuse dans toute la gélose à partir de la piqure (trouble), alors la souche est mobile et s'il n'y a pas de diffusion alors la souche est immobile.

18. Test Nitrate réductase : (Recherche des nitrate-réductases)

a) Principe :

Les bactéries peuvent utiliser les nitrates de deux façons soit par une réduction des nitrates en nitrites puis en ammoniac (NH₃), c'est la nitrate réductase de type B (NRB), soit par une réduction des nitrates en azote (N₂), c'est la nitrate réductase de type A (NRA) selon les réactions chimiques suivantes (Leyral et Joffin, 2001) :



b) Technique :

On ensemence un bouillon nitraté avec deux gouttes de suspension bactérienne. On étuve 24 heures à 37°C puis on ajoute 5 gouttes de chacun des réactifs nitrite 1 et 2. On observe l'apparition d'une coloration rouge, sinon, on additionne une pointe de spatule de poudre de zinc, on agite, on incline le tube et on attend 5 mn puis on observe.

On utilise deux types de réactifs pour la mise en évidence des nitrites, l'acide sulfanilique (« nitrite 1 » ou Griess 1) et l'a-naphtylamine (« nitrite 2 » ou Griess 2) en solution dans l'acide éthanoïque (Leyral et Joffin, 2001).

- Résultats possibles :

La recherche consiste à mettre dans un premier temps, en évidence la présence éventuelle de nitrites à l'aide des réactifs "nitrite 1" et "nitrite 2" par la coloration rouge caractéristique.

S'il y a apparition d'une coloration rouge, la nitrate réductase (NR) est positive au stade nitrites.

En l'absence de nitrites, on cherche à réduire les nitrates par addition de poudre de zinc (le zinc réduit les nitrates en nitrites) : $\text{NO}_3^- + \text{Zn} + 2 \text{H}^+ \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{O}$

S'il y a apparition d'une coloration rouge : production de nitrites provenant de la réduction des nitrates, encore présents, par le zinc. Ils n'avaient donc pas été réduits par les bactéries : souche nitrate réductase négative, NR (-)

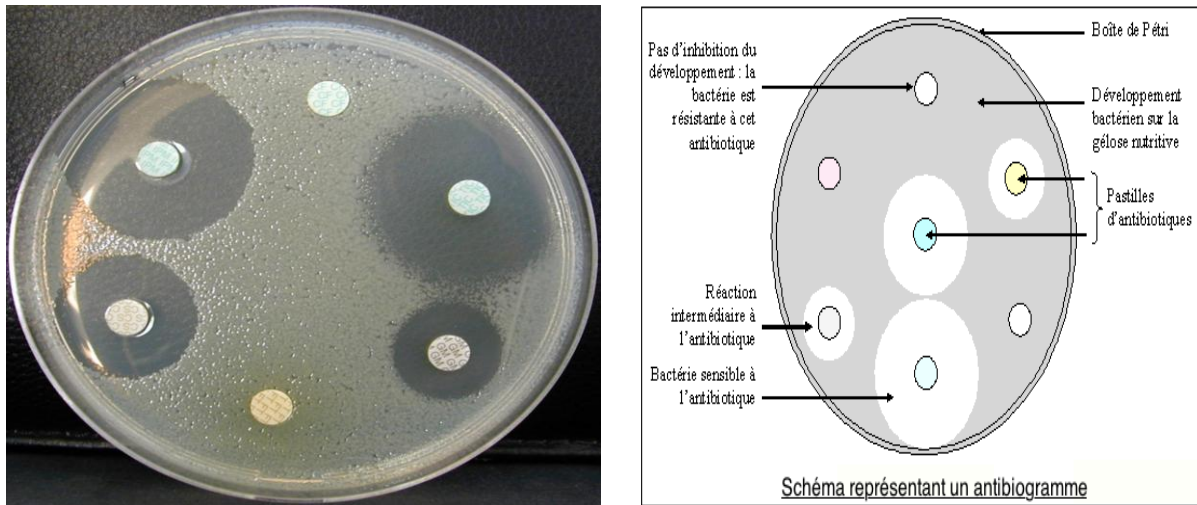
S'il n'y a pas apparition d'une coloration rouge : il n'y avait plus de nitrates dans le milieu, ils avaient donc été réduits par les bactéries, au-delà du stade nitrites: souche nitrate réductase positive, NR(+) au stade azote.

19. Antibiogramme :**a) Principe :**

L'antibiogramme est une méthode servant à déterminer la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques. Il est particulièrement utile lorsqu'on se rend compte qu'un antibiotique n'est plus efficace pour guérir une infection ou encore lorsqu'on veut choisir un antibiotique approprié dès le début du traitement et que l'on n'est pas certain de l'identité de la bactérie responsable de l'infection.

Le principe est simple : des papiers-buvards imbibés de quantités connues de divers antibiotiques sont déposés à la surface d'une culture fraîchementensemencée. Si la bactérie est sensible, une zone d'inhibition de croissance sera observée autour du papier-buvard (figure n°61). Des normes internationales standardisées nous permettent de déterminer, selon la

grandeur du diamètre de la zone d'inhibition, si la bactérie est résistante, moyennement sensible ou très sensible à l'antibiotique.



(a)

(b)

Fig.61 : (a) Antibiogramme, (b) schéma montrant les différentes parties d'un antibiogramme.

b) Technique :

- À l'aide d'un écouvillon, on prélève un échantillon de la bactérie inconnue et on l'ensemence sur une gélose Mueller Hinton (MH) de façon à former un tapis bactérien.
- À l'aide de pinces stérilisées (flambées à l'alcool) et/ou d'un distributeur automatique, on dispose les disques d'antibiotiques sur la gélose : ils doivent être placés en périphérie (1,0 cm du bord) et à au moins 2,0 cm les uns des autres.
- À l'aide de pinces stérilisées, on appuie légèrement sur les disques de papier pour qu'ils adhèrent bien à la surface de la gélose (sans pour autant qu'ils s'y enfoncent).
- On incube selon les conditions appropriées pendant 24 heures.

c) Lecture des résultats :

- On mesure le diamètre (en mm) de chacune des zones d'inhibition de croissance.
- À l'aide des valeurs standardisées (Annexe n°2), on détermine le degré de sensibilité de la bactérie aux antibiotiques testés (sensible, moyennement sensible ou résistante).

20. Technique d'identification PCR :

PCR est l'abréviation de l'expression anglaise *Polymerase Chain Reaction* ou Réaction en Chaîne par Polymérase (Poitras et Houde,2002).

À partir d'un échantillon complexe et peu abondant (par exemple une goutte de sang), cette technique permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Elle s'applique directement à l'échantillon à analyser, supprimant ainsi les délais de mise en culture et les problèmes liés aux germes non cultivables. Elle est beaucoup plus rapide et automatisable (Poitras et Houde,2002) .

La PCR est une technique fondamentale dérivée des connaissances du mécanisme moléculaire de réplication de l'ADN, et des propriétés de dénaturation-renaturation de l'ADN. Elle permet l'amplification de toute séquence d'ADN de 1 à 10^9 copies. Elle se fait en différentes étapes :

- Ajout dans le milieu réactionnel de l'ADN à amplifier, des amorces correspondantes, des désoxy-ribonucléotides-triphosphates (dNTP) et des ADN-polymérase.
- Les molécules d'ADN à amplifier sont alors associées brins à brins de manière complémentaire. Pour dissocier ces brins il sera nécessaire d'augmenter la température jusqu'à 95°C pour être sûr que toutes les molécules soient entièrement dénaturées.
- Puis la température est diminuée jusqu'à $T_m-5^{\circ}\text{C}$ ($\approx 55^{\circ}\text{C}$) afin de permettre l'association des simples brins d'ADN avec les amorces.
- Une fois les amorces fixées, l'ADN complémentaire est synthétisée par l'ADN-polymérase en utilisant les dNTP (biologie moléculaire, 2010).

Nous avons soumis la souche de Staphylocoque isolée à partir de l'échantillon de lait de la ferme 1 à une identification par PCR dans un laboratoire spécialisé DIAG-GENE, Angers (France).

Pour réaliser cette technique, nous avons effectué une opération préalable qui consiste à extraire l'ADN du germe à identifier par la méthode du choc thermique. Cette dernière a été réalisée par mes propres soins au niveau du laboratoire LSTPA.

On place une colonie du germe dans un tube avec 100 μl d'eau stérile, on chauffe le tube pendant 15 mn, puis on le met dans la glace pendant 15 mn, ensuite on le congèle à -20°C . L'ADN ainsi extraite va subir, au niveau du laboratoire d'analyse par PCR, une amplification par des amorces spécifiques.

Méthode : La souche a été passée avec un système PCR multiplex qui se base sur une PCR avec 3 couples d'amorces :

- Les amorces 16S : spécifiques des bactéries ;
- Les amorces Nuc : spécifiques du *Staphylococcus aureus* ;
- Les amorces MecA : pour montrer la présence de résistance aux antibiotiques.

Chapitre V

Résultats et Discussion

21. Résultats et discussion :

21.1. Indice de propreté et hygiène au niveau des 2 fermes :

Tableau 20 : Propreté et hygiène, indices comparatifs entre les 2 fermes.

	Ferme de Hassi-Mamèche	Ferme de Hadjadj
Locaux	Bien entretenus (nettoyage et chaulage)	Mal entretenus (manque nettoyage)
Litières	Paille régulièrement changée	Souvent humides, proximité des caniveaux sales
Abreuvement (eau)	Automatique, renouvelée plusieurs fois/jour	Provient du robinet d'alimentation ADE
Matériel de traite	Nettoyé, bien entretenu	Nettoyage et entretien insuffisants
Tenues de travail	Utilisées + bottes	Négligées
Vaches	Propres	Ne sont pas propres

21.2 Résultats de l'analyse microbiologique pour la ferme de Hassi-Mamèche :

21.2.1. Résultats de la recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) :

- Ensemencement sur le milieu PCA :

Après 72H d'incubation nous avons obtenu des colonies blanches pour les 4 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) et absence pour la dilution 10^{-5} , la densité des colonies va en diminuant avec la diminution de la dilution (figures n°62 et 63).

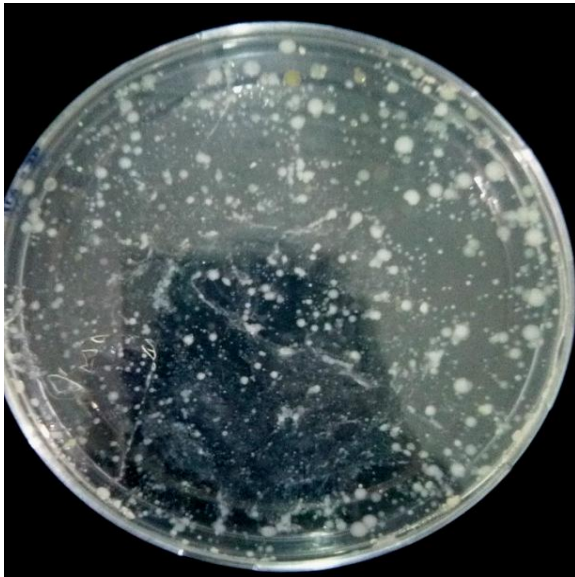


Fig.62: Colonies bactériennes blanches,
dilution 10^{-1}

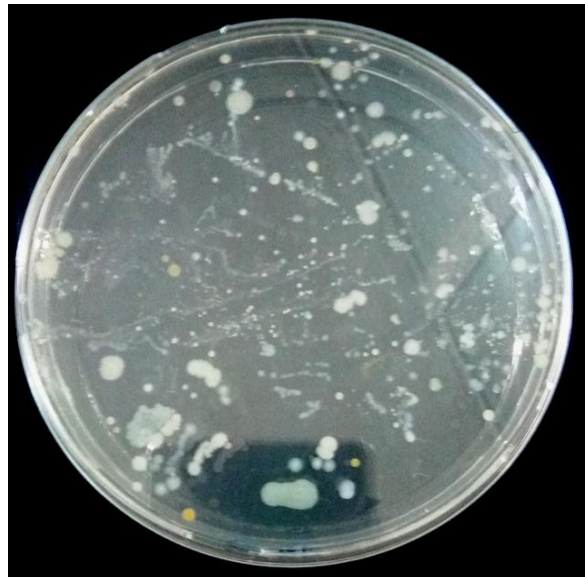


Fig.63: Colonies bactériennes blanches,
dilution 10^{-2}

Interprétation : La charge élevée de bactéries (FMAT) montre une contamination du lait.

21.2.2. Résultats de la recherche de Coliformes fécaux :

- **Ensemencement sur le milieu VRBG :** Après 24H d'incubation nous avons obtenu des colonies violettes pour les 3 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (figures n°64 et 65).

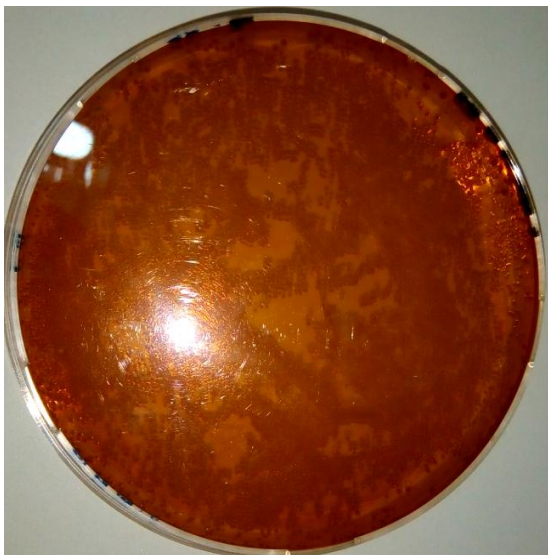


Fig.64 : Colonies bactériennes violettes,
dilution 10^{-1}

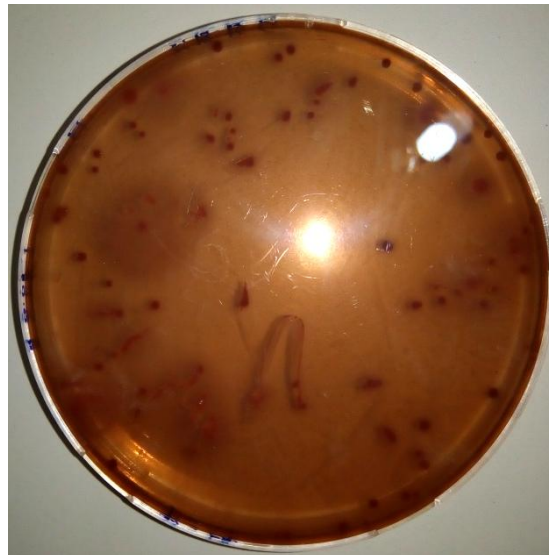


Fig.65: Colonies bactériennes violettes,
dilution 10^{-2}

Interprétation : La présence de coliformes est un signe de manque d'hygiène.

21.2.3. Résultats de la recherche de Staphylocoques :

21.2.3.1. Ensemencement sur le milieu Chapman :

Après 24H d'incubation nous avons obtenu des colonies dorées pour les 3 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (figures n°66 et 67).



Fig.66: Colonies bactériennes dorées,
dilution 10^{-1}

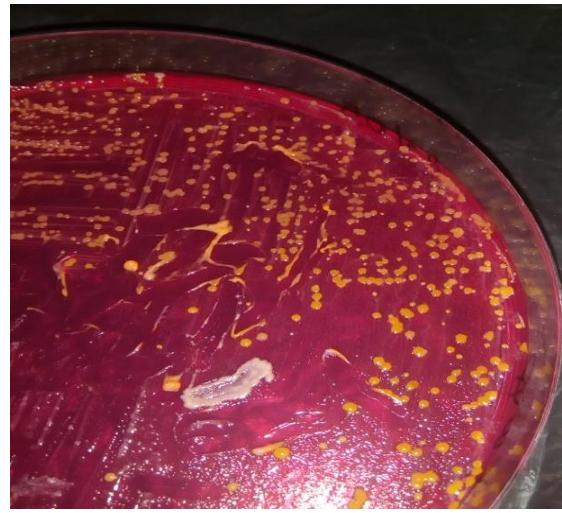


Fig.67: Colonies bactériennes dorées,
dilution 10^{-2}

21.2.3.2. Ensemencement sur le milieu Baird-Parker :

Nous avons ensemencé une seule boîte de Pétri de dilution 10^{-1} par manque de produit.

Après 24H d'incubation nous avons obtenu des colonies noires qui ne sont pas entourées par des halos (figure n°68).

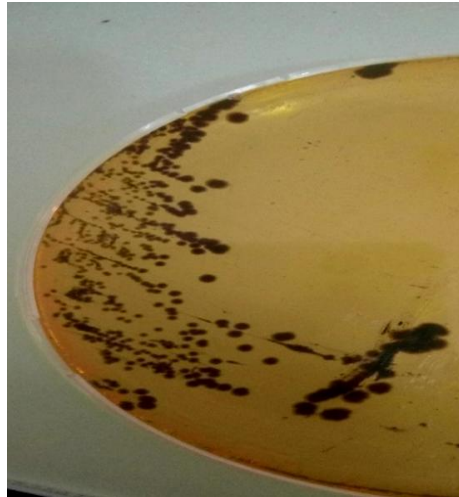


Fig.68: Colonies bactériennes noires, dilution 10^{-1}

Interprétation : la présence de germes de type Staphylocoques est un signe de maladie car les Staphylocoques , germes majeurs sont à 70% responsables des mammites.

21.2.3.3. Résultats des tests :

a) - Confirmation sur BHIB (bouillon cœur cerveau) :

La figure n°69 montre la présence d'un trouble bactérien dans le tube M (échantillon 1)

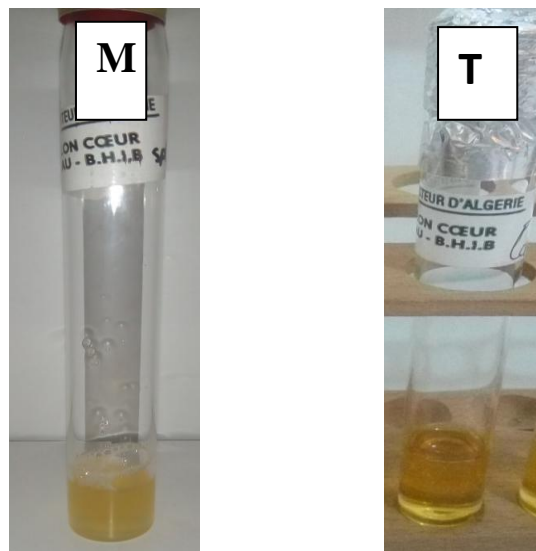


Fig. 69: Résultat du test BHIB, M : échantillon 01, dilution 10^{-1} et T : échantillon témoin

Interprétation : Ce test confirme la présence de Staphylocoques.

b)- Test au plasma de lapin (coagulase):

La figure n°70 montre un résultat négatif (pas de coagulation) ce qui confirme que le staphylocoque n'est pas de type aureus .



Fig.70: Absence de coagulation dans M : l'échantillon 01 est de coagulase négative (-).

Interprétation: La coagulase négative nous assure que ce staphylocoque n'est pas de type *S.aureus* et par conséquent il ne peut s'agir que d'un staphylocoque à coagulase négative .

c)- Test de la DNase thermostable :

Après une incubation de 24 h on observe un résultat positif (culture bactérienne) dans le puits du bouillon (BHIB) non chauffé et un résultat négatif dans le puits du bouillon chauffé, le puits témoin (BHIB stérile) reste sans changement (figure n°71)

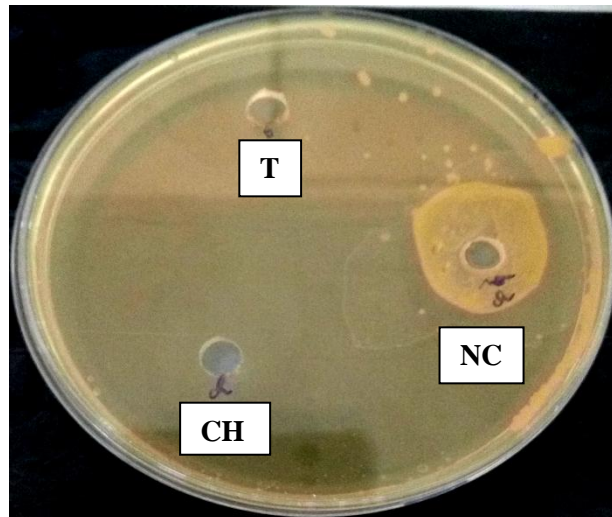


Fig.71 : NC : puits non chauffé (+), CH: puits chauffé (-), T: puits témoin.

Interprétation : Le résultat obtenu montre que le *Staphylocoque* n'a pas une DNase thermostable ce qui confirme qu'il ne s'agit pas du *S.aureus*.

d)-Test de Catalase :

La figure n° 72 montre une réaction effervescente (dégagement de gaz) donc la bactérie possède une catalase positive (+).



Fig.72 : Test de catalase (+), pour les staphylocoques (a) avant la réaction et (b) après la réaction.

e)-Test d'oxydase :

La figure n°73 possède une

montre que la bactérie oxydase négative (-).

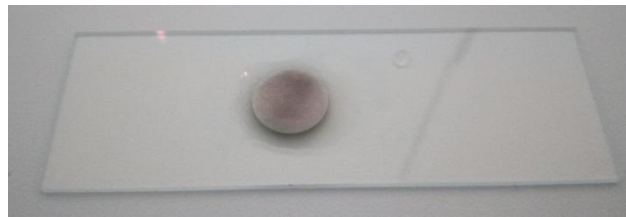
**(a)****(b)**

Fig.73: Test d'oxydase négatif (-), pour les staphylocoques (a) avant la réaction et (b) après la réaction.

Interprétation : Une catalase positive et une oxydase négative sont la preuve qu'il s'agit d'un staphylocoque.

21.2.4. Résultats de la recherche de Streptocoques fécaux :**a) - Ensemencement sur le milieu Slanetz :**

Après 48H d'incubation nous avons obtenu des colonies roses pour les 2 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} ,) et absence de colonie pour la dilution 10^{-3} (figures n°74 et 75).

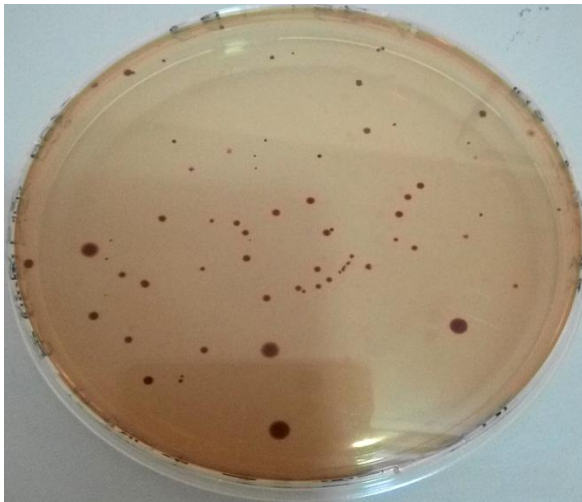


Fig.74 : Colonies bactériennes roses,
dilution 10^{-1}

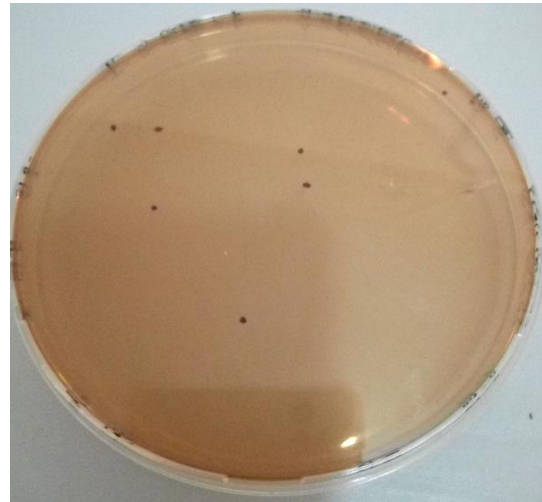


Fig.75 : Colonies bactériennes roses,
dilution 10^{-2}

Interprétation : La présence de Streptocoques fécaux est en rapport avec le manque d'hygiène du lieu d'hébergement, et possibilité de contamination fécale pour la vache.

b) - Test de présomption : La figure n°76 (a et b) montre la présence d'un trouble bactérien dans le tube M (échantillon1).

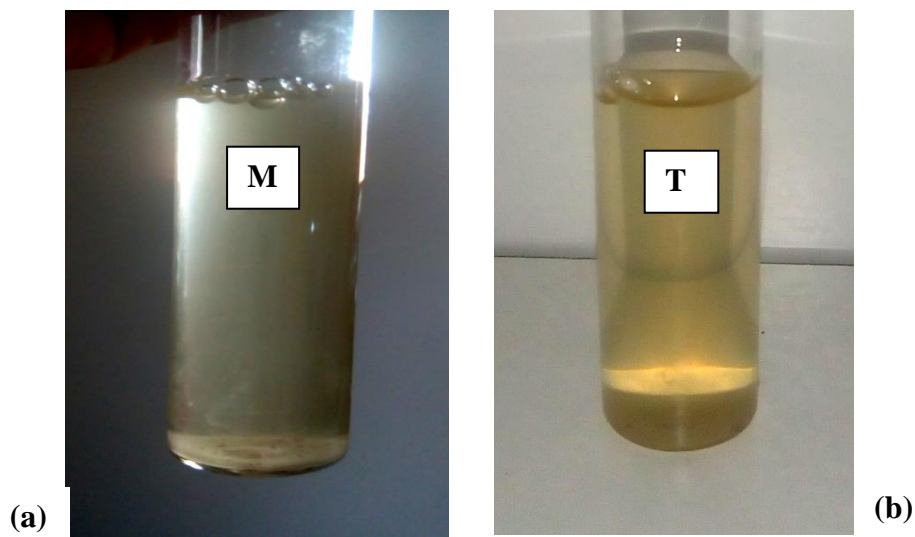


Fig.76 (a,b) : Test de présomption , M: échantillon 01,trouble , T : tube témoin (Rothe).

c)-Test de confirmation (Eva Lytski) :

La figure n°77 montre qu'il y a présence d'un trouble bactérien dans le tube M (échantillon1).

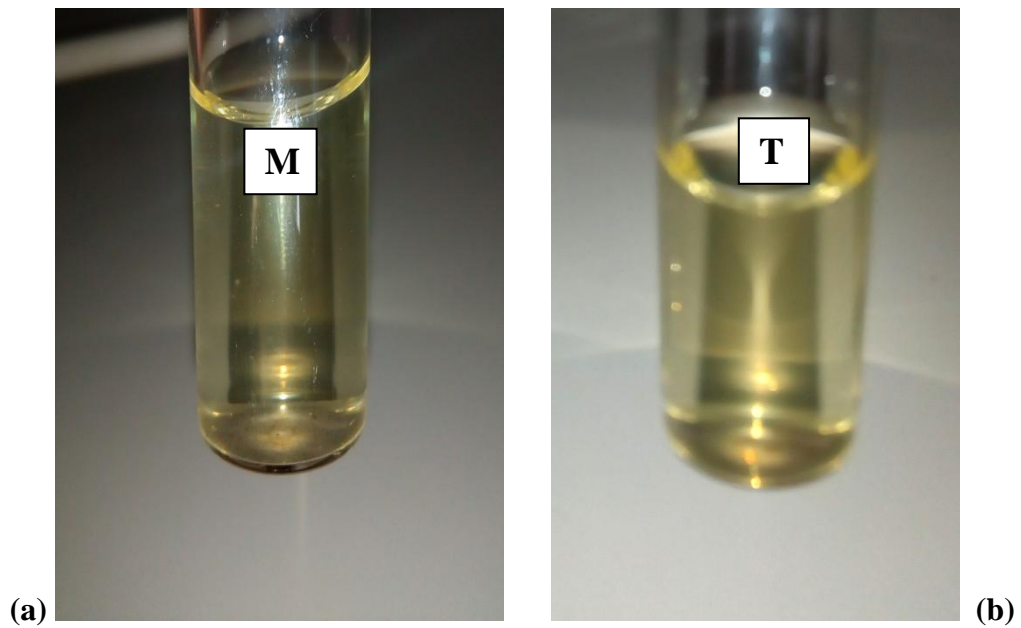


Fig.77 (a, b) : Test de confirmation des streptocoques fécaux, M: échantillon 01(présence de trouble) , T : tube témoin

Interprétation : Les 2 tests confirment la présence des Streptocoques fécaux.

d)-Recherche d'hémolyse par gélose au sang frais :

Après 24H d'incubation nous avons obtenu des zones hémolytiques de couleur jaune (β - hémolyse) (figure n° 78).

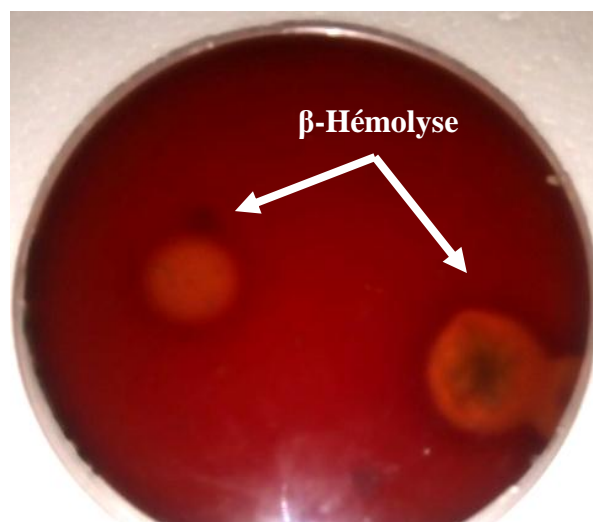


Fig.78 : Zones hémolytiques sur gélose au sang

Interprétation : Ce test précise le type d'hémolyse (béta hémolyse) donc le Streptocoque appartient au groupe A ou B.

e) -Test de sensibilité à la bacitracine :

Après 24H d'incubation nous pouvons observer des zones d'inhibition de diamètre 30 mm ce qui montre que la bactérie concernée est sensible à la bacitracine (figure n°79).

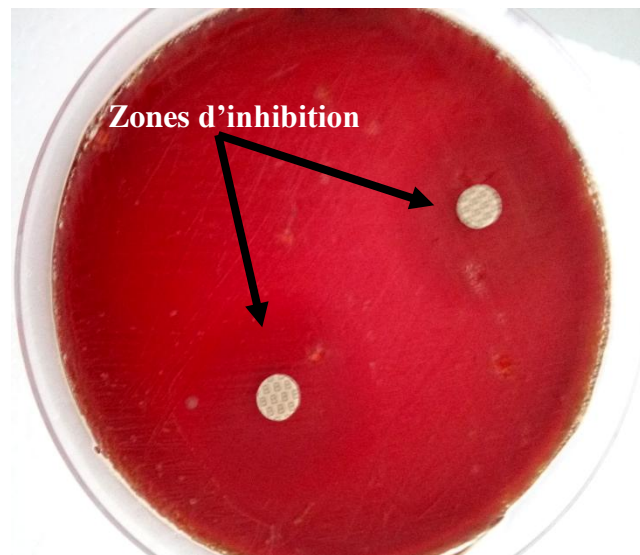


Fig.79: Zones d'inhibition des streptocoques à la bacitracine.

Interprétation : La sensibilité à la bacitracine précise que le Streptocoque concerné appartient au groupe A donc c'est un *S.pyogène*.

f)-Test de Catalase :

La figure n°80 montre l'absence de dégagement de gaz, ce qui indique que la bactérie possède une catalase négative(-).

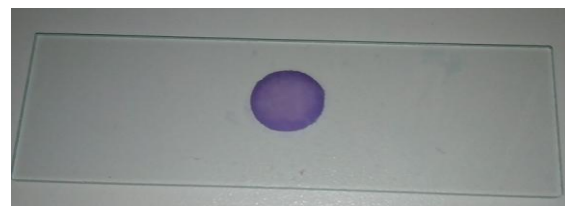


Catalase(-)

Fig.80 : test de catalase(-), pour les streptocoques.

g)-Test d'oxydase :

La figure n°81 montre que la bactérie possède une oxydase positive (+).



Oxydase (+)

Fig.81 : test d'oxydase positive pour les streptocoques.

Interprétation : Une catalase négative et une oxydase positive sont la preuve qu'il s'agit d'un streptocoque.

21.2.5. Résultats de dénombrement des germes pathogènes :

-Les résultats sont résumés dans les tableaux n°21, 22 ,23 et 24.

Tableau 21 : Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale sur milieu PCA (colonies/ml).

Dilutions Milieu	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
PCA	En nappe	En nappe	50	10	Absence

Tableau 22: Dénombrement des staphylocoques sur milieu Chapman (colonies/ml).

Dilutions Milieu	10⁻¹	10⁻²	10⁻³
Chapman	En nappe	180	74

Tableau 23 : Dénombrement des coliformes fécaux sur milieu VRBG (colonies/ml).

Dilutions Milieu	10⁻¹	10⁻²	10⁻³
VRBG	En nappe	120	10

Tableau 24 : Dénombrement des streptocoques sur milieu Slanetz (colonies/ml).

Dilutions Milieu	10⁻¹	10⁻²	10⁻³
Slanetz	72	10	Absence

21.3. Résultats de l'analyse microbiologique pour la ferme de Hadjadj :

21.3.1. Résultats de la recherche de la flore mésophile aérobie totale :

Ensemencement sur le milieu PCA :

Après 72H d'incubation nous avons obtenu des colonies blanches pour les 5 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), la densité des colonies va en diminuant avec la diminution de la dilution (figures n° 82 et 83).



Fig.82:Colonies bactériennes blanches,

dilution 10^{-1}



Fig.83: Colonies bacteriennes blanches,

dilution 10^{-3}

Interprétation : La charge élevée de bactéries (FMAT) montre une contamination du lait.

21.3.2. Résultats de la recherche de Coliformes fécaux :

-Ensemencement sur les milieux VRBG et Désoxycholate :

Après 24H d'incubation nous avons obtenu des colonies violettes pour les 3 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) comme le montrent les figures n°84 et 85 pour le milieu VRBG et la figure n°86 pour le milieu Désoxycholate.

**Fig.84 :** Colonies bactériennes sur milieuVRBG , dilution 10^{-1} **Fig.85 :** Colonies bactériennes sur milieuVRBG dilution 10^{-2} **Fig.86:** Colonies bactériennes sur
milieu désoxycholate, dilution 10^{-2}

Interprétation : La présence de coliformes est un signe de manque d'hygiène.

21.3.3. Résultats de la recherche de Staphylocoques :

21.3.3.1. Ensemencement sur le milieu Chapman :

Après 24H d'incubation nous avons obtenu des colonies dorées pour les 3 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (figures n°87 et 88).

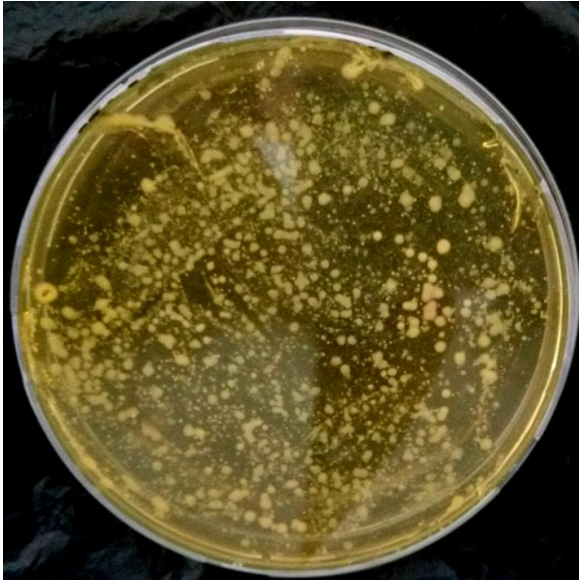


Fig.87: Colonies bactériennes dorées,
dilution 10^{-1}



Fig.88: Colonies bactériennes dorées,
dilution 10^{-2}

Interprétation : la présence de germes de type Staphylocoques est un signe de maladie car les Staphylocoques , germes majeurs sont à 70% responsables des mammites.

21.3.3.2. Résultats des tests :

a) -Confirmation sur BHIB (bouillon cœur cerveau) : La figure n°89 (a, b) montre la présence d'un trouble bactérien dans le tube B (échantillon 02)

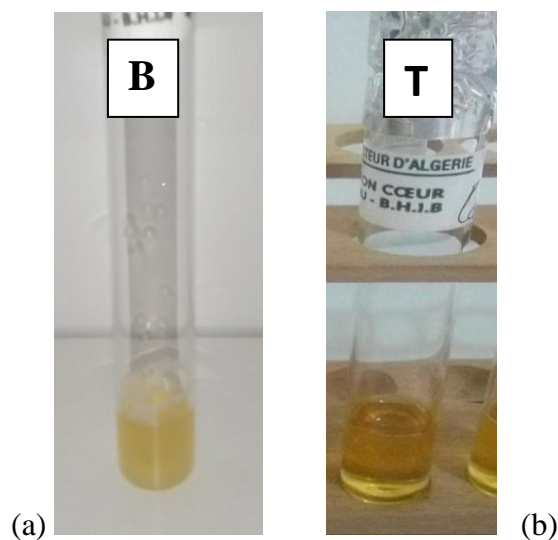


Fig.89 : Résultat du test BHIB, B: échantillon 02, (présence de trouble), dilution 10^{-1} et T : échantillon témoin.

Interprétation : Ce test confirme la présence de Staphylocoques.

b)- Test au plasma de lapin (coagulase): La figure n°90 montre un résultat positif (coagulation, le liquide devient gélatineux) ce qui confirme que le staphylocoque est de type *S.aureus* .

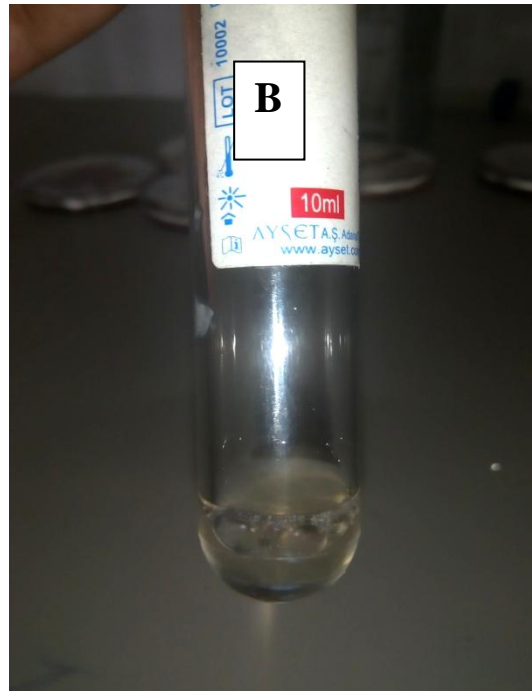


Fig.90: B : l'échantillon 02 est de coagulase positive (+).

Interprétation: Puisque la coagulase est positive, il est probable que le Staphylocoque soit du type *S. aureus*.

c)- Test de la DNase thermostable :

Après une incubation de 24 h on observe un résultat positif (culture bactérienne) dans le puits du bouillon (BHIB) non chauffé et un résultat positif dans le puits du bouillon chauffé, et même le puits témoin (BHIB stérile) présente un changement ce qui suppose la présence de *staphylococcus aureus* (figure n°91).

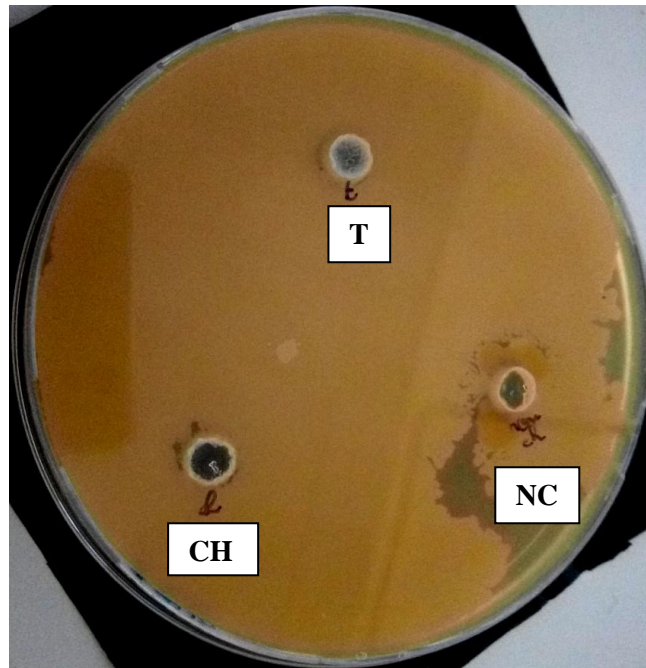


Fig.91 : NC : puits non chauffé (+), CH : puits chauffé (+), T : puits témoin (+).

Interprétation : le résultat obtenu montre que le Staphylocoque a une DNase thermostable, ce qui confirme la présence de *S.aureus*.

d)- Test de Catalase :

La figure n°92 montre une réaction effervescente (dégagement de gaz), d'où la bactérie possède une catalase positive (+).

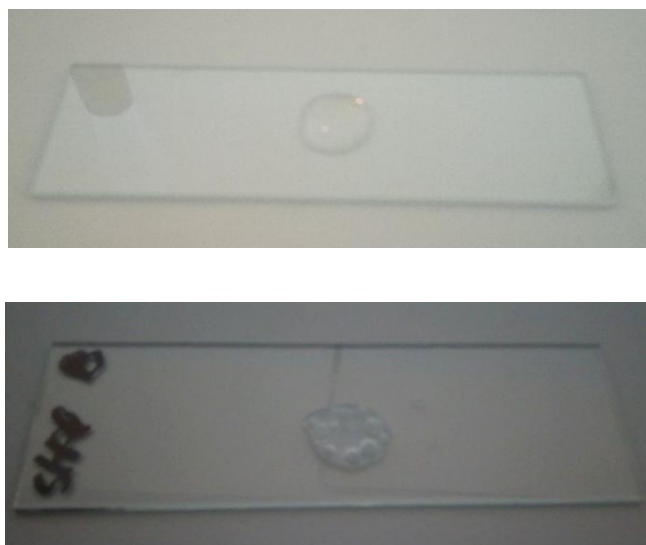


Fig.92 : Test de catalase(+), pour les staphylocoques.

e)- Test d'oxydase :

La figure n°93 montre que la bactérie possède une oxydase négative (-).



Fig.93 : Test d'oxydase négatif (-), pour les staphylocoques

Interprétation : Une catalase positive et une oxydase négative sont la preuve qu'il s'agit d'un staphylocoque.

21.3.4. Résultats de la recherche de Streptocoques fécaux :**a) - Ensemencement sur le milieu Slanetz :**

Après 48H d'incubation nous avons obtenu des colonies blanches pour les 3 dilutions

(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) (Figures n°94 et 95).

Remarque : la couleur des colonies devrait être rose mais comme il y a un problème d'additif la couleur a viré au blanc.

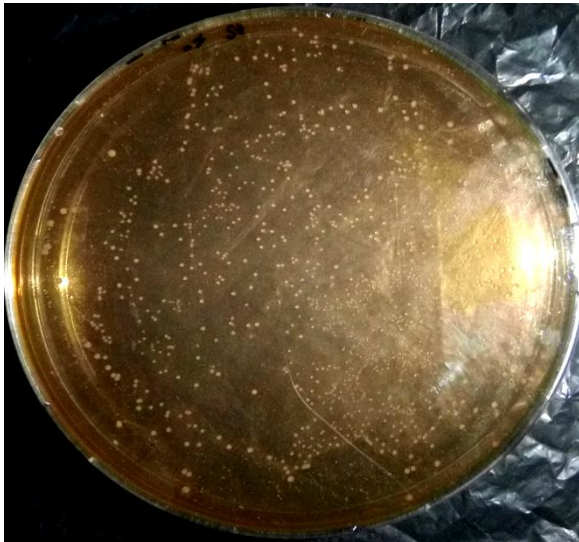


Fig.94 : Colonies bactériennes blanches,
dilution 10⁻¹

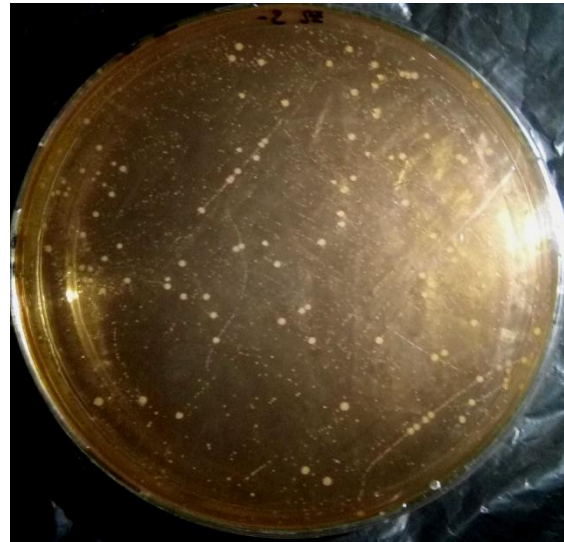


Fig.95 : Colonies bactériennes blanches,
dilution 10⁻²

Interprétation : La présence de Streptocoques fécaux est en rapport avec le manque d'hygiène du lieu d'hébergement, et possibilité de contamination fécale pour la vache.

b) -Test de présomption :

La figure n°96 (a,b) montre la présence d'un trouble bactérien dans le tube B (échantillon 02).

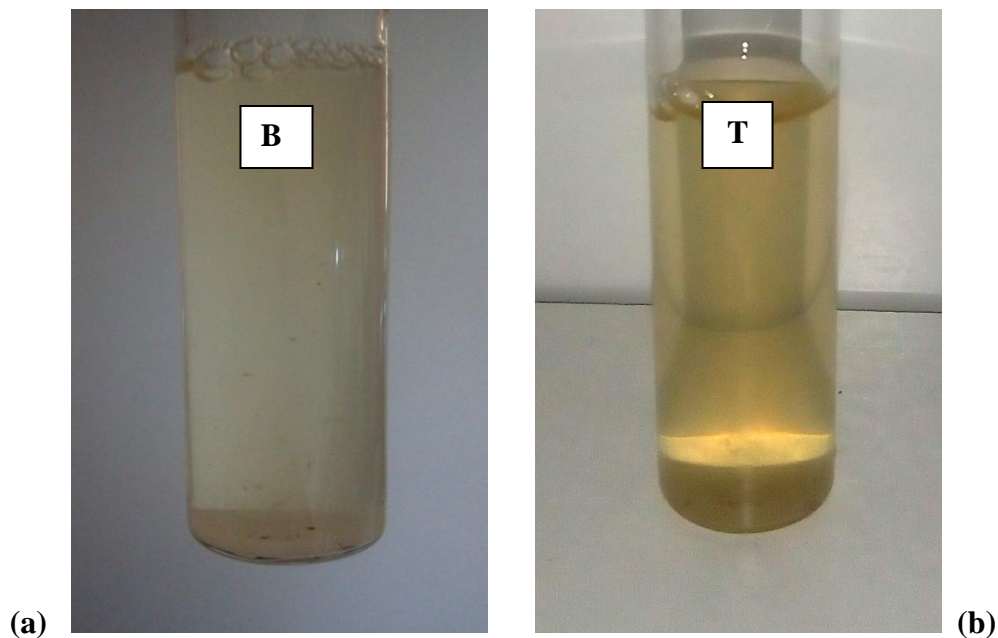


Fig.96 (a, b) : test de présomption, B : échantillon 02, (trouble), T : tube témoin (Rothe)

c)- **Test de confirmation (Eva Lytski)** : La figure n°97 (a, b) montre qu'il y a présence de trouble bactérien dans le tube B (échantillon 02)

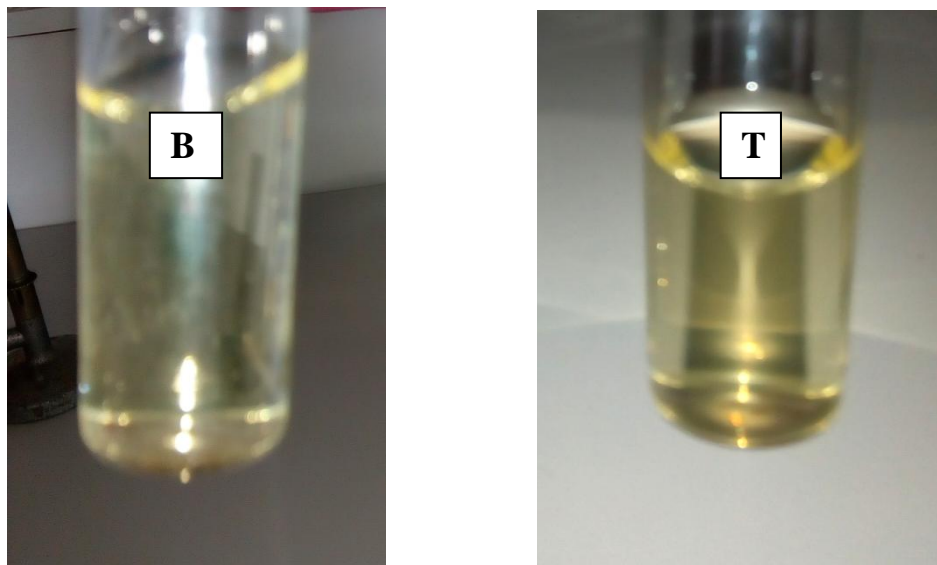


Fig.97 (a, b) : Test de confirmation des streptocoques fécaux, B : échantillon 02, (trouble),
T : tube témoin

Interprétation : les 2 tests confirment la présence des Streptocoques fécaux.

d)- **Recherche d'hémolyse par gélose au sang frais** : Après 24H d'incubation nous avons obtenu des zones hémolytiques de couleur jaune (β - hémolyse) (figure n°98).

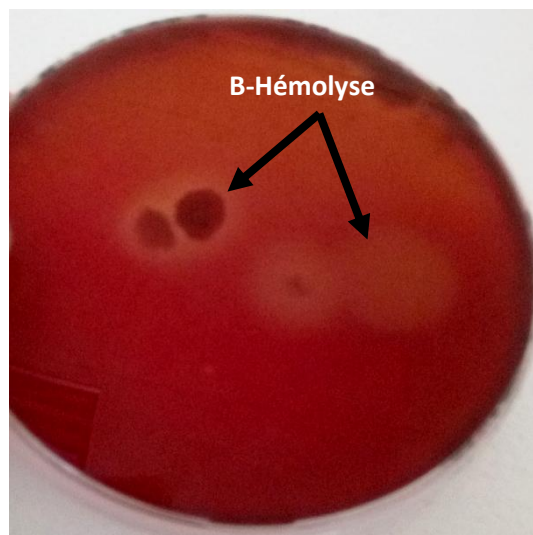


Fig.98 : Zones hémolytiques sur gélose au sang.

Interprétation : ce test précise le type d'hémolyse (bêta hémolyse) donc le Streptocoque appartient au groupe A ou B.

e) - Test de sensibilité à la bacitracine :

Après 24H d'incubation nous pouvons observer des zones d'inhibition de diamètre 09 mm ce qui montre que la bactérie concernée est résistante à la bacitracine (figure n°99).



Fig.99 : Zones d'inhibition des streptocoques résistants à la bacitracine

Interprétation : La résistance à la bacitracine précise que le Streptocoque concerné appartient au groupe B donc c'est un *S. agalactiae*.

f)- Test de Catalase :

La figure n°100 montre l'absence de dégagement de gaz , ce qui indique que la bactérie possède une catalase négative (-).

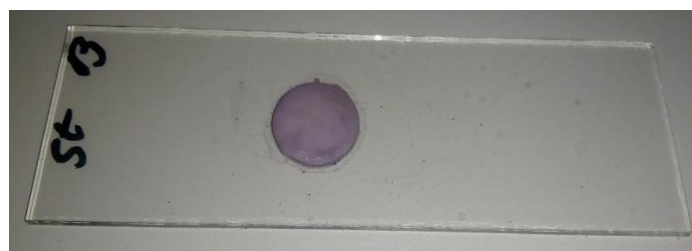


Catalase(-)

Fig.100: Test de catalase(-) pour les streptocoques.

g)- Test d'oxydase :

La figure n°101 montre que la bactérie possède une oxydase positive (+).



Oxydase (+)

Fig.101 : Test d'oxydase positive pour les streptocoques.

Interprétation : Une catalase négative et une oxydase positive sont la preuve qu'il s'agit d'un streptocoque.

21.3.5. Résultats de dénombrement des germes pathogènes :

-Les résultats sont résumés dans les tableaux n°25, 26, 27 et 28.

Tableau 25 : Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale sur milieu PCA (colonies/ml)

Dilutions	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
Milieu					
PCA	En nappe	En nappe	166	124	60

Tableau 26 : Dénombrement des staphylocoques sur milieu Chapman (colonies/ml)

Dilutions	10⁻¹	10⁻²	10⁻³
Milieu			
Chapman	En nappe	188	83

Tableau 27 : Dénombrement des coliformes fécaux sur milieu VRBG (colonies/ml)

Dilutions	10⁻¹	10⁻²	10⁻³
Milieu			
VRBG	En nappe	148	02

Tableau 28 : Dénombrement des streptocoques sur milieux Slanetz, Mac Conkey et Désoxycholate (colonies/ml)

Dilutions	10⁻¹	10⁻²	10⁻³
Milieu			
Slanetz	En nappe	111	08
Mac conkey	En nappe	165	34
Désoxycholate	En nappe	87	26

21.4. Résultats de l'examen macroscopique pour les 2 fermes :

-Les résultats sont résumés dans le tableau n°29.

Tableau 29 : Reconnaissances des germes pathogènes présents dans les 2 échantillons.

Morphologie Germe	Taille	Forme	Aspect de Surface	Opacité	Consistance	Couleur
FMAT	0,5 à 2 μm	Contours : irrégulier Relief : demi-bombée Centre : surélevé	Rugueuse	Translucide	Crémeuse	Blanche
Staphylocoque	0,7 à 1 μm	Contours : lisses Relief : bombée Centre : surélevé	Lisse	Opaque	Muqueuse	Dorée
Streptocoque	0,5 à 1 μm	Contours : lisses Relief : plat Centre : surélevé	Lisse	Opaque	Grasse	Rose
Coliforme	0,5 à 3 μm	Contours : lisses Relief : demi-bombée Centre : ombiliqué	Lisse	Opaque	Muqueuse	Violet

21.5. Résultats de l'examen microscopique pour les 2 fermes :

Les figures n°102, 103 et 104 montrent les caractères morphologiques des germes pathogènes présents dans les 2 échantillons de lait prélevés observés au microscope x100.

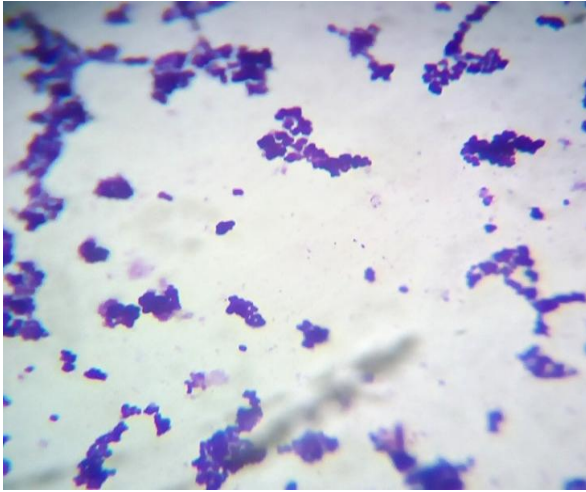


Fig.102 : Staphylocoques *aureus* Gram+,
cocci en grappes.



Fig.103 : Streptocoques fécaux Gram+,
cocci en chainettes.

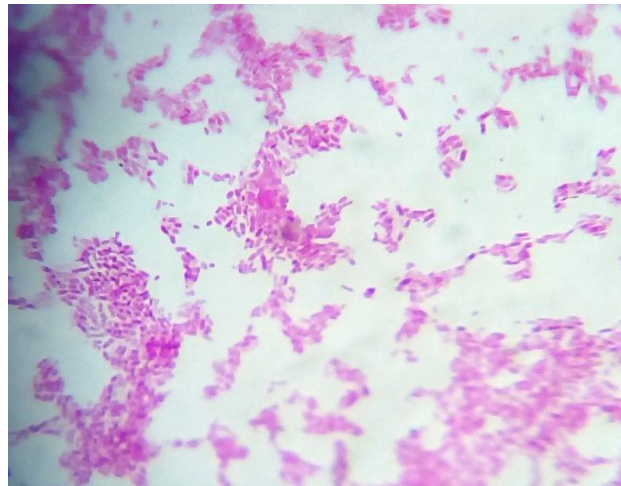


Fig.104 : Coliformes fécaux (*Escherichia Coli*), bacille Gram (-).

21.6. Résultats des tests d'identification biochimique pour les deux fermes :

a) Mini galerie biochimique classique pour les streptocoques fécaux (Ferme de Hassi-Mamèche) :

La figure n°105 montre les résultats des tests effectués.

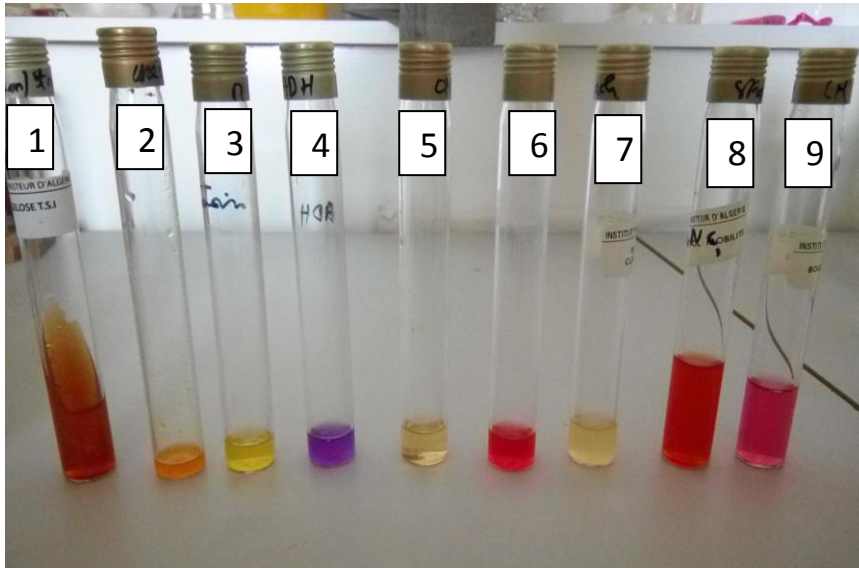


Fig.105 : Tests d'identification biochimiques pour les streptocoques (échantillon 1).

Interprétation :

Tube 1 (TSI) : Culot jaune et pente rouge, d'où bactérie de type fermentatif du glucose et lactose (-), absence de précipité noir de sulfure de fer, donc la bactérie ne produit pas de H₂S, elle est H₂S (-).

Tube 2(UI) : La coloration orange montre l'absence d'hydrolyse de l'urée d'où uréase (-).

Tube 3 et 4 (ADH) : le tube 4 est témoin, le tube 3 a viré au jaune, donc la bactérie est décarboxylase (-).

Tube 5 (ONPG) : la couleur vire au jaune, donc la bactérie est ONPG (+).

Tube 6 (RM) : la couleur vire au rouge, donc la bactérie est RM (+).

Tube 7 (VP) : pas de changement de couleur, donc la bactérie est VP (-).

Tube 8 (Mannitol-mobilité) : pas de changement de couleur, donc la bactérie est mannitol (-) et pas de diffusion, la bactérie est immobile.

Tube 9 (Nitrate –réductase) : la couleur vire au rouge, donc la bactérie est NR (+), d'où présence de Nitrites.

Les résultats sont consignés dans le tableau n°30.

b) Mini galerie biochimique classique pour les coliformes (Ferme de Hassi-Mamèche) :

La figure n°106 montre les résultats des tests effectués.

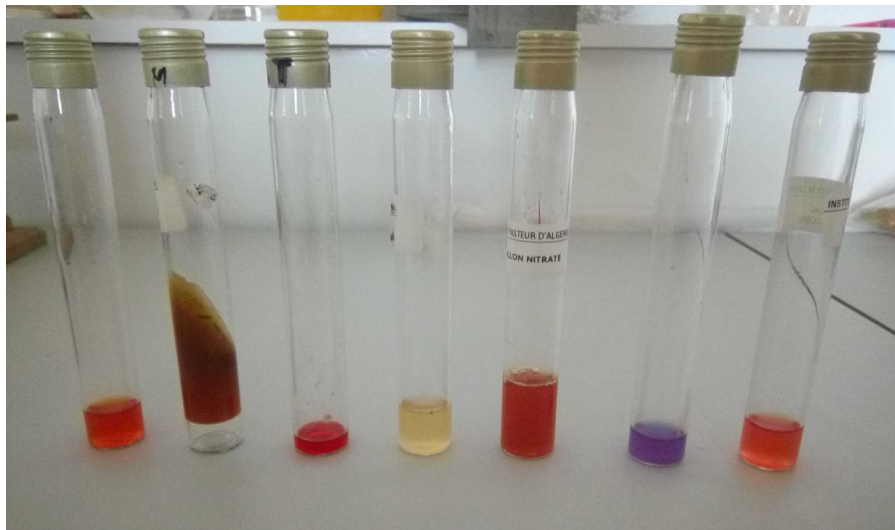


Fig.106 : Tests d'identification biochimiques pour les coliformes (échantillon 1).

De la même façon que pour le test précédent, nous avons interprété les résultats obtenus et nous les avons consignés dans le tableau n°30.

c) Mini galerie biochimique classique pour les streptocoques fécaux (Ferme de Hadjadj) : La figure n°107 montre les résultats des tests effectués.



Fig.107 : Tests d'identification biochimiques pour les streptocoques (échantillon 2).

De la même façon que pour le test précédent, nous avons interprété les résultats obtenus et nous les avons consignés dans le tableau n°30.

d) Mini galerie biochimique classique pour les coliformes (Ferme de Hadjadj) :

La figure n°108 montre les résultats des tests effectués.

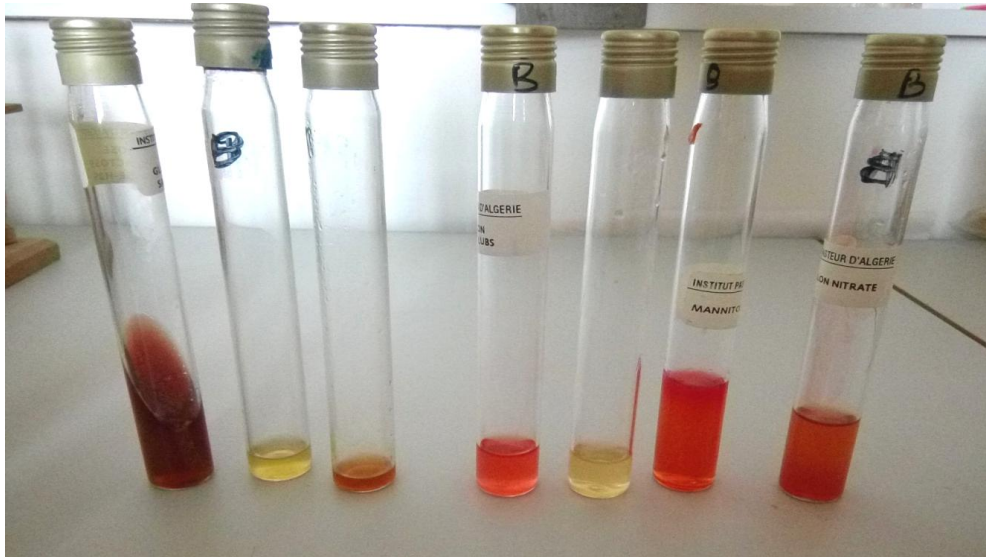


Fig.108 : Tests d'identification biochimiques pour les coliformes (échantillon 2).

De la même façon que pour le test précédent, nous avons interprété les résultats obtenus et nous les avons consignés dans le tableau n°30.

e) - Test urée indole :

Après une incubation de 24 h en milieu (eau peptonée exempte d'indole), on observe la présence d'anneau rouge (indole (+)) dans les tubesensemencés par les entérobactéries (présence possible d'*Escherichia Coli*, confirmé par les autres tests) et absence d'anneau rouge dans les tubesensemencés par les streptocoques (indole (-)) (figure n°109).

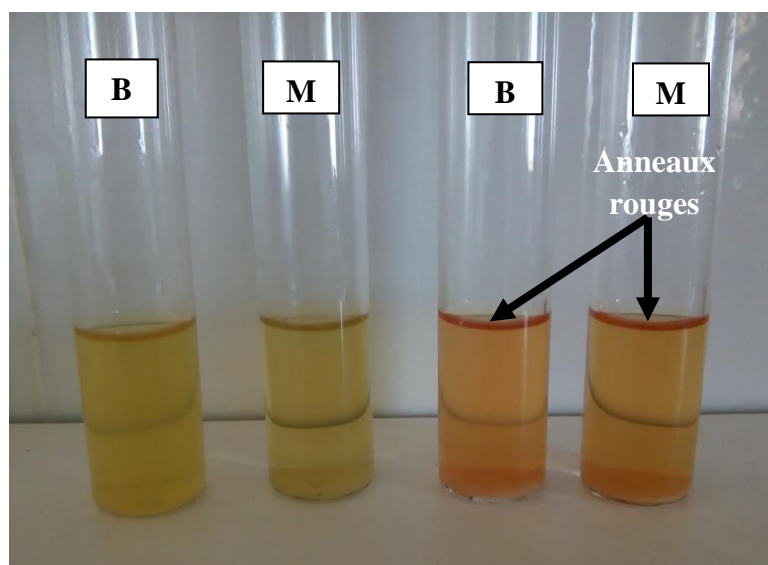


Fig.109 : M (échantillon 1), B (échantillon 2), présence anneaux rouges pour les 2 tubes de droite, absence d'anneaux pour les 2 tubes de gauche.

Le tableau n°30 résume les résultats des tests d'identifications biochimiques des deux fermes.

		Milieu TSI															
Ferme	Tests	Glucose	Sucrose	Lactose	H ₂ S	Gaz	ADH	Témoin	Urée	Indole	TDA	ONPG	RM	VP	Manitol	Mobilité	Nitrate
	Bactérie																
Hassi-Mamèche	Streptocoque	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	Entérobactérie	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Hadjadj (Bosquet)	Streptocoque	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	Entérobactérie	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+

ADH : Arginine Dihydrolase TDA : Tryptophane Désaminase ONPG : ortho-nitro-phényl-galactoside RM : Rouge de méthyle VP :Vosges-Proskauer

Tableau 30 : Résultats des tests d'identifications biochimiques des germes des deux fermes.

21.7. Résultats d'antibiogramme pour les 2 fermes :

a) Résultat d'antibiogrammes pour la ferme 1 (Hassi Mamèche) et pour la ferme 2 (Hadjadj) :

Les figures n°110 et 111 montrent les résultats des antibiogrammes obtenus, respectivement pour l'échantillon 1 (ferme 1) et pour l'échantillon 2 (ferme 2) dans le cas des staphylocoques.

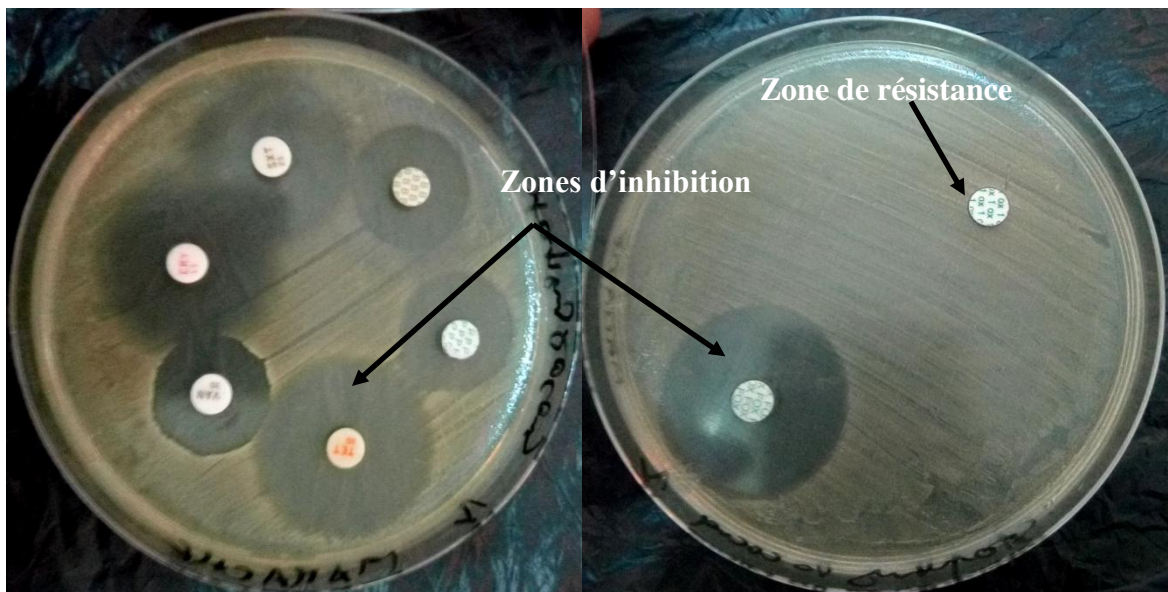


Fig.110 : Antibiogramme de l'échantillon 1, *Staphylococcus succinus*.

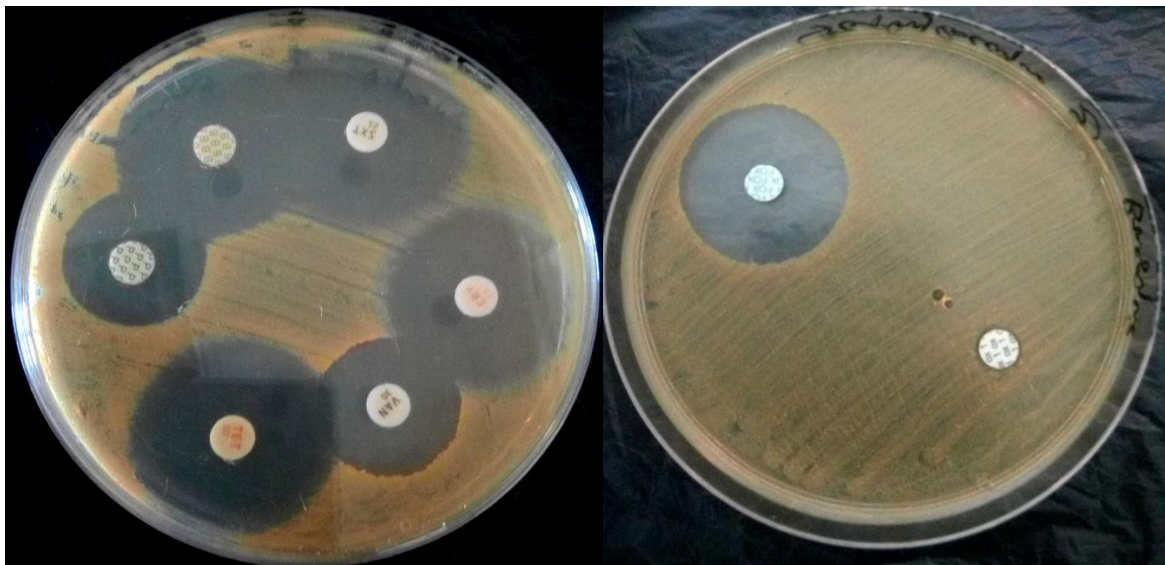


Fig.111 : Antibiogramme de l'échantillon 2, *Staphylococcus aureus*.

Les figures n°112 et 113 montrent les résultats des antibiogrammes obtenus, respectivement pour l'échantillon1 (ferme 1) et pour l'échantillon 2 (ferme 2) dans le cas des streptocoques.

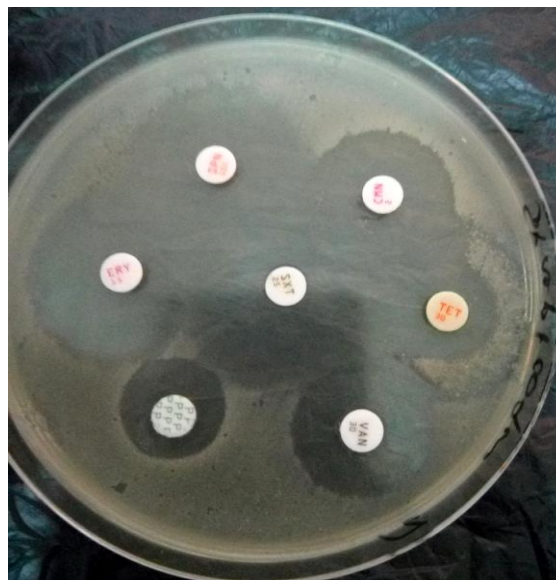
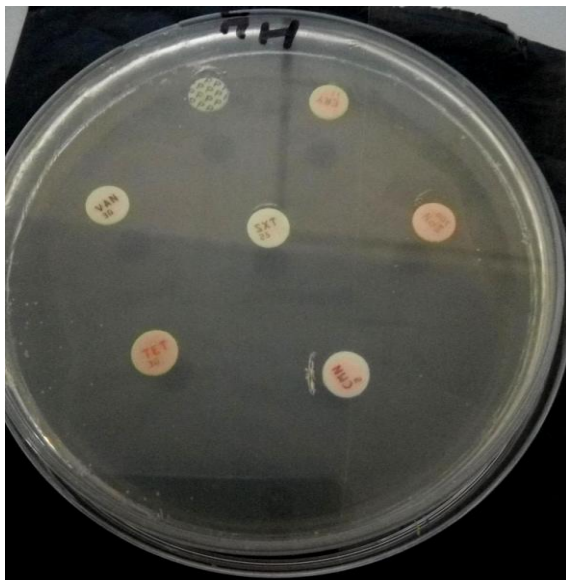


Fig.112 : Antibiogramme de l'échantillon 1,

Fig.113 : Antibiogramme de l'échantillon 2,

Streptococcus pyogenes.

Streptococcus agalactiae.

Nous pouvons constater, d'après les résultats obtenus, la présence de zones d'inhibition dont l'importance varie d'une souche microbienne à l'autre et par conséquent chaque souche présente soit une sensibilité soit une résistance à un antibiotique donné. Les résultats sont ramenés aux tables normalisées (Annexe 2) pour comparaison, d'où les tableaux des antibiogrammes pour les souches microbiennes analysées (tableaux n°31 et 32).

Tableau 31 : Résultats des antibiogrammes pour *Staphylococcus succinus* (échantillon 1) et *Staphylococcus aureus* (échantillon 2).

Antibiotique	Germe	Staphylococcus (éch.1)		Staphylococcus (éch.2)	
		Diamètre	Catégorie	Diamètre	Catégorie
VAN(vancomycine)		19	S	21	S
ERY(erythromycine)		30	S	30	S
P(pénicilline)		21	R	22	R
B (bacitracine)		21	S	30	S
SXT(trimethoprime+sulfamethoxazole)		28	S	32	S

TET(tétracycline)	30	S	29	S
FOX(cefexilline)	30	S	31	S
OX1(oxacilline)	06	R	06	R

S : sensible, R : résistant

Tableau 32 : Résultats des antibiogrammes pour *Streptococcus pyogenes* (échantillon 1) et *Streptococcus agalactiae* (échantillon 2).

Antibiotique	Germe	Streptococcus (éch.1)		Streptococcus (éch.2)	
		Diamètre	Catégorie	Diamètre	Catégorie
CMN(clindamycine)		/	R	25	S
P(pénicilline)		/	R	17	R
VAN(vancomycine)		/	R	22	S
TET(tétracycline)		/	R	18	R
SPN(spiramycine)		/	R	32	S
ERY(érythromycine)		/	R	30	S
SXT(triméthoprime+sulfaméthoxazole)		/	R	35	S

S : sensible, R : résistant

Interprétation des résultats :

a) Cas du germe *Staphylococcus succinus* (ferme 1) :

- il est très sensible aux antibiotiques suivants cefexilline (FOX), tétracycline (TET), érythromycine (ERY) et triméthoprime+sulfaméthoxazole (SXT) qui seront efficaces dans le traitement des vaches de la ferme 1 atteintes probablement de mammites sub-cliniques dont l'origine est *S.succinus* ;

- il est moyennement sensible à la bacitracine (B) ;

- il est résistant à la pénicilline (P) et l'oxacilline (OX1), ces 2 antibiotiques sont à éviter dans le traitement de l'infection mammaire des vaches, il est possible que les vaches ont acquis une antibiorésistance à force de traitement à base de ces 2 antibiotiques ou à d'autres qui sont similaires.

b) Cas du germe *Staphylococcus aureus* (ferme 2) :

- il est très sensible aux antibiotiques suivants tétracycline (TET), bacitracine (B), triméthoprime+sulfaméthoxazole (SXT), érythromycine (ERY), cefoxilline (FOX) qui seront efficaces dans le traitement des vaches de la ferme 2 atteintes probablement de mammites sub-cliniques dont l'origine est *S. aureus*.

- il est moyennement sensible à la vancomycine (VAN) ;

- il est résistant à la pénicilline (P) et l'oxacilline (OX1), ces 2 antibiotiques sont à éviter dans le traitement de l'infection mammaire des vaches, il est possible que les vaches ont acquis une antibiorésistance à force de traitement à base de ces 2 antibiotiques ou à d'autres qui sont similaires.

c) Cas du germe *Streptococcus agalactiae* (ferme 2) :

- il est très sensible aux antibiotiques suivants spiramycine (SPN), érythromycine (ERY), triméthoprime+sulfaméthoxazole (SXT), clindamycine (CMN) qui seront efficaces dans le traitement des vaches de la ferme 2 atteintes probablement de mammites sub-cliniques dont l'origine est *S. agalactiae*.

- il est moyennement sensible à la vancomycine (VAN) ;

- il est résistant à tétracycline (TET) et pénicilline (P), ces 2 antibiotiques sont à éviter dans le traitement de l'infection mammaire des vaches, il est possible que les vaches ont acquis une antibiorésistance à force de traitement à base de ces 2 antibiotiques ou à d'autres qui sont similaires.

d) Cas du germe *Streptococcus pyogènes* (ferme 1) :

Aucune réaction de la souche microbienne, avec les 7 antibiotiques, n'a été observée malgré que l'antibiogramme a été refait 2 fois, dans ce cas nous ne pouvons rien affirmer et l'une des possibilités suivantes est probable :

- le germe concerné a acquis une résistance aux différents antibactériens utilisés (cas multi résistant) ;

- les antibiotiques utilisés n'ont pas d'effet et il faut les changer ou bien recourir à d'autres types.

Pour vérifier ces possibilités il est nécessaire de refaire l'antibiogramme à plusieurs reprises sur différents prélèvements de lait à partir des mêmes vaches de l'élevage et de changer les types d'antibiotiques.

21.8. Résultats de la technique PCR :

Comme nous doutions de l'identification du staphylocoque isolé à partir du lait de la ferme 1, car tous les caractères obtenus à partir des différents tests indiquaient la présence d'un *staphylococcus épidermis*, alors nous avons soumis cette souche à une identification par PCR. Les résultats obtenus montrent qu'il s'agit d'un *Staphylococcus succinus*.

Le rapport d'identification nous est parvenu comme suit :

Staphylococcus succinus 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.

La séquence d'identification est la suivante:

Sequence ID: [MF145702.1](#)

>1AF_1492r -- 12..691 of sequence

```
CACCTTCGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGTTACAACTCT
CGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATGCTGATC
TACGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAAGTGG
AACAACTTTATGGGATTTGCATGACCTCGCGGTTTAGCTGCCCTTTGTATTGTCCATTGT
AGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCT
CCGGTTTGTACCGGCAGTCAACCTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAT
GCACCACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGGAAGGCTCTATCTCTAGAGTTTCAAAGGA
TGTCAGATTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTAATCCCCAGGCGGAG
TGCTTAATGCGTTAGCTGCAGACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTTAGCTCTCAT
CGTTTACGGCGTGGACTACG
```

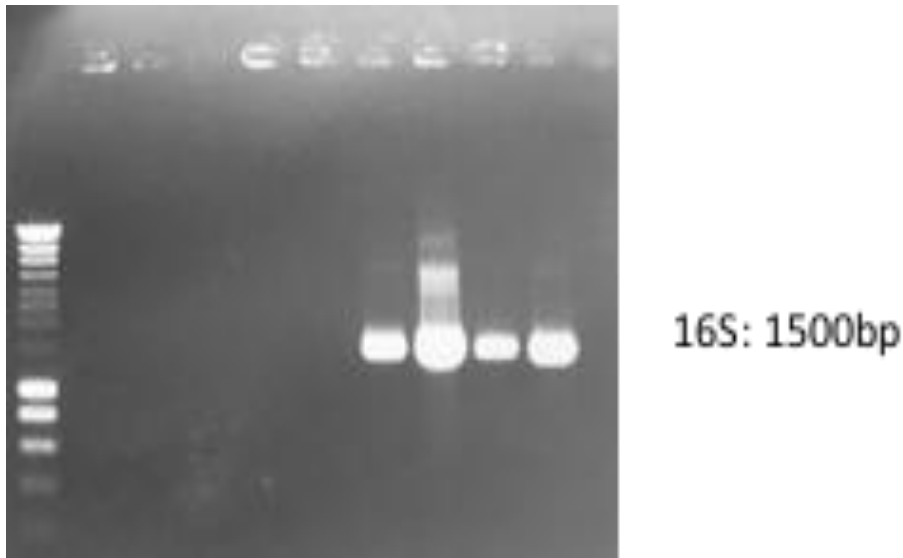


Fig.114 : Résultats de la Technique PCR.

La bande 1 et 2 est une répétition de la souche.

Les PCR ont montré uniquement la présence d'une bande d'environ 1500 bp qui correspond au produit des amorces 16S (Fig.114). Les autres bandes n'ont pas été révélées.

Discussion :

Devant l'absence de témoin positif de *Staphylococcus aureus*, on a fait le séquençage du fragment 16S de la souche pour vérifier son identité. La séquence obtenue et comparée à celle de GeeBank, montre que la souche n'est pas un *Staphylococcus aureus* mais à 99% un *Staphylococcus succinus*.

22. Discussion:

22.1. Types de germes isolés :

A partir des différents tests d'orientation et des tests d'identifications biochimiques que nous avons réalisé sur les 2 échantillons de lait cru, prélevés des 2 fermes, nous avons pu isoler et caractériser les germes pathogènes suivants (tableau n°33):

Tableau 33 : Types de germes isolés

Type de germe	Ferme1	Ferme2
<i>staphylococcus</i>	<i>succinus</i>	<i>aureus</i>
<i>streptococcus</i>	<i>pyogène</i>	<i>agalactiae</i>
<i>entérobacter</i>	<i>eschérichia coli</i>	<i>gergoviae</i>

Pour confirmer ces résultats nous avons procédé à une étude comparative basée sur d'autres travaux similaires.

D'après le tableau sur les caractères microbiologiques des germes responsables des mammites chez les bovins élaboré par Bidaud et *al*,(2007) (Annexe 4), nos résultats d'identification paraissent corrects.

Le type de staphylocoque isolé au niveau de la ferme 1, qui présentait toutes les caractéristiques de *Staphylococcus épidermis*, a été finalement identifié par une nouvelle technique la PCR comme étant *Staphylococcus succinus*. L'analyse a été effectuée en France dans un laboratoire spécialisé, par la méthode moléculaire PCR et avec la précieuse aide du docteur en biologie moléculaire M. Kerkoud responsable de la société DIAG-GENE d'Angers (France).

L'enterobacter gergoviae isolé au niveau de la ferme 2 est fréquemment isolé des voies respiratoires et urinaires des humains et du sang. C'est un agent pathogène opportuniste des voies urinaires et a été associé à des épidémies résistant aux antibiotiques dans les hôpitaux. Il peut également être isolé à partir d'environnements naturels tels que les eaux usées, le sol et les aliments. On l'aurait également isolé des produits cosmétiques (Holt et *al*, 1994).

22.2. Interprétation des antibiogrammes :

Nous avons orienté notre interprétation des antibiogrammes par la méthode des disques selon les constatations de certains travaux et en se basant sur les documents de l'annexe 2.

Une fois l'agent bactérien identifié, il semble intéressant de connaître sa sensibilité aux différents antibiotiques utilisables pour traiter les mammites. L'activité d'un antibactérien vis-à-vis d'une souche est caractérisée *in vitro* par sa Concentration Minimale Inhibitrice (C.M.I.). La méthode des disques est beaucoup plus rapide et moins onéreuse. Elle est aussi beaucoup plus approximative (Serieys, 2004 ; Van de Leemput, 2007).

En pratique, on détermine une valeur critique inférieure (diamètre minimum) et une valeur critique supérieure (diamètre le plus élevé) permettant de classer les souches en sensibles (au-dessus de la valeur critique supérieure), résistantes (en dessous de la valeur critique inférieure) et intermédiaires (entre ces deux valeurs) (Houffschmitt, 2004 ; Serieys, 2004).

En général, au cabinet vétérinaire, on cherche à savoir si la bactérie est sensible ou pas à tel ou tel antibiotique. L'antibiogramme nous donne une idée sur les chances de réussite du traitement vis-à-vis d'une souche donnée. Encore faut-il que l'antibiotique reconnu actif par l'antibiogramme, atteigne au niveau de la mamelle une concentration identique à celle contenue dans le disque (Serieys, 2006).

Les résultats des antibiogrammes que nous avons obtenus sont conformes aux normes standards appliquées à l'utilisation des antibiotiques vis-à-vis des germes pathogènes identifiés selon notre étude.

22.3. Analyses microbiologiques :

Les germes dénombrés sont considérés comme des indicateurs de la qualité globale du lait et des pratiques d'hygiène. Les résultats obtenus ont permis d'évaluer les degrés de contaminations des 2 échantillons de lait cru de la production des deux fermes.

La flore mésophile aérobie nous renseigne toujours sur la qualité hygiénique du lait cru, elle est considérée comme le facteur déterminant de la durée de conservation du lait frais (Guinot-Thomas et al, 1995). C'est la flore la plus recherchée dans les analyses microbiologiques. L'énumération de cette flore pour les 2 échantillons de lait cru a montré qu'il y avait une probable contamination au niveau de la ferme 2, le nombre de germes aérobies, calculé à l'aide de la formule de dénombrement, étant d'environ 5.10^5 UFC/ml et

celui des coliformes $1,3.10^3$ UFC/ml et aussi une contamination un peu faible pour la ferme 1, le nombre de germes aérobies étant d'environ $2,6.10^5$ UFC/ml et celui des coliformes $1,3.10^3$ UFC/ml. Ces valeurs dépassent le seuil critique d'altération du lait, fixé par les normes algériennes à 10^5 UFC/ml pour les germes aérobies et à 10^3 UFC/ml pour les coliformes selon le JORA (Annexe 3) et ce, pour les 2 fermes.

Selon Ameur et *al.*, (2011), en Algérie le lait cru collecté présente un taux de contamination microbienne très élevé (entre 10^5 et 10^7 UFC/ml), préjudiciable aussi bien à la transformation dans l'industrie laitière qu'à la santé publique. Ces chiffres se rapportent à un lait cru subissant une contamination par les moyens de traite, de stockage et de transport, mais dans notre cas la traite est directe et s'il y a contamination cela ne peut provenir que de l'état de santé de la vache ou d'une négligence de notre part quant à l'observation des règles d'hygiène lors des prélèvements. Dans tous les cas, nos résultats se situent dans cet intervalle de contamination, ils sont inférieurs aux résultats rapportés par Aggad et *al.*, (2009) dans l'ouest Algérien où le niveau de contamination moyen avoisine 83.10^4 UFC/ml.

Par ailleurs, Richard (1983), a constaté que pour des laits fortement pollués (entre 10^5 et 10^8 microorganismes/ml) la flore totale est essentiellement constituée par des streptocoques et des bactéries à Gram négatif. La présence de coliformes fécaux et de streptocoques dans les deux échantillons de lait que nous avons prélevés est en accord avec ce constat et donc il est probable que des cas de mammites sub-cliniques soient présentes au niveau des deux troupeaux de vaches.

La présence des staphylocoques dans les 2 échantillons confirme l'idée de la contamination car selon le JORA ces germes sont totalement absents dans un lait sain. Cette présence est le signe probable de mammites inapparentes.

22.4. Prévention des mammites :

Il est nécessaire de respecter certaines règles d'hygiène pour prévenir les mammites. Le canal du trayon est toujours contaminé, même chez un animal sain ; de ce fait, les premiers jets de lait obtenus lors de la traite doivent être éliminés. L'extérieur de la mamelle est toujours chargé en germes ; l'importance de la charge, qui est liée aux conditions de propreté de la stabulation, représente une source de contamination majeure du lait. Un nettoyage correct de la mamelle effectué avant la traite est donc indispensable pour obtenir un lait de bonne qualité microbiologique. Deux méthodes peuvent être conseillées pour y parvenir :

- La première consiste à réaliser un nettoyage à sec du pis à l'aide de serviettes en papier ou en polyester et à usage unique ;
- La seconde méthode consiste à laver la mamelle avec une solution désinfectante tiède (chlore : 500 mg/l – iode : 75 mg/l), puis à la sécher avec une serviette propre à usage multiple ou mieux à usage unique (Boudier et Luquet, 1978).

La propreté des vaches a un impact significatif sur la santé du pis et en particulier sur le taux de mammites environnementales. Le maintien de la propreté du pis et des membres des vaches permet de diminuer la propagation d'agents pathogènes de l'environnement vers le canal du trayon. Selon la zone de l'animal qui est souillée, on peut déterminer les lieux dans l'étable où le niveau de propreté est inadéquat et ainsi apporter les correctifs nécessaires (Levesque, 2004).

Pour les règles pratiques d'hygiène de traite, on peut se référer à l'annexe 5.

23. Conclusion :

Certaines méthodes de dépistage préalable des mammites sont réalisables sur le terrain par un personnel peu formé, mais restent assez imprécises. La méthode CMT qui est la plus utilisée et la méthode du papier pH donnent une réponse qualitative sur l'état sanitaire de chaque quartier de la mamelle (sain ou infecté) et permettent de sélectionner les vaches sur lesquelles seront effectués des prélèvements de lait pour analyse.

L'analyse bactériologique est une méthode relativement simple à mettre en œuvre par les praticiens de formation mais nécessite des produits et du matériel spécialisés. Elle est assez coûteuse mais rentable pour l'éleveur. Elle permet d'effectuer un diagnostic précis et rapide du germe pathogène responsable de mammite au sein d'un élevage de vaches laitières. A la suite des résultats de cette analyse, les éleveurs et les vétérinaires seront capables de procéder aux traitements des infections mammaires.

Le traitement des mammites doit passer avant tout par la prévention. Les visites de traite doivent être privilégiées par les vétérinaires, ainsi que les appréciations des conditions d'hébergement et d'alimentation de l'élevage bovin.

Les résultats obtenus à l'issue de notre recherche convergent tous vers la confirmation de l'hypothèse qui suppose que l'apparition des mammites est liée à un manque d'hygiène des lieux d'hébergement des vaches et à un environnement insalubre.

Ce travail de recherche nous a permis d'avoir une idée claire sur le comportement à prendre sur le terrain et sur les méthodes à appliquer lors des opérations d'analyses microbiologiques au laboratoire. En respectant les consignes des enseignants nous avons pu mener à terme et de manière correcte l'isolement et la caractérisation de six bactéries pathogènes responsables au moins de mammites sub-cliniques.

Références Bibliographiques :

- 1) ABDELGUERFI A., BEDRANI S. (1997). *Study on range and livestock development in North Africa (Algeria, Morocco and Tunisia)*. FAO, Regional Office for the NEAR EAST. p : 71. In Conséquences des changements sur les ressources génétiques du Maghreb. Options Méditerranéennes, Série A / n°39, 2000.
- 2) ADDA J., GRIPON J.C. et VASSEL L. (1982). *The chemistry of flavor and texture generation in cheese*. *Food chemistry*, p :9, 115-129.
- 3) 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). p :251-258.
- 4) AGGAD H., MAHOUZ F., AHMED AMMAR Y. ET KIHAL M. (2009). *Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien*. *Revue Méd. Vét.*, 160, 12. p :590-595.
- 5) AMEUR A., RAHAL K. et BOUYOUCEF A. (2011). *Evaluation du nettoyage des tanks de réfrigération dans les fermes laitières de la région de Freha (Algérie)*. *Revue Nature et Technologie*. N°6. p :80-84.
- 6) ANGOUJARD P.L (2015). *Enquête sur le diagnostic et le traitement des mammites de la vache laitière par les vétérinaires de terrain en France en 2015*. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (France).
- 7) ARAUJO W. (2004). *Le cout des maladies en élevage bovin laitier, quelques repères et application pratique*. Journées Nationales des G.T.V., Tours. p 463-470.
- 8) ASSOCIATION D'AUTEUR (1985). *Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins*.*Rec. Méd. Vét.*, 161(6-7) : p567-570.
- 9) BARONE (1968). *Anatomie comparée des animaux domestiques*.
- 10) BAUDET, H.M. et CHIEZE, C. (1994). *Enquête sur la nature et la fréquence des espèces bactériennes isolées dans les mammites subcliniques bovines au tarissement*. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*, 78 (3) : 129 - 136.
- 11) BAZIN, S. (1983). *Contribution à une meilleure approche des problèmes de mammites. Première partie : Les mammites subcliniques : diagnostic, incidence et dynamique des infections*. *Bull Soc. Vét. Prat. de France*, 67 (1) : 28 - 50.
- 12) BEN HASSEN S, MESSADI L, BEN HASSEN A. (2003). *Identification et caractérisation des espèces de Staphylococcus isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite*. In : documents en ligne : *Annales de Médecine Vétérinaire*, 147 p 41-47.
- 13) BENDIAB N. (2012). *Analyse de la conduite d'élevage bovin laitier dans la région de Sétif*. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbès, Sétif (Algérie).
- 14) BERTHELOT X, BERGONIER D. (2006). *La maîtrise des mammites cliniques en péripartum : une nouvelle priorité, épidémiologie descriptive et diagnostic*. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*. 1 : p 17-21.
- 15) BERTHELOT X., BERGONIER D. (2006). *La maîtrise des mammites cliniques en péripartum : traitements et prévention*. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*. 1 : p 23-26.
- 16) BERTIN-CAVARAIT C. et al. (2009). *L'AFSSA explore les laits mammites des vaches laitières rhône-alpines*. *La semaine vétérinaire*, n°1349 : p 42-44
- 17) BESOGNET B, DURNFORD N. (2007). *Nouvelles approches de l'utilisation d'un obturateur interne du trayon au tarissement*. Journées Nationales G.T.V., Nantes. p 773-776.
- 18) BIDAUD O, HOUFFSCHMITT P, VIGUERIE Y. (2007). *Etiologie des mammites bovines en France entre 2005-2007*. Journées bovines nantaises. p 121-122.

- 19) BILLON P. *et al.* (2004). *Machines à traire et mammites : comment interpréter les contrôles et les observations pour mieux conseiller les éleveurs*. Recueil des journées nationales des GTV à Tours. p 833-839
- 20) BLAINS S. (2004). *Intérêts et techniques de l'identification bactérienne des germes de mammites au cabinet vétérinaire*. Journées Nationales des G.T.V., Tours. P 811-820.
- 21) BLIND JL, LEPLATRE J, POUTREL B. Les mammites : l'échantillon et son exploitation. Mise au point technique. Role du praticien et du laboratoire. *Bulletin des G.T.V.*, 1980, B206 : 17-27.
- 22) BOSQUET G, ENNUYER M, GOBY L, LEISEING E, MARTIN S, SALAT O, SANDERS P, SEEGER H, SERIEYS F. (2005). *Le praticien face au ciblage du traitement en lactation des mammites*. « Ouvrons le dossier », conférence de consensus organisée par le laboratoire Boehringer Ingelheim, Novembre 2005 : p 45.
- 23) BOSQUET G. (2004). *L'analyse lors d'une flambée de mammites cliniques : une étape indispensable riche d'enseignement*. Journées Nationales G.T.V., Tours. 771-778.
- 24) BOTREL M.A. *et al.* (2008). *Fréquence relative des bactéries responsables de mammites et résistance aux antibiotiques : résultats préliminaires d'une étude AFSSA-FEVEC menée en Rhône-Alpes*. Recueil du congrès de la SNGTV, Nantes. p 879-884
- 25) BOUAZIZ O. (2005). *Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien*, thèse doctorat, Université Mentouri (Constantine).
- 26) BOUDIER J.F. et LUQUET F.M. (1978). *Utilisation du lactosérum en alimentation humaine et animale*, N°21, édition APRIA, Paris.
- 27) BRADLEY A. J. *et al.*, (2004). *The importance of the nonlacting period in the epidemiology of intra mammary infection and strategies for prevention*, *Vet. Clin. Food Anim.*, 20: p547-568
- 28) BRADLEY A. J. et GREEN M. J. (2000). *A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period*, *J. Dairy Sci.*, 83: p 1957-1965
- 29) BRADLEY AJ, LEACH KA, BREEN JE, GREEN LE, GREEN MJ. (2007). *Survey of incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales*. *Veterinary Record*, 160: p 253-258.
- 30) BRAVARD M, SCHMITT-VAN DE LEEMPUT E. (2006). *Infection a staphylocoques coagulase négatif*. *Le Point Vétérinaire*, 37(266), 76-79.
- 31) CHAFFAUX, St. et STEFFAN, J. (1985). *Prophylaxie des infections mammaires : place de l'hygiène de la traite et du traitement*. *Rec. Méd. Vét.*, 161 (6-7): 603 - 615.
- 32) CHEVAL JL, LETARD S. (2003). *Méthode du prelevement de lait, d'isolement et d'identification des principaux germes de mammites des ruminants : expérience de l'Institut Départemental d'Analyse et de Conseil de Loire Atlantique*. Journées Nationales des G.T.V., Nantes. P 297-301.
- 33) CONSTANT (2014). *Les mammites : introduction, immunité et germes pathogènes*, Cours magistral. Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Unite pedagogique de production laitiere, p 39.
- 34) CREMO (2003). *Problèmes de qualité du lait, causes possibles et mesures à prendre*. Brochure 1ere édition, Paris.p3.
- 35) CREVIER-DENOIX (2010). *Anatomie de la mamelle des Ruminants*, Cours magistral. Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Unite pedagogique d'anatomie des animaux domestiques, p10.
- 36) CUQ J.L. (2007). *Microbiologie alimentaire. Edition sciences et techniques du Languedoc*. Université de Montpellier. p :20-25.
- 37) DEBRY, (2006). *Lait, nutrition et santé*. Ed : tec et doc Lavoisier, Paris. p 566.

- 38) DEGUEURCE C. (2004). *Anatomie de la mamelle des Ruminants*, Dissection des Ruminants et cours magistral. Polycopie. Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Unite pedagogique d'anatomie des animaux domestiques, p 4.
- 39) DELARRAS C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Technique et documentation. France. Lavoisier. ISBN : 978-2-743060945- 8. 462p.
- 40) DELARRAS C. (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire, Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Edition Lavoisier. p :113 ,114.
- 41) DESCOTEAUX L., ROY J.P. (2004). *La mammite clinique strategies d'intervention. Symposium sur les bovins laitiers*. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec.
- 42) DIOP, M. (1981). *Adaptation de la traite mécanique du zébu (Bos indicus). Résultats des premiers essais chez le zébu pakistanais au Sénégal*. Th : Méd. Vét. : Dakar n° 13.
- 43) DJABRI *et al.* (2002). *Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis*, *Vet. Res.*, 33: p 335-357
- 44) DOPFER D *et al.* (2000). Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro, *Veterinary microbiology*, 74: p 331-343
- 45) DUMAS PL, FAROULT B, SERIEYS F. (2004). *Assurer le traitement en exploitation laitière : expérience et perspectives de l'action G.T.V. Partenaire*. Journées Nationales des G.T.V., Tours. P 71- 75.
- 46) DUPONT, J.P.L. (1980). *L'Infection mammaire inapparente : agents microbiens en cause et antibiogramme*. Th : Méd. Vét.: Alfort n° 53.
- 47) DUREL L, FAROULT B, LEPOUTRE D, BROUILLET P, LE PAGE Ph. (2004). *Mammmites des bovins (cliniques et subcliniques). Démarches diagnostiques et thérapeutiques*. La Dépêche Technique. Supplément technique 87 à la Dépêche Vétérinaire du 20 Décembre 2003 au 2 Janvier 2004. 39 p.
- 48) DUREL L, GUYOT H, THERON L. (2011). *Vade-mecum des mammmites bovines*. Editions Med'Com, Paris, France. 270 p.
- 49) DUREL L, POUTREL B. (2006). *Diagnostic bactériologique des mammmites pour le vétérinaire praticien. Solutions pratiques et limites*. Bulletin des G.T.V., 33 : p 43-53.
- 50) DUREL L, SCHMITT-VAN DE LEEMPUT E. (2007). *Examen bactériologique du lait de mammite au cabinet. Se donner les moyens de bien faire*. Journées Nationales des G.T.V., Nantes. P 45-50.
- 51) DUVAL J. (2008). *Soigner les mammmites sans antibiotiques* Agro. Bio- 370 - 11/p4-6
- 52) EDDEBBARH A. (1989). *Systèmes extensifs d'élevage bovin laitier*. Options Méditerranéennes, Série A, Séminaires Méditerranéennes n° 6 : 123-133.
- 53) EMMANUEL, FRANCOIS, 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 mammmites*. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (France).
- 54) FAROULT B, LEPAGE P. (2006). *Quels prélèvements de lait pour le diagnostic bactériologique des mammmites bovines*. Bulletin des G.T.V., 33 : p 24-30.
- 55) FERROUILLER C, BOUCHARD E, CARRIER J. (2004). *Diagnostic indirect des mammmites subcliniques*. Le Point Vétérinaire, 34(248) : p 42-46.
- 56) GABLI A. (2005). *Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammmites et de vaches saines*. - Enseignements pour l'Algérie Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire, Université de Constantine.

- 57) GANDON J-B. (2010). *Comparaison entre la méthode épidémiologique et la méthode bactériologique de diagnostic lors d'une épizootie de mammites en élevage bovin*. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort (France).
- 58) GEDILAGHINE V. (2005). *La rationalisation du traitement des mammites en exploitation laitière. Conception et réalisation d'une enquête d'évaluation de la mise en place de l'action G.T.V. Partenaire dans le département de la Manche*. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Maisons Alfort, 106 p.
- 59) GREEN MJ. (2007). National intervention study of mastitis control in dairy herds in England and Wales. *Veterinary Record*, 160(9) : 287-296. Dans *l'Essentiel*, 61 : 35p.
- 60) GRIPON JC. , DESMAZEAU MJ., LE BARS D.et BERGERE JL.(1975). *Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Influence de la présure commerciale*. Le lait 55. p502-516.
- 61) GUERRA L. (2008). *Contribution à la connaissance des systèmes d'élevage bovin dans la région semi aride de Sétif*. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie. Université Ferhat Abbès , Sétif (Algérie).
- 62) GUINOT T. P., AMMOURY M. et LAURENT F. (1995). *Effects of storage conditions on the composition of raw milk*. International Dairy Journal N° 5. p: 211-223.
- 63) GUIRAUD J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod. Paris. p :136-139.
- 64) GUIRAUD J.P., ROSEC J.P. (2004). *Pratique des normes en microbiologie alimentaire*. AFNOR. France. ISBN : 2- 12- 445211-8. 398 p.
- 65) HOLT J.G., et al. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* , 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- 66) HOUFFSCHMITT P. (2004). *Lait de mammité : recul sur les analyses bactériologiques après congélation en élevage*. Journées Nationales des G.T.V., Tours : 823-825.
- 67) INSTITUT D'ELEVAGE (2009). *Traite des vaches laitières.Matériel, installation, entretien*, 1^{ère} édition France agricole. Produire mieux. p :55-506.
- 68) INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE (2003). *Catalogue milieux de cultures réactifs de laboratoire*. Edition IPA.
- 69) JAKOB E., WINKLER H. et HALDEMANN J. (2009). *Critères microbiologiques pour la fabrication du fromage*. Edition Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions No 77.F. p :5-31.
- 70) LABBE JF. (2007). *Fonctionnement et dysfonctionnement de la machine à traire*. Conférence organisée par le laboratoire Elanco pour les vétérinaires praticiens.
- 71) 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 Sante Animale. Ed. Du Point Vétérinaire, 318 p.
- 72) LAM et al., (1996). *Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by Staphylococcus aureus and Escherichia coli studied by DNA fingerprinting*, AJVR, 57 (1): p 39-42
- 73) LE GRAND D, ARCANGIOLI MA, GIRAUD N, POUMARAT F, BEZILLE, BERGONIER D. (2004). *Conduite à tenir face à des mammites à mycoplasmes*. *Le Point Vétérinaire*, 35(245) : 34-37.
- 74) LEPAGE P. (2003). *Les moyens de diagnostic des infections mammaires en exploitation*. Journées Nationales des G.T.V., Nantes. p 319-330.
- 75) LERONDELLE, C. (1985). *Les Mammites à Streptococcus uberis*. *Rèc. Méd. Vét.* 161 (6- 7) : 539 - 544.
- 76) LEVESQUE P. (2004). *La traite des vaches laitières Etape par étape vers la qualité Guide pratique*. Edition Educagri. Québec.
- 77) LEYRAL G. et VIERLING E. (2007). *Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires*. 4^e édition biosciences et techniques, p87.

- 78) LEYRAL G., JOFFIN J.N. (2001). *Microbiologie technique, tome1, Dictionnaire des techniques*. Collection Biologie Technique. Edition Canopé, CRDP Bordeaux.
- 79) MARCHAL N., BOURDON, J.L. et RICHARD, CL. (1991). *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. 3^{ème} Ed. Doin éditeurs, Paris.
- 80) MATTHEWS *et al.*, (1994). *Bovine mammary epithelial cell invasion by streptococcus uberis*, *Infection and immunity*, 62 (12): p 5641-5646
- 81) MAZYOYER M. (2007), *Larousse agricole*. Edition Larousse paris France p115-116-374-375-405
- 82) MEUNIER D., (1999). *Infections mammaires à S. aureus, caractérisation et évaluation d'antigènes pour le diagnostic immunologique*, thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Tours.
- 83) MICHEL A. et WATTIAUX, (2000). *Lactation et récolte du lait*. Institut Babcock pour la recherche et le développement international du secteur laitier. UW. Madison, wisconsin p3-30 ,60-72
- 84) NADJRAOUI D. (2001). *FAO Country pasture / Forage resource Profiles: Algeria*
- 85) NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1985). *Mammmites : Rôle de la machine à traire*. *Rec. Méd. Vét.*, 161 (6-7) : 513 - 518.
- 86) POITRAS E., HOUDE A,(2002). *La PCR en temps réel : principes et applications*. vol.2, No2, pp.2-11.
- 87) POUTREL, B. (1985). *Généralités sur les mammites de la vache laitière : Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic et méthode de contrôle*. *Bull. Soc. Vét. Prat. De France*, 161 (6-7) : 497 - 511.
- 88) RAINARD P. *et al.* (1985). *Les mammites colibacillaires*, *Rec. Méd. Vét.*, 161 (6-7) : p529-537
- 89) REMY D. (2007). *Les mammites*, cours de DCEV 3 de l'ENVA.
- 90) REMY D., (2010). *Les mammites*. (Groupe France Agricole). Edition Fevrier 2010. ISBN 978-2-85557-171-3. p20.
- 91) RICHARD J. (1983). *Nature de la flore microbienne dominante et sous-dominante des laits crus très pollués*. *Le lait n°63*. pp: 148-170.
- 92) ROBERSON *et al.* (1994). *Ecology of Staphylococcus aureus isolated from various sites on dairy farms*, *J. Dairy Sci.*, 77: p 3354-3364
- 93) 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.
- 94) SCHMITT E, LEGAY JB, BERTHELOT X, BOUSQUET-MELOU A, DUREL L, SALAT O, BOSQUET G, SERIEYS F. (2007). *Localisation des bactéries et traitements des mammites en lactation*. « Ouvrons le dossier », session 2, Conférence de consensus organisée par le laboratoire Boehringer Ingelheim , Fevrier 2007. p : 63.
- 95) SCHMITT-VAN DE LEEMPUT E, SCHMITT-BEURRIER A. (2005). *Bactériologie sur le lait en clientèle*. *Le Point Vétérinaire*, 36(255) : 52-53.
- 96) SERIEYS F. (2008). *Ecologie des germes et prévention des infections mammaires inhabituelles*, recueil du congrès de la SNGTV, Nantes, p 885-891
- 97) SERIEYS F. *et al.* (1997). *Le tarissement des vaches laitières*, éditions la France agricole.
- 98) SERIEYS F. et SEEGER H. (2002). *L'intervention du vétérinaire face à un problème de mammites :2- Adapter les méthodes à l'évolution de l'épidémiologie*, proceeding du congrès de la SNGTV, Tours. p 147-156
- 99) SERIEYS F. (2004). *Le traitement cible des mammites : enjeux et faisabilité*. *Le Point Vétérinaire*, 35 (246) : p 54-59.
- 100) SERIEYS F. (2003). *Streptococcus uberis, l'espèce préoccupante*. *Le point vétérinaire*, n°233 : p 46-51

- 101) SERIEYS, F. (1985). *Conditions de logement et infections mammaires*. Rec. Méd. Vét., 161 (6-7) :519 - 528.
- 102) SMITH B P. (2008). *Mammary gland health and disorders*. Large animal internal medicine, fourth edition: 1112-1119.
- 103) SOEDJI K. (1996). *Contribution à l'épidémiologie et au traitement des mammites de la vache laitière : cas des élevages de la SOCA et de Niacoulrab au Sénégal*. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Cheikh Anta Diop, Dakar (Sénégal).
- 104) TAPONEN S, KOORT J, BJORKROTH J, SALONIEMI H, PYORALA S. (2006). *Bovine intra mammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism based analyses*. Journal of Dairy Science , 90: 3301-3307.
- 105) TAPONEN S, PYORALA S. (2007). *C.N.S. Emerging pathogen. Heifer Mastitis Conference, Final Program and Abstract Book, Ghent Belgium, juin 2007*: p 18-20.
- 106) THERBERG B-M. *et al.*, (2009). *Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci*, J. Dairy science, 92: p 4962-4970
- 107) VAN DE LEEMPUT E. (2007). *Analyse bactériologique du lait*. Conférence organisée par le laboratoire Pfizer pour les vétérinaires en exercice, Nantes, Mai 2007.
- 108) 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.
- 109) VIGNOLA C. (2002). *Science et technologie du lait transformation du lait*. Edition presses internationales polytechniques, Canada.pp.3-75.
- 110) VON TAVEL L. (2015). Les mammites chez les génisses, Mai 2015. (www.swissgenetics.ch. www.la-vache-fertile.ch).
- 111) WHEELER B. (1993). *Guide d'alimentation des vaches laitières*.
- 112) WOLTER, R. (1992). *Alimentation de la vache laitière*. Paris : éditions France Agricole- 223 p.
- 113) YAKHLEF H. (1989). *La production extensive de lait en Algérie*. Option Méditerranéennes, SérieA, Séminaires Méditerranéennes n°6 : 135-139.

Sites internet :

- 1) SANTE ET MALADIE (2015).
<http://fr.winesino.com/public-health-safety/public-health/1007075663.html>
- 2) LA MICROBIOLOGIE (2004).
http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm
- 3) BIOLOGIE MOLECULAIRE (2010).
<http://www.cours-pharmacie.com/biologie-moleculaire/pcr-et-pcr—en-temps-reel.html>

Annexe n°1 : Formules des milieux de culture (Institut Pasteur, 2003 ; Leyral et Joffin, 2001)

1. Gélose nutritive

Composition et Préparation :

Constituants	Quantité en g/l
Peptone	10
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Chlorure de sodium	5
Agar	18

Dissoudre 39 g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C ; Ph=7,3±0,2

2. Gélose Chapman

Composition et Préparation :

Constituants	Quantité en g/l
Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Tryptone	5
Peptone bactériologique	10
Chlorure de sodium	70
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,05
Agar	18

Dissoudre 119 g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C ; Ph=7,4±0,1

3. Milieu de Rothe

Composition et Préparation :

Constituants	Quantité en g/l
Peptone	20,0
Glucose	5,0
Azide	0,2
NaCl	5,0
Hydrogénophosphate de potassium	2,7
Dihydrogénophosphate de potassium	2,7

Dissoudre 36,2 g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15 min à 121°C ; Ph=6,8±0,1

4. Gélose Mueller Hinton

Composition et Préparation :

Constituants	Quantité en g/l
Extrait de viande	3
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	16

Dissoudre 38 g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C ; Ph=7,4

5. Gélose au sang de mouton

Composition et Préparation :

Constituants	Quantité en g/l
Peptone de viande	10
Peptone de caséine	5
Extrait de levure	3
Chlorure de Sodium	5
Agar	18
Additif à 45-50°C sang de mouton défibriné	50 à 80 ml/l

Dissoudre 41 g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C ; Ph=6,9±0,1

6. PCA standard (gélose ordinaire pour dénombrement)

Composition et Préparation :

Constituants	Quantité en g/l
Tryptone	5
Extrait de levure	2,5
Glucose	1
Agar	15

Dissoudre 23,5 g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C ; Ph=7,0

7. Eau peptonée

Composition et Préparation :

Constituants	Quantité en g/l
Peptone	10,0
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0

Dissoudre 15g dans un litre d'eau distillée ; autoclaver 15min à 121°C ; Ph=7,2

Annexe n°2 : Documents et tables pour l'interprétation des antibiogrammes.

1. Fiche technique n°1

Bactéries non exigeantes
**Entérobactéries, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*,
Acinetobacter spp. et autres**

Milieu :

- Gélose Mueller Hinton (MH), coulée en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4mm.
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et traitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland (page 59) ou à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

NB : Pour toutes les molécules ayant une charge SFM, l'inoculum doit être dilué au 1/100.

Ensemencement :

- Tremper un "écouvillon" stérile dans la suspension bactérienne.
 - L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
 - Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
 - Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

* : L'écouvillon évite les contaminations du manipulateur et de la pailleasse

Application des disques d'antibiotiques :

- Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, cent à cent.
- Tester la liste des antibiotiques indiqués dans les tableaux 2, 3 et 4 pages 84 et 85 selon la bactérie isolée.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles pour s'assurer de son application. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.

Incubation : 18 heures à 35°C**, 24 h pour *Acinetobacter spp.*

- La durée d'incubation peut être prolongée dans certains cas : oxacilline, glycopeptides et macrolides.

Lecture :

- Mesurer avec précision*** les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture n°2, 3, 4 et 5 pages 84 à 88.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire, Résistante.

NB : Souches de contrôle de qualité : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

** : Température optimale de croissance

*** : Pour *Proteus spp.*, ne pas tenir compte de la zone d'envahissement.

5

Tableau 5 : Liste des antibiotiques à tester pour *Streptococcus Alpha* ou non hémolytique, *Streptococcus Bêta-hémolytique* et *Enterococcus spp*.

Boîtes 90mmØ	<i>Streptococcus Alpha</i> ou non hémolytique	<i>Streptococcus Bêta-hémolytique</i> **	<i>Enterococcus spp</i>
Boîte 1	Ceftiofur/cefotaxime ^a	Penicilline	Ampicilline
	Erythromycine/ (ERY) ^b	Ampicilline	Tilmicosine
	Clindamycine/ (CLIN) ^b	Ceftiofur/cefotaxime	Tétracycline ^a
	Enrofloxacin	Enrofloxacin	Erythromycine / (ERY) ^b
Boîte 2	Tétracycline ^a	Erythromycine/ (ERY) ^b	Vancomycine ^c
	Vancomycine	Clindamycine/ (CLIN) ^b	Chloramphenicol ^d
	Chloramphenicol ^d	Tétracycline ^a	Enrofloxacin
	Triméthoprime+sulfaméthoxazole	Vancomycine	Triméthoprime+sulfaméthoxazole
Boîte 3	Spiramycine	Spiramycine	
CMI	Penicilline Ampicilline Gentamicine Vancomycine		

** Pour Streptocoques A, C, G, la liste minimale des antibiotiques à tester est : Pénicilline – Erythromycine. Devant toute résistance aux β-lactamines confirmer l'identification et les résultats de l'antibiogramme.

^a L'interprétation pour Tétracycline est valable pour Doxycycline.

^b Le disque ERY doit être appliqué près du disque CLIN : Si antagonisme entre disque ERY et disque CLIN, la souche présente une résistance inductible à la clindamycine. Dans ce cas, il faut répondre **CLIN Résistant** avec commentaire : « Souche Présumée résistante à Clindamycine- Risque d'échec thérapeutique ».

^c Détecter les souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

^d Antibiotiques testés uniquement dans le cadre de l'épidémiologie.

Boîte 3 : Inoculum dilué au 1/100, valeurs critiques CA-SFM (table de lecture 10 page 93).

Table de lecture 4 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus spp* chez toutes les espèces animales

Conditions du test :

Milieu : Gélose Mueller- Hinton ;

Inoculum : Colonies en suspension, 0,5 Mc Farland

Incubation : 35°C, atmosphère ordinaire ; 18 à 24h.

Contrôle de qualité :

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus aureus ATCC 28213 (Souche de référence pour les CMI)

Staphylococcus aureus ATCC 43300 souche MRSA

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
B-lactamines						
Amoxicilline+ac.clavulanique**	20/10µg	≤ 19	—	≥ 20	≥ 8/4	≤ 4/2
Penicilline	10 UI	≤ 28	—	≥ 29	β-lactamase	≤ 0,12
Oxacilline** - <i>S. aureus</i>	1 µg	≤ 10	11 – 12	≥ 13	≥ 4	≤ 2
- <i>Staphylocoque coagulase négative</i> ***		≤ 17	—	≥ 18	≥ 0,5	≤ 0,25
Cefoxitine - <i>S. aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i>	30µg	≤ 14	—	≥ 20		
- <i>Staphylocoque à coagulase négative</i>		≤ 24	—	≥ 25		
Cephalothine	30µg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Aminosides						
Neomycine	30 µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 64	≤ 16
Gentamicine***	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Macrolides						
Erythromycine	15 µg	≤ 13	14 – 22	≥ 23	≥ 8	≤ 0,5
Tilmicosine	15 µg	≤ 10	11 – 13	≥ 14	≥ 32	≤ 8
Glycopeptides						
Vancomycine	30µg	—	—	≥ 15	≥ 32	≤ 4

* Performance standards for antimicrobial susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standards – Second Edition. CLSI: Document M31-A2-Vol.24 N°17 May 2004 et tableau extrait du Document M100 – S16. Vol. 26, n°3. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement.

*** Incuber pendant 24h.

**** Autre que *S. lugdunensis*

***** Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiologie.

** Antibiotique testé seulement pour la recherche de la β-lactamase.

*** Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiologie.

Table de lecture 7 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI, pour *Streptococcus β hémolytiques* chez toutes les espèces animales.

Conditions du test :

Milieu : Gélose Mueller- Hinton additionnée de 5% de sang de mouton

Inoculum : Colonies en suspension, 0,5 Mc Farland

Incubation : 35°C, 5% CO₂; 20 à 24h.

Contrôle de qualité :

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Antibiotiques testés	Charge des disques	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (mm)			Valeurs Critiques CMI (µg/ml)	
		Résistant	Intermédiaire	Sensible	Résistant	Sensible
B-lactamines						
Penicilline	10UI	—	—	≥ 24	—	≤ 0,12
Ampicilline	10µg	—	—	≥ 24	—	≤ 0,25
Cefotaxime	30µg	—	—	≥ 24	—	≤ 0,5
Ceftiofur	30µg	—	—	≥ 24	—	≤ 0,25
Quinolones						
Enrofloxacin	5µg	≤ 16	17-22	≥ 23	≥ 4	≤ 0,5
Macrolides						
Erythromycine	15µg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 1	≤ 0,25
Lincosamides						
Clindamycine	2µg	≤ 15	16-18	≥ 19	≥ 1	≤ 0,25
Tetracyclines						
Tétracycline	30µg	≤ 18	19-22	≥ 23	—	≤ 2
Glycopeptides						
Vancomycine	30µg	—	—	≥ 17	—	≤ 1

** Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. CLSI: Document M31-S1-Vol.24 N°17 May 2004 et tableau extrait du Document M 100 – S16. Vol. 26, n°3. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement.

Agent antibactérien	Ident. des disques	Charge du disque (μg)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
			Résistant \leq	Limite	Sensible \geq
Ampicilline	AMP				
Bat G ⁻ entériques		10	11	12-13	14
<i>Actino. pleuropneumoniae</i>		10	21	22-24	25
Staphylocoques		10	28	-	29
Strept. non-entérocoques		10	21	22 - 29	30
Entérocoques		10	16	-	17
Chloramphénicol¹	C	30	12	13 - 17	18
Erythromycine	E	15	13	14 - 17	18
Gentamicine	CN	10	12	13 - 14	15
Néomycine	NE	30	12	13 - 16	17
Pénicilline	P				
Staphylocoques		10*	28	-	29
Strept. non-entérocoques		10*	19	20 - 27	28
Entérocoques		10*	14		15
Autres (Bâtonnets Gram-négatifs)		10*	11	12 - 21	22
Streptomycine	S	10	11	12 - 14	15
Sulfamidés	S3	300	12	13 - 16	17
Tétracycline	TE	30	14	15 - 18	19
<i>Actino. pleuropneumoniae</i>		30	25	26 - 28	29
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	1.25/23.75	10	11 - 15	16

* Unités internationales au lieu de μg

¹ Usage interdit chez les animaux destinés à la consommation humaine.

ANNEXE I
CRITERES MICROBIOLOGIQUES RELATIFS A CERTAINES DENREES ALIMENTAIRES

TABLEAU I
CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES LAITS ET DES PRODUITS LAITIERS

PRODUITS	n	c	m
1. Lait cru :			
— germes aérobies à 30° C	1	—	10 ⁵
— coliformes fécaux	1	—	10 ³
— streptocoques fécaux	1	—	abs/0,1ml
— <i>Staphylococcus aureus</i>	1	—	absence
— clostridium sulfito-réducteurs à 46° C	1	—	50
— antibiotiques	1	—	absence
2. Lait pasteurisé conditionné :			
— germes aérobies à 30° C	1	—	3.10 ⁴
— coliformes :			
* sortie usine	1	—	1
* à la vente	1	—	10
— coliformes fécaux			
* sortie usine	1	—	absence
* à la vente	1	—	absence
— <i>Staphylococcus aureus</i>	1	—	1
— phosphatase	1	—	négatif
3. Lait stérilisé et lait stérilisé UHT (nature et aromatisé) :			
— germes aérobies à 30° C	5	2	< 10/0,1 ml
— test de stabilité	5	0	négatif
— test alcool	5	0	négatif
— test chaleur	5	0	négatif
4. Lait concentré non sucré :			
— test de stabilité	5	0	négatif
— test alcool	5	0	negatif
— test chaleur	5	0	négatif
5. Lait concentré sucré :			
— germes aérobies à 30° C	5	2	10 ⁴
— coliformes	5	0	absence
— <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	absence
— clostridium sulfito-réducteurs à 46° C	5	0	absence
— levures et moisissures	5	0	absence
— <i>Salmonella</i>	5	0	absence
6. Lait déshydraté conditionné (1) :			
— germes aérobies à 30° C	5	2	5.10 ⁴
— coliformes	5	2	5
— <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	absence
— clostridium sulfito-réducteurs à 46° C	5	0	absence
— levures et moisissures	5	2	50
— <i>Salmonella</i>	5	0	absence
— antibiotiques	1	0	absence

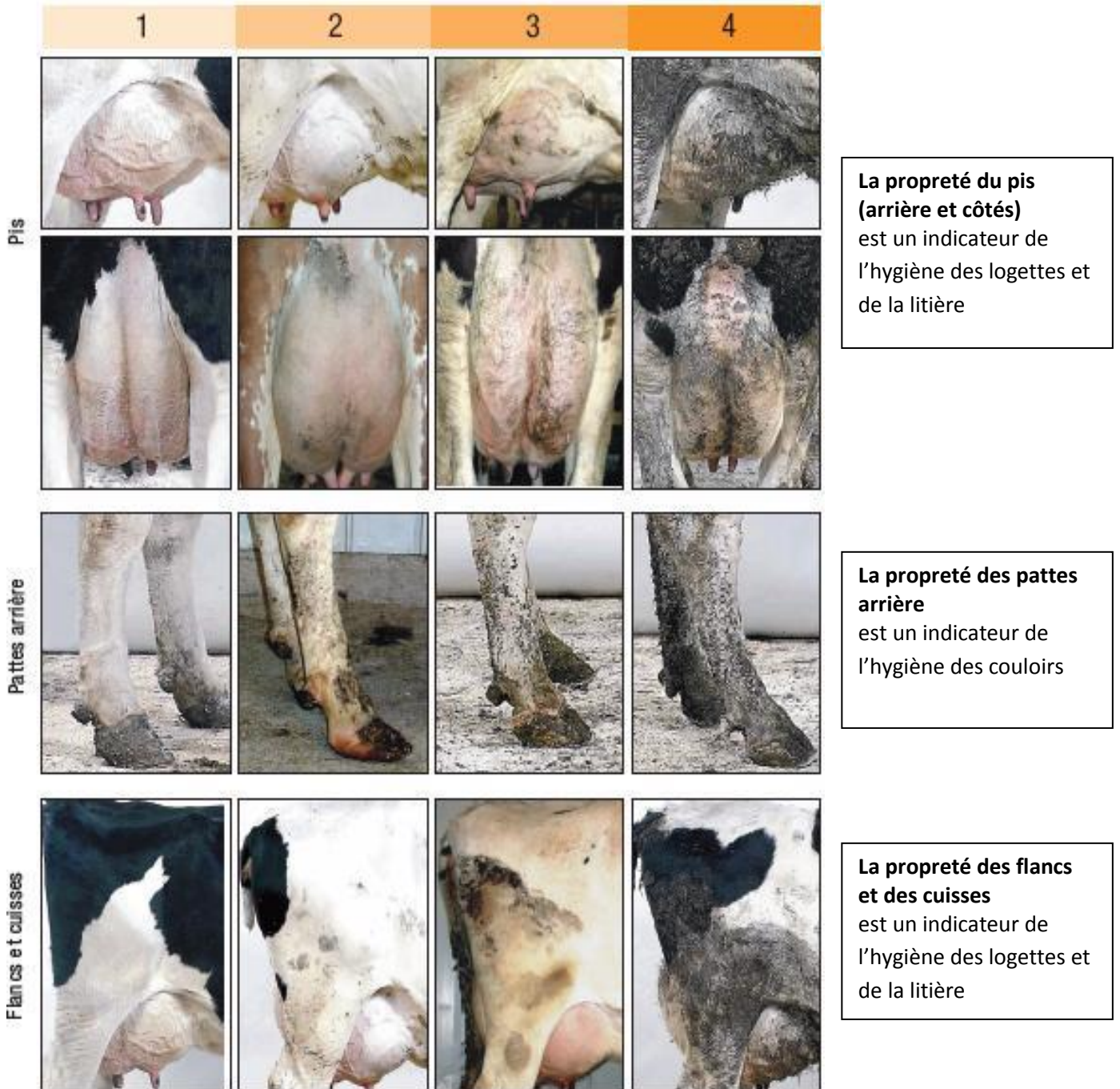
Annexe n°4 : Les caractères microbiologiques des germes responsables des mammites chez les bovins (Bidaud et al, 2007).

Germes de mammites	Aspect colonie sur gélose au sang	Catalase	Gram	Forme microscopique	Mobilité	Oxydase	Hémolyse	Rapidité de culture
<i>Staph.aureus</i>	Grosse colonie gris blanc ou jaune, odeur de pied	+ Forte	+	Coque en grappe de taille moyenne	Non	-	Souvent double avec α et β	24 à 48 h
Autres <i>Staph.</i>	Gosse colonie blanche crème	+	+	Coque en grappe de taille moyenne	Non	-	Pas d'hémolyse	24 h coagulation +
<i>S.agalactiae</i>	Petite colonie translucide	-	+	Coque en courte chaînette	Non	-	β hémolyse	24 à 48 h
<i>E.coli</i>	Blanche brillante large odeur de litiere humide et sale	Légèrement + ou -	-	Bâtonnets bien rangés	Oui ou non	-	Parfois	6 à 12 h

Annexe n°5 : Indice de propreté des vaches

Evaluation de la propreté des vaches. (Levesque, 2004)

Etat : **1** propre ; **2** relativement propre ; **3** souillé ; **4** très souillé



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

Adapté des fiches produites par le Faculté de médecine vétérinaire de l'Université du Wisconsin et de Pfizer Santé Animale. La plupart des photos sont une propriété de Pfizer.

Tableau Récapitulatif des règles pratiques d'hygiène de traite (Charron, 1986)

	Recommandé	Acceptable	A éviter
Lavage des mamelles	Lavette individuelle pour le lavage et l'essuyage	Douchette et essuyage avec des serviettes individuelles de papier	Une même lavette pour plusieurs vaches Mamelles dégoulinantes à la pose des gobelets Suppression du lavage
Elimination des premiers jets	Dans un récipient	Au sol en salle de traite	Sur les mains Au sol en étable entravée
Pose des gobelets	Immédiatement après le lavage Pas d'entrée d'air	Attente prolongée après le lavage Entrée d'air importante	
Ordre de traite	Traite en dernier des vaches infectées (cas clinique, CMT ou taux cellulaires élevés)	Un ou deux faisceaux supplémentaires en salle de traite pour les vaches infectées	
Fin de traite	Egouttage bref sans entrée d'air Dépose des gobelets par gravité après coupure du vide	Suppression complète de l'égouttage Utilisation de systèmes de décrochage automatique fonctionnant bien	Egouttage long, avec entrée d'air Dépose par arrachage avec entrée d'air Longue surtraite
Désinfection des trayons	Systématiquement après chaque traite après trempage	Utilisation de certains systèmes de pulvérisation	Pas de désinfection ou désinfection mal faite et intermittente
Autres	Traite en douceur Pas de modifications brutales de la routine	Coups, bruits, chocs élec. Modifications brutales de la routine	

Annexe n°6 : Questionnaire utilisé pour l'enquête.

UNIVERSITE ABDELHAMID BENBADIS DE MOSTAGANEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

LABORATOIRE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE PRODUCTION ANIMALE

Master II Exploitation des Ecosystèmes Microbiens Laitiers

Questionnaire sur l'état zooteknique et sanitaire des exploitations de la Wilaya de

Nous remercions les collecteurs et les éleveurs pour leur participation à cette enquête, et nous les rassurons que ce travail se déroule dans le but de la recherche, il ne s'agit pas de service de contrôle, ni de finance.

N° d'ordre de l'exploitation : /_//_ / visite n° /_ / Date de la visite : /_//_ /- /_//_ /- /_//_ /

Daira : Commune Code Wilaya : /_//_ /

CARACTERISTIQUES DU TROUPEAU

1. Elevage :

- Assurance : oui /_ / non /_ / CRMA: /_ / Autre /_ / :
- Adhésion à une association d'éleveurs: oui /_ / non /_ /
- Présence d'un registre d'élevage : oui /_ / non /_ /
- Conception: Stabulation libre /_ / Entravée /_ /
- Agrément de l'élevage : oui /_ / non /_ / Type :
- Nombre de bovins dans l'exploitation : Total.....
 - + Vaches /_//_ / Génisses /_//_ / Reproducteurs /_//_ / veaux /_//_ / vèles /_//_ /
 - + Age moyen des vaches : de /_//_ / à /_//_ / ans
 - + Nombre de vache en lactation : /_//_ /
- Races exploitées :
 - +Pie Rouge /_ /.....
 - +Pie Noire /_ /.....
 - + Tarentaise /_ /
 - + Autre /_ /.....

2. Environnement et habitat:

- Etat des abords du bâtiment et de l'ensemble de l'exploitation sont dans un bon état d'entretien e de propreté : oui /_/_/ non /_/_/
- Présence d'un pédiluve à l'entrée de l'exploitation : oui /_/_/ non /_/_/
- Présence d'un pédiluve à l'entrée de l'étable : oui /_/_/ non /_/_/
- Stalle : bétonnée : oui /_/_/ non /_/_/
- Présence de litière : oui /_/_/ non /_/_/ Si oui, Qualité de la litière : Sèche /_/_/ Humide /_/_/

3. Aménagement des locaux annexes:

- + Local de mise bas : oui /_/_/ non /_/_/
- + Présence de nurserie : oui /_/_/ non /_/_/
- + Local de jeune bovin : oui /_/_/ non /_/_/
- + Salle de traite : oui /_/_/ non /_/_/
- + Local de stockage des aliments : oui /_/_/ non /_/_/
- + Aire d'exercice : oui /_/_/ non /_/_/
- + Superficie de l'étable : (Vaches laitières).....
- + Surface par vache :.....

4. Alimentation :

- Nombre de Repas par jour : /_/_/
- Abreuvement : auge /_/_/ automatique /_/_/ autre, préciser :.....
- source d'abreuvement : puit: /_/_/ oued: /_/_/ forage: /_/_/ autre: /_/_/ préciser :.....
- Pâturage : oui /_/_/ non /_/_/ - période (mois) :.....
- Ration de base :

Aliment	Mais	Sorgo	Soja	Paille	Fourrage	Concentré	Autres
Quantité							

Qualité du fourrage : bonne /_/_/ moyenne /_/_/ médiocre /_/_/

- Ration de Production :

Aliment	Mais	Sorgo	Soja	Paille	Fourrage	Concentré	Autres
Quantité							

- Pierre à lécher: oui /_/_/ non /_/_/

Planning fourrager :

Fourrages	janv	fév	mar	avr	mai	juin	juil	aou	sep	oct	nov	dec
F. avoine												
F vert naturel												
Ensilage												
Luzerne												

5. Conduite de la reproduction :

- Présence de registre des saillies et des vêlages : oui /_ / non /_ /
- Age à la mise à la reproduction des femelles: /_ // _ / mois
- Intervalle entre 2 vêlages :
- Nombre de vêlage en 2013
- Insémination artificielle /_ / Monte naturelle /_ /
- Origine du géniteur : Exploitation /_ / Hors exploitation /_ /
 - + Si hors exploitation, précisez lieu d'origine :
- Statut sanitaire du géniteur connu : oui /_ / non /_ /
 - + Dépistage de la brucellose: oui /_ / non /_ /
 - + Dépistage de la tuberculose : oui /_ / non /_ /
 - + Vaccination anti-aphteuse: oui /_ / non /_ /
 - + Drogage : oui /_ / non /_ /
 - + Déparasitage externe: oui /_ / non /_ /
- Isolement du reproducteur introduit avant l'accouplement : oui /_ / non /_ /
- Caractéristiques du reproducteur :
 - + Race Pie Rouge /_ /
 - + Race Pie Noire /_ /

6. Conduite du troupeau :

- Présence de registre d'identification des animaux : oui /_ / non /_ /
- Identification des animaux (boucles) : oui /_ / non /_ /
- Respect des contrôles de dépistage obligatoire : oui /_ / non /_ /
- Date du dernier contrôle : /_ // _ /- /_ // _ /- /_ // _ // _ /
- Présence d'autres espèces animales : oui /_ / non /_ /
 - Ovins /_ / Caprins /_ / Equidés /_ / Chiens /_ / Chats /_ / volailles /_ /
- Mise en quarantaine avant l'introduction des animaux dans l'étable : oui /_ / non /_ /

7. Conduite de la traite :

- Présence de registre de la traite: oui /_ / non /_ /
- Manuelle : /_ / - Mécanique à chariot /_ / - Mécanique en salle de traite /_ /
- Horaire de traite : /_ // _ /- /_ // _ / heures et /_ // _ /- /_ // _ / heures
- Quantité globale : /_ // _ // _ // _ / litres
- Production minimale par vache: /_ // _ // _ // _ / litres
- Production maximale par vache: /_ // _ // _ // _ / litres
- La totalité de la production est livrée à la laiterie : oui /_ / non /_ /
 - Autres : + Aliment pour les veaux : oui /_ / non /_ /
 - + Consommation personnelle : oui /_ / non /_ /
- Lavage des trayons avec de l'eau chaude: oui /_ / non /_ /
- Désinfection des trayons avant la traite : oui /_ / non /_ / Nature du produit :.....
- Essuyage des trayons avec des lavettes : oui /_ / non /_ / individuelle /_ / collective /_ /
- Elimination du premier jet avant la traite: oui /_ / non /_ / dan un récipient /_ / sur le so
- Trempage des trayons dans un gel après la traite : oui /_ / non /_ /
 - + Désinfectant utilisé :
- Stockage du lait : Bidons /_ / Tank /_ /
 - + Capacité du stockage : /_ // /_ // /_ // / litres Durée du stockage : /_ // _ / heures
- Hygiène du matériel de stockage : oui /_ / non /_ /
- Propreté des gobelet-trayeurs : oui /_ / non /_ /
- Nettoyage de l'équipement de stockage : oui /_ / non /_ / précisez :
- Collecte quotidienne : oui /_ / non /_ / si non, précisez :
- Hygiène des trayeurs : oui /_ / non /_ /
 - + Lavage des mains avant la traite : oui /_ / non /_ /
 - + Port d'une tenue de travail: oui /_ / non /_ /
 - + Port de bottes: oui /_ / non /_ /

8. Situation sanitaire :

- Présence d'une registre sur l'état de santé des animaux: oui /_ / non /_ /
- Statut sanitaire des animaux introduits connu : oui /_ / non /_ /
 - + Dépistage de la brucellose (par sérologie): oui /_ / non /_ /
 - + Dépistage de la tuberculose (par intradermo-réaction) : oui /_ / non /_ /
 - + Vaccination anti-aphteuse: oui /_ / non /_ /
 - + Drogage : oui /_ / non /_ /
 - + Déparasitage externe: oui /_ / non /_ /

- + Détection des mammites: oui /_/_/ non /_/_/
- + Détection des antibiotiques : oui /_/_/ non /_/_/
- + Contrôle bactériologique périodique du lait: oui /_/_/ non /_/_/
- Présence de document sanitaire valide : oui /_/_/ non /_/_/

Maladies observées en 2013:

- Mammite: oui /_/_/ non /_/_/ Nombre : /_/_/_/
- Avortement: oui /_/_/ non /_/_/ Nombre : /_/_/_/
- Mortalité embryonnaire: oui /_/_/ non /_/_/ Nombre : /_/_/_/
- Boiteries: oui /_/_/ non /_/_/ Nombre : /_/_/_/
- Anoestrus: oui /_/_/ non /_/_/ Nombre : /_/_/_/
- Fièvre vitulaire : oui /_/_/ non /_/_/ Nombre : /_/_/_/
- Autres : Nombre : /_/_/_/
- Nombre : /_/_/_/
- Nombre : /_/_/_/
- Nombre : /_/_/_/

-Temps passé pour le questionnaire :

Début :h/.....mn.

Fin :h/.....mn.

OBSERVATIONS :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Nom et Prénom de l'enquêteur :

Annexe n°7 : Exemples de documents pour la conduite des vaches laitières.

Certificat généalogique d'une vache (ferme 1)

Eleveur détenteur
GAEC DES 4 CHEMINS
22110 PLOUENEVEZ QUINTIN

Eleveur naisseur
EARL TANGUY PASCAL
29420 PLOUENAN

Exportée par FIRMA DEKKER FRANCE

N°Travail 2748

Ref : 16-10927



PEDIGREE de JANELLA

Certificat généalogique délivré conformément à la décision 2005/379/CE de la Commission pour les échanges intracommunautaires.

S U J E T

Nom JANELLA
Sexe F N° FR 2937242748
Identifiée par deux boucles auriculaires
Née le 23/01/2014 Race 66 PRIM'HOLSTEIN

Index Synthèse Unique ND

Index Production 16/30 ND:AS						
cd	INEL	MP	MG	TP	TB	Lait
39	+11	+8	+11	+0.0	+0.6	+274

Index Fonctionnels (LGF;NAI;VEL):ND

REPRO STMA	
1630	1630
+0.7	+1.2

P E R E

GUESS FR 2921587691
Né le 29/06/2011 Race 66 PRIM'HOLSTEIN

Index Synthèse Unique 16/35 ISU+161

Index Production 16/35						
cd	INEL	MP	MG	TP	TB	Lait
95	+34	+29	+25	+0.5	-0.4	+730

Index Fonctionnels

REPRO	STMA	cd	LGF	cd	NAI	cd	VEL
1635	1635	1635	1635	1635	1635	1635	1635
+0.3	+1.4	64	+0.6	95	92	90	94

Index Morphologie 16/35

cd	MO	MA	CC	ME
94	+1.8	+0.7	+1.0	+2.0

Typages TL TY TV

G M M

AFRAN GER FR 4430688344
Né le 23/06/2005 Race 66 PRIM'HOLSTEIN

Index Synthèse Unique 16/35 ISU+146

Index Production 16/35						
cd	INEL	MP	MG	TP	TB	Lait
95	+23	+21	+20	-0.7	-1.5	+819

Index Fonctionnels 16/35

REPRO	STMA	cd	LGF	cd	MO	MA	CC	ME
-0.9	+1.3	95	+0.1	95	+3.1	+1.6	+3.1	+1.9

Typages TL TY TV

AGPP : FR D345515580 MANAGER MT
AGMP : FR 4430837264 TEQUILA

M E R E

EGYPTIENNE FR 2937242555
Née le 17/09/2009 Race 66 PRIM'HOLSTEIN

Index Synthèse Unique ND

Index Production 16/30						
cd	INEL	MP	MG	TP	TB	Lait
59	-13	-13	-3	-0.5	+1.5	-183

Index Fonctionnels 16/30 (LGF;NAI;VEL):ND

REPRO	STMA
+1.1	+1.0

G M M

USOKO FBD FR 5632667175
Né le 28/04/2003 Race 66 PRIM'HOLSTEIN

Index Synthèse Unique 16/35 ISU+104

Index Production 16/35						
cd	INEL	MP	MG	TP	TB	Lait
95	+9	+10	+9	-1.7	-2.4	+862

Index Fonctionnels 16/35

REPRO	STMA	cd	LGF	cd	MO	MA	CC	ME
-0.2	+0.1	95	+1.0	95	-0.5	-0.5	+0.1	-0.3

Typages TL TV

AGPM : FR US17011697 FORBIDDEN
AGMM : FR 5632667008 SOKONESSE

G M M

CAPUCINE FR 2937242493
Née le 03/07/2007 Race 66 PRIM'HOLSTEIN

Index Synthèse Unique ND

Index Production 16/30						
cd	INEL	MP	MG	TP	TB	Lait
60	-30	-26	-18	-1.0	+0.6	-556

Autres Index 16/30

REPRO STMA
+2.1 +1.6

Lactations en 305 jours

Méth	N°	Age	durée	lait	TB	TP	MG	MP	TA
A 4	1	2.02	305	7175	38.4	30.0	275	214	31.5
MOY	6		305	7777	39.2	30.6	304	237	32.2
ML	3	4.00	305	9066	38.8	30.1	351	273	31.7

AGPM : FR 2206001756 MERDRIGNAC
AGMM : FR 2937242306 REINETTE

L A C T A T I O N S

Lactations sujet

Méth	N°	Age	durée	lait	TB	TP	MG	MP	TA
A 6	1	2.02	305	5875	41.0	30.8	240	181	32.4
A 5	2	3.03	305	6627	38.7	30.3	256	200	31.9
A 5	3	4.04	305	6485	45.1	31.1	292	201	32.7
A 4	4	5.06	163	4876	47.9	28.2	233	137	29.6
MOY	4		281	5965	42.9	30.2	255	180	31.8
ML	3	4.04	305	6485	45.1	31.1	292	201	32.7

Le soussigné certifie que ce document contient les données mentionnées à l'article 2 de la Décision 2005/379/CE de la Commission pour les reproducteurs de race pure.

Le 19/12/2016
A Saint Sylvain d'Anjou
Le Directeur, D. BIERI




Agrément sanitaire délivré par l'inspection vétérinaire de la wilaya

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'AGRICULTURE DU DEVELOPPEMENT RURAL ET DE LA PECHE
WILAYA DE MOSTAGANEM
DIRECTION DES SERVICES AGRICOLES
INSPECTION VETERINAIRE DE WILAYA
N° 780 /SC.DSA/...71.../VW/...2017

AGREMENT SANITAIRE D'UN ETABLISSEMENT D'ELEVAGE BOVIN
TYPE D'EXPLOITATION : C
LA DUREE DE VALIDITE EST DE 06 MOIS.

JE SOUSSIGNE (E) DOCTEUR ... BERBER EL HACHEMI..... N° D'A.V.N ...95054
GRADE...Insp.VETERINAIRE... AVOIR INSPECTE CE JOUR ...02/02/2017... L'ETABLISSEMENT
D'ELEVAGE BOVIN APPARTENANT A FERME ITA UNIVERSITE MOSTAGANEM...ADRESSE... HASSI
MAMECHE.

STATUT SOCIAL DE L'ETABLISSEMENT (1) ...P.....ASSURE A.../... POLICE N°.../...

ATTESTE QUE

- 1)- CET ETABLISSEMENT D'ELEVAGE EST CONFORME EN MATIERE D'HYGIENE ET DE NORMES D'ELEVAGE, SA CAPACITE EST DE ...8... TETES BOVINS.
 - 2)- LES BOVINS SONT INDEMNES CLINIQUEMENT CONTRE LA RAGE ET LA FIEVRE APTEUSE.
 - 3)- CET ELEVAGE EST INDEMNE DE MALADIES CONTAGIEUSES, NOTAMMENT LA BRUCELLOSE ET LA TUBERCULOSE.
 - 4)- CES ANIMAUX SONT INDEMNES DE LEUCOSE (2) ET INDEMNE DE MAMMITE (3)
 - 5)- LE NOMBRE DE BOVINS DEPISTES : 3 TETES.../ EN LETTRE...TROIS... RACE : PN/PR
 - 6)- LE NOMBRE DE VACHES EN PRODUCTION LAITIERE : /...3...TETES_/ EN LETTRE...TROIS
- EN FOI DE QUOI, CET ETABLISSEMENT EST AGREE SOUS LE N° :

_ 2 / 7 / 1 / 8 / 274

VISA DU DR VETERINAIRE

FAIT A MOSTAGANEM LE14/02/2017


Dr. BERBER EL HACHEMI
Inspecteur Vétérinaire
A.V.N. - N°95054

VISA DE L'INSPECTEUR VETERINAIRE DE WILAYA

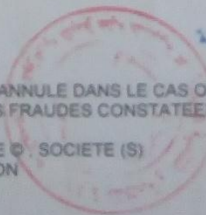
LE DIRECTEUR DES SERVICES AGRICOLES

Inspecteur Vétérinaire
de Wilaya

Dr. R. BENACEUR

8/- CE PRESENT AGREMENT PEUT ETRE MODIFIE, SUSPENDU, ANNULE DANS LE CAS OU LE STATUT SANITAIRE DEVIENT DEFAVORABLE, IL PEUT ETRE AUSSI ANNULE LORS DE TOUTES FRAUDES CONSTATEES SUR LA QUANTITES ET/LA QUALITE DU LAIT.

- (1) : PRIVE (P), OFFICE (O), FERME PILOTE (F), COOPERATIVE (C), SOCIETE (S)
(2) POUR L'EXPLOITATION A ET B (3) POUR L'EXPLOITATION



لواء الزراعة
بولاية مستغانم
م. ب. 04000

Table des matières

- Remerciement	
- Dédicace	
- Résumé	
- Sommaire	
- Liste des tableaux	
- Liste des figures	
- Liste des annexes	
- Liste des abréviations	
- Introduction	1
Chapitre I : Généralités sur les bovins	
1. Les races bovines existantes en Algérie : locales et importées	4
1.1. Les races exploitées.....	4
1.1.1. Les races locales.....	4
1.1.2. Les races hautes productrices.....	5
1.1.3. Les races améliorées ou mixtes.....	6
1.1.4. Un cheptel très diversifié	7
2. L'alimentation (nature, quantité et qualité)	7
2.1. Alimentation des vaches laitières en Algérie	7
2.2. Guide d'alimentation des vaches laitières.....	9
2.2.1. Consommation de matière sèche (MS)	9
2.3. Hygiène et santé	11
2.4. Hygiène et prophylaxie.....	11
3. Les mamelles.....	12
3.1. Anatomie de la mamelle	12
3.2. Trayon	16
3.3. Les défenses de la mamelle	18
3.3.1. Le canal du trayon	18
3.3.2. Les défenses cellulaires.....	18
3.3.3. Les défenses non cellulaires.....	19
3.3.4. Particularité de la période sèche	19
4. Généralités sur le lait.....	21
4.1. Définition du lait	21
4.2. Flore originelle	22
4.3. Flore de contamination.....	23
Chapitre II : Les différents types de mammites bovines	
1. Définition d'une mammite	26
2. Différents types de mammites	26
2.1. Les mammites cliniques	26
2.1.1. Les mammites suraiguës.....	26
2.1.2. Les mammites aiguës	27
2.1.3. Les mammites chroniques	28
2.2. Les mammites sub-cliniques	28
2.3. Les mammites d'été	28
3. Caractéristiques pathologiques des mammites.....	30
4. Origine des mammites : Etiologie des mammites bovines.....	31
4.1. Les causes prédisposantes	31
4.1.1. Les facteurs intrinsèques	31
4.1.2. Les facteurs extrinsèques	34
4.2. Les causes déterminantes	36
4.2.1. Les pathogènes majeurs	36
4.2.2. Les pathogènes mineurs	41
5. Prévalence des germes responsables de mammites.....	44
5.1. Lors de mammites cliniques	44

5.2. Lors de mammites subcliniques	45
6. Importance des mammites bovines.....	45
6.1. Importance médicale	45
6.2. Importance sanitaire	46
6.3. Importance économique	46
7. Pathogénie des infections mammaires	46
7.1. Pénétration des bactéries dans la mamelle	46
7.2. Infection du quartier mammaire	47
7.3. Guérison ou persistance de l'infection.....	48

Chapitre III : Diagnostic des infections mammaires

1. L'examen clinique	51
1.1 Examen clinique de la mamelle.....	51
1.2 Examen de la sécrétion lactée	52
2. Le papier indicateur de pH.....	53
3. Le California Mastitis Test (C.M.T.)	54
3.1. Mode d'action	54
3.2. Méthode	55
3.3. Valeur du test	57
4. La conductivité électrique du lait.....	57
5. Les concentrations cellulaires somatiques du lait	58
6. le diagnostic étiologique des infections mammaires.....	62

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1. Objectif	64
2. Présentation de la première zone d'étude	64
3. Présentation de la deuxième zone d'étude	68
4. Présentation du laboratoire LSTPA	72
5. Enquête de terrain	72
6. Prélèvement	74
6.1 Premier prélèvement à partir de la vache pie noire (LSTPA).....	74
6.2 Deuxième prélèvement à partir de la vache pie noire (ferme de Hadjaj).....	75
6.3 Technique de prélèvement	75
6.4 Matériel nécessaire	75
6.5 Mode opératoire.....	76
7. Analyse microbiologique	77
7.1 Etude de la flore pathogène.....	77
7.2 Méthodes	77
7.2.1. Préparation des dilutions décimales	77
7.2.2. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale	78
7.2.3. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux.....	79
7.2.4. Recherche et dénombrement des staphylocoques	79
7.2.4.1. Confirmation sur BHIB (bouillon cœur-cerveille).....	80
7.2.4.2. Test au plasma de lapin (coagulase)	80
7.2.4.3. Test de la DNase thermostable.....	81
7.2.5. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.....	81
7.2.5.1. Test de présomption	82
7.2.5.2. Test de confirmation (Eva Lytski)	82
7.2.5.3. Recherche d'hémolyse par gélose au sang frais	82
7.2.5.4. Test de sensibilité à la bacitracine	83
8. Examen macroscopique	84
8.1. Aspect des colonies	84
9. Examen microscopique	85
9.1. Coloration de Gram	85
10. Recherche de la catalase	86
11. Recherche de l'oxydase	87

12. Test TSI (triple sugar iron)	88
12.1. Principe et intérêts.....	88
12.2. Interprétation des résultats possibles	88
13. Test de l'urée indole	89
14. Test ADH	90
15. Test ONPG	92
15.1. Recherche de la β -galactosidase	92
16. Tests RM (rouge de méthyle) et VP (Voges-Proskauer)	93
17. Test Mannitol mobilité	95
18. Test Nitrate réductase : (Recherche des nitrate-réductases)	96
19. Antibiogramme.....	97
20. Technique d'identification PCR	98

Chapitre V : Résultats et discussion

21. Résultats et discussion	102
21.1. Indice de propreté et hygiène au niveau des 2 fermes.....	102
21.2 Résultats de l'analyse microbiologique pour la ferme de Hassi-Mamèche	102
21.2.1. Résultats de la recherche de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)	102
21.2.2. Résultats de la recherche de Coliformes fécaux	103
21.2.3. Résultats de la recherche de Staphylocoques.....	104
21.2.3.1. Ensemencement sur le milieu Chapman.....	104
21.2.3.2. Ensemencement sur le milieu Baird Parker.....	104
21.2.3.3. Résultats des tests.....	105
21.2.4. Résultats de la recherche de Streptocoques fécaux.....	108
21.2.5. Résultats de dénombrement des germes pathogènes	113
21.3. Résultats de l'analyse microbiologique pour la ferme de Hadjadj	114
21.3.1. Résultats de la recherche de la flore mésophile aérobie totale	114
21.3.2. Résultats de la recherche de Coliformes fécaux	114
21.3.3. Résultats de la recherche de Staphylocoques.....	115
21.3.3.1. Ensemencement sur le milieu Chapman	115
21.3.3.2. Résultats des tests	116
21.3.4. Résultats de la recherche de Streptocoques fécaux.....	119
21.3.5. Résultats de dénombrement des germes pathogènes	124
21.4. Résultats de l'examen macroscopique pour les 2 fermes.....	125
21.5. Résultats de l'examen microscopique pour les 2 fermes	125
21.6. Résultats des tests d'identification biochimique pour les deux fermes.....	126
21.7. Résultats d'antibiogramme pour les 2 fermes	132
21.8. Résultats de la technique PCR	136
22. Discussion.....	138
22.1. Types de germes isolés	138
22.2. Interprétation des antibiogrammes	139
22.3. Analyses microbiologiques	139
22.4. Prévention des mammites	140
23. Conclusion	142

- Références Bibliographiques
- Annexes