

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE IBN KHALDOUNE-TIARET-



INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES.

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en sciences vétérinaires

THEME

Caractérisation des souches de *Staphylococcus aureus*
impliquées dans les mammites bovines

 Présentée par :

Mr BOUZIDI Said

Soutenue publiquement le : 30/10/2021

Devant le jury :

-Président : Mr ABDELHADI Si Ameer	Professeur	-Université de Tiaret-
-Rapporteur : Mme BOURABAH Akila	MCA	-Université de Tiaret-
-Examineur : Mr TEFIEL Hakim	MCA	- Université de Tissemsilt -
-Examineur : Mme ZIDANE Azdina	MCA	-Université de Chlef-
-Examineur : Mme BOUMEZRAG Assia	MCA	-Université de Tiaret-
-Examineur: Mr AMMAM Abdelkader	MCA	-Université de Saida-

Année universitaire : 2021/2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout-puissant de m'avoir donné la volonté et la santé pour réaliser ce modeste travail.

À la mémoire de la défunte **GHAZI Kheira** qui m'a accompagné en tant que promotrice durant les trois premières années de préparation de ce projet. Son aide et ses qualités humaines ne seront jamais oubliés. Que ce travail soit un hommage à son âme.

Mes remerciements vont tout d'abord à madame **BOURABAH Akila** maitre de conférences classe "A" à l'institut des sciences vétérinaires-Université IBN KHALDOUN -TIARET- qui m'a honoré d'avoir accepté l'encadrement de ce travail, et de m'avoir fait confiance. Merci pour ta gentillesse, tes encouragements, tes conseils judicieux, ta disponibilité dans les moments difficiles et ton respect mutuel sans faille.

Que ce travail soit le témoignage de ma profonde gratitude.

Je témoigne ma reconnaissance à Mr **ABDELHADI Si Ameur** pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury.

Je remercie vivement Mr **TEFIEL Hakim** pour avoir accepté de juger ce travail.

Un grand hommage à Mme **ZIDANE Azdinia** pour avoir accepté en toute modestie d'examiner ce travail.

Un immense merci à Mme **BOUMEZRAG Assia** de nous avoir honorés en acceptant d'examiner aimablement ce travail.

Un merci particulier à Mr **AMMAM Abdelkader** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à monsieur **AGGAD Hebib** directeur du laboratoire d'hygiène et de pathologie animale à l'institut des sciences vétérinaires –Université de Tiaret- pour m'avoir accueilli dans son laboratoire afin de réaliser la partie expérimentale, et sans oublier le laborantin **DOUCENE Radhouane** pour son aide.

Un grand merci à Monsieur **ABBASSI Mohamed Salah** professeur assistant en bactériologie à l'institut de recherche vétérinaire –Université d'El Manar-Tunis- qui nous a réalisé la partie relative à la caractérisation moléculaire des souches bactériennes avec une grande générosité et sans aucune contrainte. Je vous exprime ma profonde gratitude et un immense respect pour ton aide inestimable.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude à Mme **MELIANI Samia** maître de conférences classe "A" à la faculté des sciences de la nature et de la vie-Université IBN KHALDOUN -TIARET- pour sa bienveillance et sa simplicité avec lesquelles elle nous a aidés.

Je remercie énormément ;

Dr **MENNAD Djillali**, Dr **ATHMANI Kamel** et Dr **LASBET Boubakr** vétérinaires praticiens privés pour leur aide et leur soutien.

Enfin à toute personne qui a contribué de loin ou de près à la réussite de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail À; ALLAH le tout-puissant à qui je dois tout.

À mes Chers Parents; Pour leur amour, leurs encouragements et soutien sans failles, Je les remercie de m'avoir accompagné tout au long de mon parcours.

À mes sœurs; Hanane, Nacera, Malika, Sarra et à mon frère Bachir Qui ont beaucoup apporté à la réalisation de ce projet.

À toute ma Famille.

À tous mes amis.

Table des matières

Liste des abréviations.

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Résumé.

. ملخص

Abstract .

INTRODUCTION.....1

PARTIE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapire 1. Les mammites bovines

1.1. Généralités sur les mammites.	3
1.1.1. Définitions :	3
1.1.1.1. Mammite :	3
1.1.1.2. Mammite clinique :	3
1.1.1.3. Mammite subclinique :	4
1.1.2. Anatomie de la mamelle :	4
1.1.2.1. Mamelle :	4
1.1.2.2. Trayon:	8
1.1.3. Les défenses de la mamelle :	10
1.1.3.1. Le canal du trayon :	10
1.1.3.2. Les défenses cellulaires :	10
1.1.3.3. Les défenses non cellulaires :	11
1.2. Pathogénie des infections mammaires :	14
1.2.1. Pénétration des bactéries dans la mamelle :	14
1.2.2. Infection du quartier mammaire :	17
1.2.3. Guérison ou persistance de l'infection :	17
1.3. Étiologie :	18
1.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> :	18
1.4. Diagnostic :	20
1.4.1. Diagnostic clinique :	20
1.4.1.1. Examen clinique de la mamelle :	20
1.4.1.2. Examen de la sécrétion lactée :	23
1.4.1.3. L'examen clinique général :	23
1.4.1.4. Gradation des mammites :	25

1.4.2. Le diagnostic cellulaire (le dénombrement des cellules du lait) :	26
1.4.2.1. Méthodes directes :	26
1.4.2.2. Méthodes indirectes :	30
1.5. Modèles épidémiologiques :	34
1.5.1. Modèle mammaire ou modèle contagieux :	34
1.6. Facteurs de risque :	36
1.7. Examens complémentaires :	38
1.7.1. Bactériologie :	38
1.7.2. Polymerase Chain Reaction(PCR) :	41
1.8. Traitement des infections intra-mammaires :	41
1.8.1. Vaccination :	42
1.8.2. Traitements symptomatiques et de soutien :	44
Fluidothérapie :	44
Anti-inflammatoires :	44
1.8.3. Traitement hygiénique :	45
Hygiène et santé des animaux :	45
Augmentation du nombre de traites par jour :	45
1.8.4. Antibiotiques :	46
1.8.4.1. Plans d'antibiothérapie :	46
1.8.4.1.1. Plan de traitement des mammites cliniques en lactation en première intention:	47
1.8.4.1.2. Antibiothérapie des mammites subcliniques en lactation en première intention:	48
1.8.4.1.3. Plans de traitement au tarissement :	49
Chapitre 2. Etude de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	
2.1. Historique:	51
2.2. Habitat :	52
2.3. Position taxonomique :	53
2.4. Identification de l'espèce au sein du genre :	53
2.4.1. Caractères morphologiques :	53
2.4.2. Caractères culturels :	54
2.4.3. Caractères biochimiques :	55
2.5. Facteurs de virulence :	56
2.5.1. Protéines de surface (colonisation):	57
2.5.2. Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose:	60
2.5.3. Facteurs conduisant à l'extension de l'infection:	62
2.5.3.1. Toxines staphylococciques :	62

2.5.3.2. Super antigènes :	64
2.5.3.3. Les enzymes :	66
2.5.4. Facteurs de persistance :	68
2.6. Support génétique de la virulence :	69
2.7. Régulation des facteurs de virulence :	70
2.8. Résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques :	70
2.8.1. Définition de l'antibiorésistance :	70
2.8.2. Evolution de l'antibiorésistance de <i>S. aureus</i> :	71
2.8.2.1. Situation en médecine humaine :	71
2.8.2.2. Situation en médecine vétérinaire :	73
2.8.3. Mécanismes de résistance :	74
2.8.3.1. Résistance à la méthicilline :	75
2.8.3.2. Autres résistances :	76

Chapitre 3. Technique d'amplification en chaine par polymérase

3-1-Définition:	78
3-2-Historique :	78
3-3-Principe de la technique :	78
3-4-Etapes de la PCR :	79
3-5-Variantes de la PCR:	81
3-5-1-La PCR classique :	81
3-5-2-La PCR en temps réel (PCR quantitative) :	81
3-5-3- La PCR multiplex :	81
3-5-4-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) :	81
3-6-Domains d'application :	82

PARTIE II. ETUDE EXPERIMENTALE

Matériel et méthodes

1. Rappel sur les objectifs :	83
2. Durée et lieu de l'étude :	83
3. Méthodologie :	83
3.1. Examen clinique des mamelles :	83
3.2. L'unité du prélèvement :	84
3.3. Moment du prélèvement :	84
3.4. Test CMT :	84
3.5. Réalisation du prélèvement pour la bactériologie:	86
3.6. Enquête épidémiologique :	86

3.7. Conservation et transport des prélèvements :	86
3.8. Préparation des échantillons :	88
3.9. Isolement et caractérisation phénotypique des souches :	88
3.9.1. Isolement :	88
3.9.2. Purification des isolats :	88
3.9.3. Recherche du caractère hémolytique:	88
3.9.4. Identification biochimique :	89
Identification du genre :	89
Identification de l'espèce :	89
3.9.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) :	92
3.10. Contrôle de qualité de l'antibiogramme :	93
3.11. Conservation des souches :	93
3.12. Caractérisation moléculaire des isolats :	94
3.12.1. Principe de la technique :	94
3.12.2. Protocole :	94
3.12.2.1. Extraction de l'ADN bactérien :	94
3.12.2.2. Mélange réactionnel :	94
3.12.2.3. Identification moléculaire des isolats :	95
3.12.2.4. Recherche des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques :	96
3.12.2.5. Détection des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose:	97
4. Analyse statistique :	99

PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSION

1-Examen clinique des mamelles :	100
2-Diagnostic de la santé mammaire par le test CMT :	100
3-Résultats de l'enquête épidémiologique :	102
4-Résultats de la bactériologie :	104
5-Résultats de l'antibiogramme :	108
5-1-Souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méthicilline (SARM) :	108
5-2-Souches de <i>Staphylococcus aureus</i> sensibles à la méthicilline (SASM) :	112
6-Résultats de la caractérisation moléculaire des isolats :	119
6-1-Résultat de l'amplification du gène "nuc ":	119
6-2-Résultat de l'amplification du gène marqueur de la résistance à la méthicilline "le gène <i>mec A</i> ":	120
6-3-Résultat de l'amplification du gène marqueur de la résistance à la pénicilline "le gène <i>blaZ</i> ":	122
6-3-1-Chez les souches SARM :	122
6-3-2- Chez les souches SASM :	122

6-4-Résultat de l'amplification du gène "Tsst1" :	123
6-5-Résultat de l'amplification du gène "sea" :	124
6-6-Résultat de l'amplification du gène "luk-M" :	125
6-7-Résultat de l'amplification des gènes "icaA, icaD" :	125
6-7-1- le gène "icaA " :	125
6-7-2- le gène "icaD " :	126
7-Analyse statistique :	129
CONCLUSION	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134
ANNEXES	
ARTICLE SCIENTIFIQUE	

Liste des abréviations :

ADAM10: A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10.

ADN : acide désoxyribonucléique.

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS : anti-inflammatoires stéroïdiens.

ARN: acide ribonucléique.

ARNm: acide ribonucléique messenger.

ATCC: American Type Culture Collection.

C : Cytosine.

CCI : comptage Cellulaire Individuelle.

CCL:C–C motif chemokine ligand.

CCT : comptage cellulaire du tank.

Clf: clumping factor.

ClfA: clumping factor A.

ClfB: clumping factor B.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

D.O: densité optique.

EbpS: Elastin-binding Protein of *Staphylococcus aureus*.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

Fc: fragment cristallisable.

FnBP : fibronectin binding protein.

FnBPA: fibronectin binding protein A.

FnBPB: fibronectin binding protein B.

G : Guanine.

I: intermédiaire.

icaA: intercellular adhesin A.

icaD: intercellular adhesin D.

IFN γ : Interferon gamma.

IgG : immunoglobuline G.

IL : interleukine.

IM : intramusculaire.

IV : intraveineuse.

kDa : kilodalton.

LPS : lipopolysaccharide.

MLS : macrolides, lincosamides, streptogramines.

mM : millimolaire.

mS : millisiemens.

PBPs : Penicillin-binding proteins.

pH : potentiel hydrogène.

PLP : Protéines liant les Pénicillines.

PM : poids moléculaire.

PMN : polymorpho nucléaires.

PTSags:pyrogenic toxin superantigens.

R: résistante.

S: sensible.

SarA: Staphylococcal Accessory Regulator.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

SASM : *Staphylococcus aureus* sensible a la méthicilline.

SCCmec : staphylococcal cassette chromosome» mec.

SEA: Staphylococcal enterotoxinA.

TCT : taux cellulaire de tank.

THG: transfert horizontal de gènes.

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha.

TSA: tryptone soya agar.

TSST-1: Toxic Shock Syndrom Toxin-1.

UFC : unité formant colonie.

XIX^e : 19^{ème} siècle.

Liste des tableaux

	<u>Pages</u>
Tableau N°01 : Proportions des cellules de l'immunité au sein de la mamelle saine et infectée.....	10
Tableau N°02 : Grille d'évaluation du degré de déshydratation chez le bovin adulte.....	24
Tableau N°03 : Score clinique des mammites bovines avec signes généraux.....	25
Tableau N°04 : Échelle de sévérité individuelle de la mammite.....	26
Tableau N°05 : Critères, objectifs et seuils d'alerte du statut infectieux des vaches laitières.....	29
Tableau N°06 : Caractérisation épidémiologique du modèle contagieux.....	35
Tableau N°07 : Caractérisation épidémiologique des sous modèles à staphylocoques.....	36
Tableau N°08 : Facteurs de risque spécifiques du modèle contagieux et du modèle environnemental.....	38
Tableau N°09 : Traitement antibiotique des mammites cliniques sans signes généraux en première intention.....	48
Tableau N°10 : Mécanismes de résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques.....	77
Tableau N°11 : Table de lecture du test CMT.....	85
Tableau N°12 : Composition du mix pour la réalisation de PCR.....	95
Tableau N°13 : Séquence des amorces et taille de l'amplicon utilisé pour l'amplification du gène <i>nuc</i>	95
Tableau N°14 : Taille des amplicons, amorces et conditions d'amplification des gènes.....	96
Tableau N°15 : Résultats du California Mastitis Test.....	100
Tableau N°16 : Fiche de l'enquête épidémiologique.....	103
Tableau N°17 : Résultats de l'antibiogramme des souches SARM.....	108
Tableau N°18 : Résultats de l'antibiogramme des souches SASM.....	112
Tableau N°19 : Fréquence des gènes de résistance et de virulence chez les souches de <i>S.aureus</i> isolées des mammites bovines subcliniques.....	119
Tableau N°20 : Diamètre moyen des résistances pour toutes les souches	129

Liste des figures :

Pages

Figure N°01: Conformation intérieure des mamelles de la vache, coupe sagittale passant par les quartiers gauches.....	06
Figure N° 02: Acinus mammaire.....	06
Figure N°03: Innervation et irrigation artérielle et veineuse de la mamelle, coupe sagittale.....	07
Figure N° 04: Conformation et structure du trayon chez la vache.....	09
Figure N°05 : Courbes schématiques de l'incidence des mammites.....	13
Figure N° 06 : Le phénomène d'impact.....	15
Figure N° 07: Le phénomène de traite humide.....	16
Figure N°08 : Lésions du trayon de type vasculaire.....	21
Figure N°09: Lésions du trayon de type hyperkératosique (évolution lente, 20-60 jours).....	22
Figure N° 10: Grille de lecture du test CMT.....	32
Figure N°11 : Prélèvement aseptique d'un échantillon de lait en vue d'une analyse bactériologique.....	39
Figure N°12 : Aspect morphologique de <i>S.aureus</i> en microscopie optique (A) (X1000) et en microscopie électronique (B) (X15000).....	54
Figure N°13 : Facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	57
Figure N°14: Ultra structure de la paroi bactérienne de <i>S.aureus</i>	61
Figure N°15 : Exemples des mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	75
Figure N° 16: Etapes de la PCR.....	80
Figure N° 17 : Organigramme de la démarche adoptée dans la collecte des échantillons de lait de vaches atteintes de mammite subclinique.....	87
Figure N°18 : Organigramme de l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	91
Figure N° 19 : appareil de la PCR (le thermocycleur).....	95
Figure N° 20 : cuve d'électrophorèse (a droite) et appareil UV (a gauche) pour la visualisation et la prise des photos.....	98
Figure N° 21 : Résultat du test CMT.....	101
Figure N°22 : Aspect des colonies de <i>S.aureus</i> sur le milieu de Chapman.....	104
Figure N°23 : Aspect des colonies de <i>S.aureus</i> sur la gélose au sang frais de mouton.....	105
Figure N°24 : Résultat du test de la catalase.....	105
Figure N°25: Résultat du test de la coagulase libre.....	106
Figure N°26 : Résultat du test de la Dnase.....	106

Figure N°27: Taux d'implication des souches de <i>S.aureus</i> dans les mammites bovines subcliniques.....	107
Figure N°28 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SARM.....	111
Figure N° 29: Résultat de l'antibiogramme d'une souche SARM.....	111
Figure N°30 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SASM.....	115
Figure N°31 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SASM.....	116
Figure N°32 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SASM.....	116
Figure N°33: Résultat de l'antibiogramme d'une souche SASM.....	117
Figure N°34 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Staphylococcus aureus</i>	118
Figure N°35 : Gel représentatif de PCR du gène <i>nuc</i> (255 pb).....	120
Figure N°36 : Gel représentatif de PCR du gène <i>mecA</i> (310 pb).....	121
Figure N°37 : Gel représentatif de PCR du gène <i>blaZ</i> (772 pb).....	123
Figure N° 38: Gel représentatif de PCR du gène <i>sea</i> (560 pb).....	125
Figure N°39: Gel représentatif de PCR du gène <i>icaA</i> (1315 pb).....	127
Figure N°40 : Gel représentatif de PCR du gène <i>icaD</i> (381 pb).....	128

Résumé

La mammite bovine subclinique causée par *Staphylococcus aureus* reste une pathologie assez fréquente et assez redoutable affectant les vaches laitières. De ce fait, le contrôle de cette pathologie n'est pas seulement important pour la santé animale, mais aussi important pour la protection du consommateur.

Notre étude avait pour objectif de caractériser les souches de *Staphylococcus aureus* impliquées dans les mammites bovines phénotypiquement et génotypiquement. Un total de 302 prélèvements de lait de quartier réalisés sur 77 vaches en lactation a fait l'objet d'un CMT. 60 vaches laitières (77,92 %) ont réagi positivement au test CMT avec 129 quartiers positifs sur les 302 quartiers testés soit un taux de (42,71%). Sur les 129 échantillons de lait prélevés pour la bactériologie, 62 isolats purs qui se sont avérés caractéristiques de l'espèce *S.aureus* par les tests d'identification biochimiques ont été obtenus. Les isolats ont fait par la suite objet d'un antibiogramme.

L'antibiogramme a montré que cinq souches (8,06%) parmi les isolats testés sont des SARM. Ces SARM ont présenté une résistance croisée à toutes les bêtalactamines qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques. Les souches SASM ont montré de fortes résistances vis-à-vis de la pénicilline (94,73%) et des Tétracyclines (63,15%). Des résistances ont été également enregistrées vis-à-vis ; de l'association Amoxicilline + acide clavulanique (42,10%), L'Érythromycine (26,31%), la Clindamycine (14,03%), la Bacitracine (8,77%), l'association Triméthoprim + sulfaméthoxazole (5,26%) et la Ciprofloxacine (1,75%). Cependant, la néomycine et la gentamicine, ont été pondéralement actives sur les souches SASM.

La caractérisation moléculaire des isolats a montré que les gènes dominants sont : le gène *nuc*, le gène *icaA*, le gène *icaD*. Le gène codant l'enterotoxine A a été trouvé avec une faible fréquence.

Les gènes (*mecA* et *blaZ*) marquant la résistance à la méthicilline et à la pénicilline ont été amplifiés chez quelques isolats. Cependant, aucune des isolats n'héberge les gènes ; *Tsst1*, *luk-M*.

La prévalence élevée de mammites subcliniques et des souches multi résistantes de *S.aureus* témoigne de la nécessité d'une stratégie de lutte efficace basée essentiellement sur la détection précoce de mammites subcliniques, l'identification de l'agent causal et l'étude de sa sensibilité vis-à-vis des antibiotiques usuels.

La détection de gènes codants des facteurs de virulence dangereux pour le consommateur et/ou importants dans la pathogenèse de la mammite chez nos isolats témoigne de la nécessité de développer des approches thérapeutiques en fonction des caractéristiques des souches circulantes parmi les vaches atteintes de mammites subcliniques.

Mots clés : mammite subclinique, CMT, *S.aureus*, antibiogramme, SARM, SASM, gènes, *icaA*.

ملخص

يظل التهاب الضرع البقري تحت الإكلينيكي الناجم عن المكورات العنقودية الذهبية مرضًا شائعًا وخطيرًا يصيب الأبقار الحلوب. لذلك، فإن السيطرة على هذه الحالة المرضية ليست مهمة فقط لصحة الحيوان، ولكنها أيضًا مهمة لحماية المستهلك. هدفت دراستنا إلى توصيف سلالات المكورات العنقودية الذهبية المتورطة في التهاب الضرع البقري ظاهريًا وجينيًا. تم إخضاع ما مجموعه 302 عينة حليب ربع ضرع مأخوذة من 77 بقرة مرضعة لاختبار CMT. 60 بقرة حلوب (77.92%) أعطت نتيجة إيجابية لاختبار CMT مع 129 ربع ضرع إيجابيًا من أصل 302 ربعًا تم اختبارها، أي بمعدل (42.71%). من بين 129 عينة حليب تم جمعها لإجراء الاختبار البكتريولوجي، تم الحصول على 62 عذلة نقية والتي وجدت أنها مميزة لنوع *S. aureus*. باختبارات التعريف البيوكيميائية. تم إخضاع العزلات بعد ذلك لاختبار الحساسية اتجاه المضادات الحيوية. أظهر اختبار الحساسية اتجاه المضادات الحيوية أن خمس سلالات (8.06%) من بين العزلات المختبرة كانت مقاومة للمثيسيلين. أظهرت هاته السلالات مقاومة متصالبة لجميع البيتا لاكتامينات والتي امتدت إلى عائلات المضادات الحيوية الأخرى، كما أظهرت السلالات الحساسة للمثيسيلين مقاومة قوية للبنسلين (94.73%) والتتراسيكلين (63.15%). إضافة إلى ذلك تم تسجيل المقاومة اتجاه كل من مزيج: أموكسيسيلين + حمض كلافولانيك (42.10%)، إريثروميسين (26.31%)، كلينداميسين (14.03%)، باسيتراسين (8.77%)، مزيج تريميثوبريم + سلفاميثوكسازول (5.26%) وسبيروفلوكساسين (1.75%). ومع ذلك، فقد كان كل من المضادين الحيويين: نيوميسين وجنتاميسين فعالا بشكل كبير على سلالات SASM.

أظهر التوصيف الجزيئي للعزلات أن الجينات السائدة هي: جين *nuc*، جين *icaA*، جين *icaD*. تم العثور على الجين المشفر للسم المعوي أ (*sea*) بتردد منخفض. كما تم تضخيم الجينات (*mecA*) و (*blaZ*) التي تميز المقاومة للمثيسيلين والبنسلين في بعض العزلات. ومع ذلك، لا تحتوي أي من العزلات على الجينات: *Luk-M*، *Tsst1*. يشهد الانتشار المرتفع لالتهاب الضرع تحت الإكلينيكي وسلالات *S. aureus* متعددة المقاومة على الحاجة إلى إستراتيجية تحكم فعالة تعتمد أساسًا على الكشف المبكر عن التهاب الضرع تحت الإكلينيكي، تحديد العامل المسبب ودراسة حساسيته اتجاه المضادات الحيوية الشائعة.

يشهد الكشف عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة التي تشكل خطورة على المستهلك و / أو مهمة في التسبب في التهاب الضرع في عزلاتنا على الحاجة إلى تطوير مناهج علاجية اعتمادًا على خصائص السلالات المنتشرة بين الأبقار المصابة بالتهاب الضرع تحت الإكلينيكي.

الكلمات المفتاحية: التهاب الضرع تحت الإكلينيكي، *S. aureus*، CMT، اختبار الحساسية للمضادات الحيوية، مقاومة للمثيسيلين، سلالات حساسة للمثيسيلين، جينات *icaA*.

Abstract

Subclinical bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* remains a fairly common and fairly serious pathology affecting dairy cows. Therefore, controlling this pathology is not only important for animal health, but also important for consumer protection.

Our study aimed to characterize *Staphylococcus aureus* strains involved in bovine mastitis phenotypically and genotypically.

A total of 302 quarter milk samples taken from 77 lactating cows were subjected to a CMT. 60 dairy cows (77.92%) reacted positively to the CMT test with 129 positive quarters out of the 302 quarters tested, ie a rate of (42.71%). Of 129 milk samples collected for bacteriology, 62 pure isolates which were found to be characteristic of *S. aureus* species by biochemical identification tests were obtained. The isolates were subsequently subjected to an antibiogram.

The antibiogram showed that five strains (8.06%) among the isolates tested were MRSA. These MRSA exhibited cross-resistance to all betalactamins which extends to other families of antibiotics. MSSA strains have showed strong resistance to Penicillin (94.73%) and Tetracyclines (63.15%). Resistance was also recorded vis-à-vis; of the combination Amoxicillin + clavulanic acid (42.10%), Erythromycin (26.31%), Clindamycin (14.03%), Bacitracin (8.77%), the combination Trimethoprim + sulfamethoxazole (5.26%) and Ciprofloxacin (1.75%). However, Neomycin and Gentamicin were weighty active on MSSA strains.

The molecular characterization of the isolates showed that the dominant genes are: the *nuc* gene, the *icaA* gene, the *icaD* gene. The gene encoding enterotoxin A has been found with low frequency. The genes (*mecA* and *blaZ*) marking resistance to methicillin and penicillin were amplified in some isolates. However, none of the isolates harbor the genes; *Tsst1*, *luk-M*.

The high prevalence of subclinical mastitis and *S. aureus* strains multi-resistant testifies to the need for an effective control strategy based essentially on the early detection of subclinical mastitis, the identification of the causative agent and the study of its sensitivity to common antibiotics.

The detection of genes encoding virulence factors that are dangerous for the consumer and / or important in the pathogenesis of mastitis in our isolates demonstrates the need to develop therapeutic approaches depending on the characteristics of the strains circulating among cows suffering from subclinical mastitis.

Keywords: subclinical mastitis, CMT, *S. aureus*, antibiogram, MRSA, MSSA, genes, *icaA*.

Introduction

L'Algérie, troisième importateur mondial après l'Italie et le Mexique, a une consommation moyenne de lait de 130 L/habitant/an, dont le montant s'élève à 600 millions de dollars pour importer la moitié de ses besoins, soit 5 milliards de litres (**Amellal, 1995**). En **2009**, notre pays a importé de la poudre de lait pour un montant de 350 millions de dollars (**Boufaïda Asnoune et al., 2012**). Afin de réduire les coûts d'importation, les pouvoirs publics ont opté pour l'importation massive de vaches laitières (**Boufaïda Asnoune et al., 2012**). La production a certes augmenté mais, elle reste en deca des prévisions ; En raison des problèmes de gestion et des pathologies. La rentabilité d'un élevage dépend de la maîtrise de l'alimentation et du contrôle de certaines pathologies comme les infections mammaires (**Gambo et Agnem Etchike, 2001**).

Les mammites restent la maladie la plus fréquente, la plus pénalisante et la plus coûteuse des élevages laitiers (**Remy, 2010**).

L'inflammation mammaire chez la vache continue à être 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 (**Dumas et al., 2004**). C'est aussi le premier poste 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 ; Sérieys, 2004**).

En Algérie, comme dans la plupart des pays, les mammites bovines constituent une entité pathologique préoccupante puisqu'elles concernent 50 % environ des femelles laitières (**Bouزيد et al., 2011**).

Une mammite n'est autre qu'une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle, provoquée généralement par une infection bactérienne. Cette infection mammaire peut prendre diverses formes suivant qu'elle soit associée ou non à des signes cliniques ; On différencie communément entre les mammites cliniques associées à des symptômes inflammatoires et les infections subcliniques (**Gedilaghine, 2005**). Ces dernières sont beaucoup plus fréquentes que les infections mammaires cliniques, plus insidieuses, car difficilement détectables (**Debreil, 2008**). Les infections subcliniques sont responsables d'environ 80 % de l'ensemble des pertes économiques associées aux mammites (**Seegers et al., 2003 ; Shim et al., 2004 ; Petrovski et al., 2006**).

Le caractère clinique ou non d'une mammite est majoritairement influencé par le genre et l'espèce de la bactérie pathogène (**Rainard et Riollot, 2006**). *Staphylococcus aureus*, est l'un des pathogènes contagieux les plus importants chez les bovins. En raison de son

potentiel zoonotique, le contrôle de ce germe est non seulement d'une grande importance économique dans l'industrie laitière, mais aussi un problème de santé publique et de sécurité sanitaire important.

C'est un germe résistant à de nombreux antibiotiques. Les rechutes sont donc fréquentes surtout si les mesures d'hygiène ne sont pas appliquées.

Staphylococcus aureus, bien que pouvant induire des mammites cliniques, cause le plus fréquemment des mammites subcliniques (**Sutra et Poutrel, 1994 ; Sears et Mccarthy, 2003**). Ces mammites subcliniques à *S. aureus* ont, de plus, tendance à devenir chroniques et à persister durant de longues périodes de temps (**Sears et Mccarthy, 2003**). Chez les vaches laitières, les mammites à *S. aureus* s'expriment, le plus souvent, par une élévation du taux de cellules somatiques dans le lait, principalement liée à un afflux des neutrophiles (**Van Oostveldt et al., 2001**).

Le diagnostic étiologique des infections mammaires présente un intérêt clinique dans de nombreuses situations. Plusieurs solutions opérationnelles existent mais l'analyse bactériologique, reste l'examen le plus pertinent, à la fois sensible et spécifique.

En raison du caractère peu spécifique des signes cliniques et de la diversité des agents étiologiques responsables de mammites, l'isolement des bactéries lors d'infections qu'elles soient d'évolution aiguë ou chronique, souvent subcliniques, permet de guider la conduite thérapeutique (**Berthelot et Bergonier, 2001**). En effet, la caractérisation de la bactérie impliquée en association avec l'antibiogramme qui évalue sa résistance vis-à-vis des antibiotiques usuels, permet d'envisager un traitement plus efficace des mammites et par conséquent de mieux adapter une stratégie de contrôle et de lutte contre cette pathologie.

C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail qui a pour objectif :

- D'isoler des souches de *Staphylococcus aureus* à partir d'échantillons de lait prélevés de vaches atteintes de mammites.
- De caractériser les isolats de *Staphylococcus aureus* phénotypiquement par la mise en évidence des caractères culturels, par une identification biochimique et par l'étude de leur antibiorésistance.
- De caractériser les isolats de *Staphylococcus aureus* génotypiquement en ciblant ; quelques gènes codant des facteurs de virulence, les gènes marqueurs de la résistance à la méthicilline et à la pénicilline.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre 1

Les mammites bovines

1.1. Généralités sur les mammites.

1.1.1. Définitions :

1.1.1.1. Mammite :

La mammite bovine est une inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle de la vache. Elle est généralement septique et provoquée, la plupart du temps, par une infection bactérienne. Des mammites aseptiques existent cependant, elles sont rares et provoquées par des traumatismes locaux, des toxiques ou des désordres physiologiques (**Rémy, 2010**). Dans le langage courant, le terme « mammite » désigne donc les infections intra-mammaires bactériennes mais d'autres agents pathogènes peuvent occasionner des infections de la mamelle comme des levures ou des algues. On distingue classiquement les mammites sans signes cliniques associées appelées « mammites subcliniques » et les mammites avec signes cliniques associées qualifiées de « mammites cliniques » (**Angoujard, 2015**).

1.1.1.2. Mammite clinique :

La définition d'une mammite clinique est la présence de symptômes fonctionnels, c'est-à-dire une modification de la sécrétion de la glande. La quantité et l'aspect du lait changent, reflétant une perturbation des fonctions de sécrétion et filtration. En plus de ces symptômes fonctionnels, on peut observer des symptômes locaux classiques de l'inflammation : rougeur, tuméfaction, chaleur et douleur de la mamelle ou du quartier atteint. On parle alors de mammite aiguë. Lors de mammite chronique, le quartier s'atrophie et se sclérose. Enfin parfois on observe des symptômes généraux liés à une intoxication. Ils se traduisent par une altération de l'état général (abattement, anorexie, hyperthermie, arumination, déshydratation, troubles locomoteurs...). On parle alors de mammite suraiguë (**Noireterre, 2006**).

La gravité de la maladie et des symptômes présents dépendra de plusieurs facteurs, tels que, l'état nutritionnel et le statut immunitaire de la vache, l'agent pathogène responsable de l'inflammation, et un certain nombre de facteurs environnementaux, tels que la propreté, l'humidité et la température ambiante (**Anonyme 1, 2016**). Les mammites cliniques interviennent de manière plus ou moins importante selon le stade de la lactation. Elles sont plus fréquentes en péri-partum et lors du tarissement (42% des nouvelles infections apparaissent pendant la période sèche) (**Baillet, 2009**). Le taux de mammite clinique est généralement plus élevé dans les fermes à stabulation entravée comparativement aux fermes à stabulation libre (**RCRMB, 2009**). Selon **Le Roux en 1999**, Une vache sur quatre est

atteinte de mammite subclinique à tout moment, et une vache sur cinq est atteinte de mammite clinique dans l'année.

1.1.1.3. Mammite subclinique :

Elle est par définition asymptomatique : la sécrétion paraît macroscopiquement normale même en début de traite, les signes locaux et généraux sont absents. Seul l'examen du lait au laboratoire permet de mettre en évidence des modifications chimiques (baisse du taux de caséines et de lactose, augmentation du taux de chlorures), bactériologiques (présence de germes) et surtout cellulaire du lait, en l'occurrence augmentation des cellules somatiques du lait (surtout les polynucléaires neutrophiles) (Noireterre, 2006).

Les germes responsables sont essentiellement Gram positifs, mais on peut aussi rencontrer des mammites subcliniques à entérobactéries. Elles peuvent résulter d'une infection primaire ou être secondaires à une mammite aiguë non totalement guérie bactériologiquement. Elles sont beaucoup plus fréquentes que les infections cliniques, plus insidieuses car difficilement détectables (Debreil, 2008) et responsables de pertes économiques importantes par une baisse de la production laitière et une augmentation des comptages cellulaires du troupeau (Noireterre, 2006).

Si l'infection persiste pendant au moins 2 mois, elle devient chronique (Erskine, 2014). Une fois établi, un grand nombre de ces infections persistent pendant des lactations entières ou de la durée de vie de la vache (Erskine, 2014), et aboutir à une fibrose plus ou moins importante des quartiers atteints. Pour chaque cas de mammite clinique, nous comptons en moyenne 20 à 40 cas de mammites subcliniques (Hanzen, 2009 b).

1.1.2. Anatomie de la mamelle :

1.1.2.1. Mamelle :

La glande mammaire (ou pis) de la vache est lourde et volumineuse. Son poids peut chez la vache adulte être supérieur à 50 kg (Gandon, 2010).

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° 1) : les lames latérales qui s'insinuent sur la tunique abdominale (elles assurent une stabilité transversale) et les lames médiales qui s'adossent 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 500mL de lait. Chaque lobe est composé de très nombreux acini mammaires (**Figure N° 2**), qui synthétisent le lait (**Degueurce, 2004 ; Crevier-Denoix, 2010**). Organisées en grappes, elles sont entourées d'un tissu conjonctif et adipeux très vascularisé appelé stroma. Ils s'ouvrent sur des arborisations canaliculaires : les canaux galactophores qui drainent le lait de son lieu de sécrétion vers la citerne du pis et le trayon. L'alvéole est entouré extérieurement par une trame de cellules myo-épithéliales et intérieurement par une couche de cellules cuboïdales : les lactocytes. Ceux-ci sont fixés sur une membrane basale au travers de laquelle s'effectuent les échanges nutritifs et hormonaux, chaque alvéole étant entourée d'un système artério-veineux (un litre de lait suppose le passage de 500 litres de sang). Chaque lactocyte synthétise journallement son équivalent en poids de protéines, lactose minéraux et lipides (**Hanzen, 2009 a**).

La mamelle est irriguée par une artère de chaque côté : l'artère honteuse externe (**Figure N° 3**). 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 anastomosés. Ces nombreux collecteurs veineux permettent d'avoir toujours une bonne irrigation en cas d'écrasement d'une des veines quand la vache est couchée. 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.

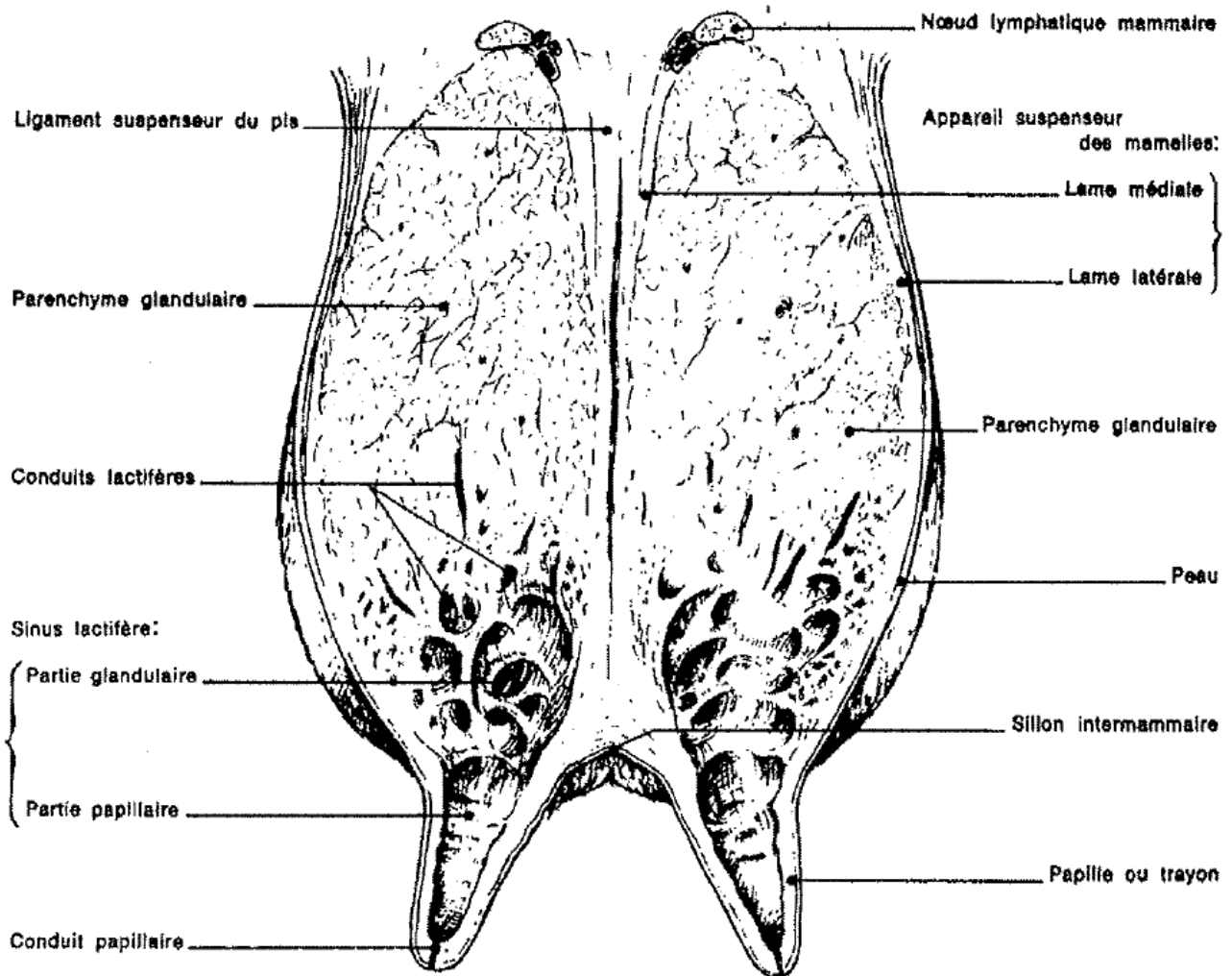


Figure N°01: Conformation intérieure des mamelles de la vache, coupe sagittale passant par les quartiers gauches (Barone, 1968)

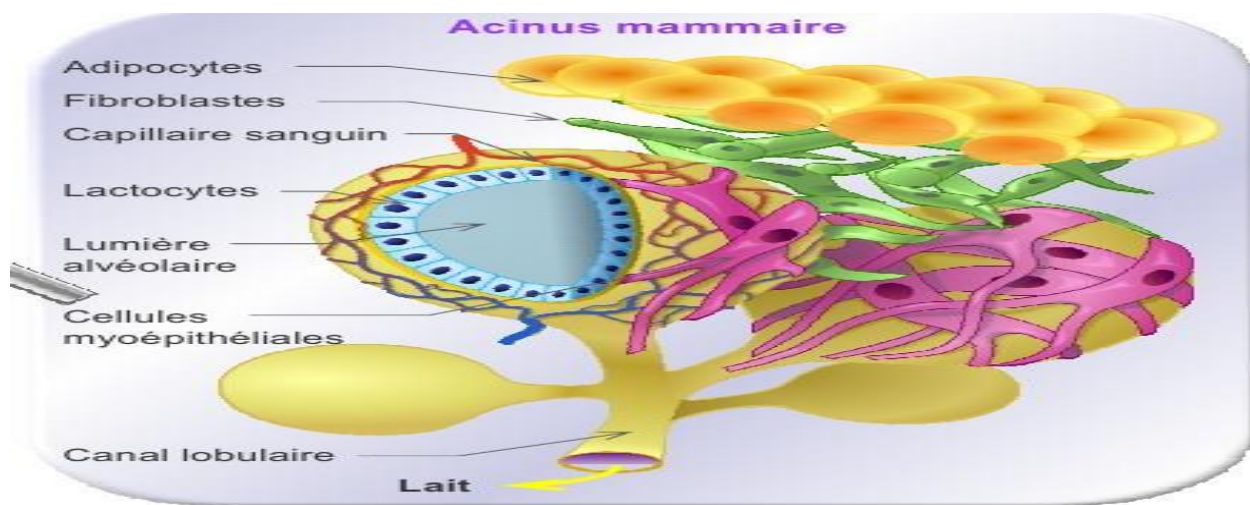


Figure N°02: Acinus mammaire (Constant ,2014)

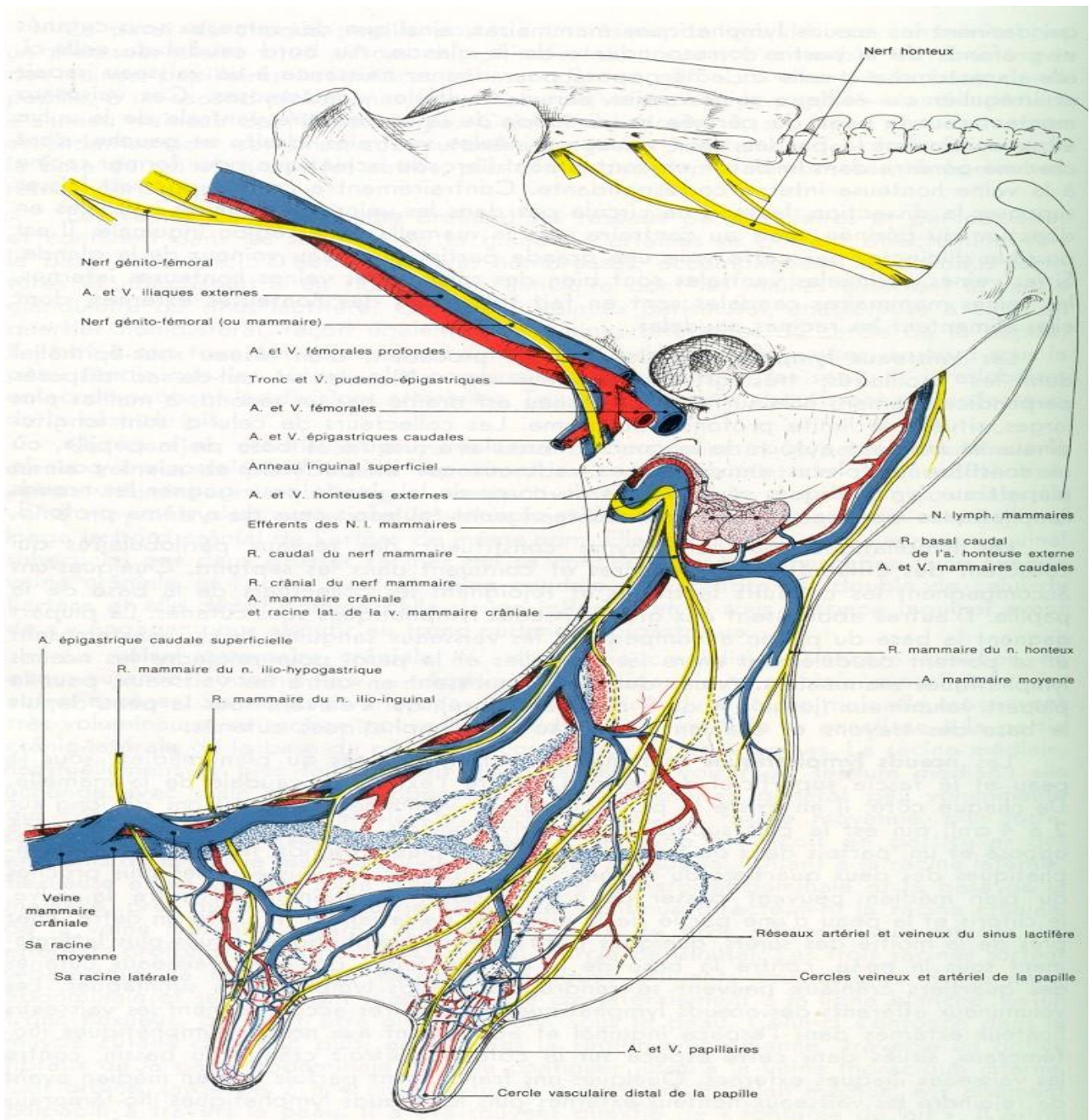


Figure N°03: Innervation et irrigation artérielle et veineuse de la mamelle, coupe sagittale (A : artère, V : veine, R : rameau, N : nœud) (Barone, 1968).

1.1.2.2. Trayon:

Le trayon a une longueur comprise entre 3 et 14 cm et son diamètre varie entre 2 et 4 cm. La longueur du trayon augmente de la 1^{ère} à la 3^{ème} lactation puis demeure constante. Sa forme est conique ou plus normalement cylindrique. Cette conformation peut cependant être différente selon les individus et les races (**Hanzen, 2009 a**).

La citerne du pis est séparé du sinus du trayon par un repli annulaire renfermant un tissu érectile veineux (plexus veineux proximal ou anneau veineux de Furstemberg). Ce dernier peut surtout en fin de traite constituer un obstacle au passage du lait. La paroi du trayon est épaisse et renferme de nombreux vaisseaux et terminaisons nerveuses sensibles ou corpuscules. Elle est dépourvue de glandes sudoripares. Ce fait particulier laisse supposer l'importance du recours éventuel au trempage au moyen de crèmes émoullientes. Le trayon subit en cours de traite et au cours des 20 à 30 minutes suivantes des changements importants de longueur mais surtout de diamètre de son canal. A l'extrémité inférieure du trayon se trouve le canal du trayon. Sa longueur est comprise entre 5 à 13 mm (9 mm en moyenne) (**figure N° 04**) (**Hanzen, 2009 a**).

Ouvert, son diamètre est de 1 à 2 mm. le diamètre du canal du trayon est plus grand dans sa partie proximale (0.8 mm) que dans sa partie distale (0.4 mm). Il constitue de ce fait un élément de résistance important. Les fibres musculaires lisses associées aux fibres élastiques et à celles de collagène se condensent à l'apex du trayon en un sphincter assurant normalement l'occlusion du canal. Ce sphincter est entouré du plexus veineux distal. La muqueuse du canal est tapissée d'un épiderme kératinisé semblable à celui de la peau. Cette muqueuse s'épanouit dans le sinus en 5 à 6 replis qui forment une collerette qui constitue une sorte d'anneau tissulaire renfermant des lymphocytes : la Rosette de Furstenberg. Celle-ci est impliquée dans les premières étapes de la réponse immunitaire (reconnaissance des germes).

La kératine qui tapisse la muqueuse du canal du trayon exerce une activité bactéricide via différentes substances aux quelles elle sert de support de fixation (acide laurique, acide oléique, défensines, xanthineoxydase). Elle se renouvelle en permanence, un tiers environ étant éliminé par les deux traites journalières. Elle permet également de « piéger » les bactéries. Ceci explique pourquoi les premiers jets de lait sont plus contaminés (**Hanzen, 2009 a**).

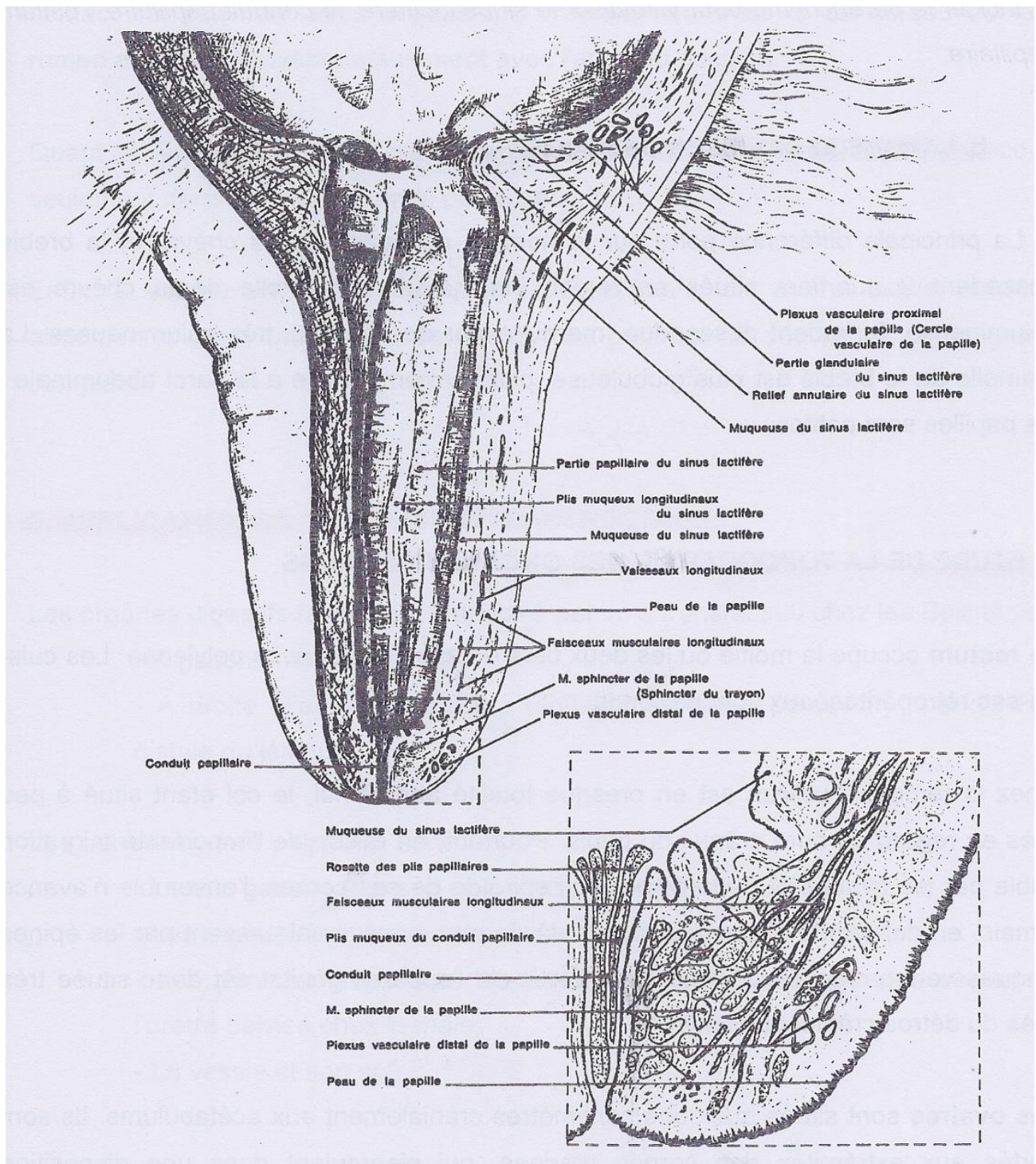


Figure N°04: Conformation et structure du trayon chez la vache (Barone, 1968)

1.1.3. Les défenses de la mamelle :

1.1.3.1. 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, 2007 ; Smith, 2008**)

1.1.3.2. 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°01 (**Meunier, 1999 ; Smith, 2008**).

Tableau N°01 : Proportions des cellules de l'immunité au sein de la mamelle saine et infectée (**Meunier, 1999 ; Smith, 2008**)

	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 antigènes 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 (**Meunier, 1999 ; Smith, 2008**).

Le recrutement des neutrophiles repose sur la libération de substances chimiotactiques, dont les deux plus importantes sont l'interleukine 8, et le facteur 5a du complément, sécrétés par les macrophages et les cellules épithéliales. Les polynucléaires migrent ainsi par diapédèse depuis le sang selon le gradient chimiotactique. La vitesse à laquelle se déroule cette phase conditionne la sévérité et l'évolution de l'infection (**Meunier, 1999 ; Smith, 2008**).

Les neutrophiles sont activés par la diapédèse et les substances chimiotactiques, ce qui se traduit par l'expression à leur surface de récepteurs membranaires facilitant la phagocytose, tel que CD14, qui en présence de LPS binding protein permet la phagocytose des gram négatifs. Mais le plus important de ces récepteurs est celui qui se lie à l'extrémité Fc des immunoglobulines, permettant la phagocytose des germes qui sont opsonisés. Il faut noter que les neutrophiles sont moins efficaces dans le lait que dans le sang. En effet la présence de globules gras gêne la formation des pseudopodes lors de la phagocytose, ainsi que la lyse intra-cellulaire du germe. Les molécules responsables de la lyse des germes sont, entre autres, des radicaux libres (anion super oxyde), la myéloperoxydase, des bactéricines, des défensines et l'hypochlorite... ces molécules possèdent un large spectre antibactérien et antifongique. 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**). Il semble que les cellules épithéliales interviennent aussi dans les mécanismes de défense en produisant des molécules chimiotactiques, suite à la reconnaissance du LPS des gram négatifs, et de l'acide lipoteichoïque des bactéries gram positif, ainsi que des molécules antimicrobiennes comme les β -défensines (**Meunier, 1999 ; Smith, 2008**).

1.1.3.3. 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 relient 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, 2007 ; 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 sero-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 **(Meunier, 1999)**. 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 **(Meunier, 1999)**), 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.

➤ **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°05)**.

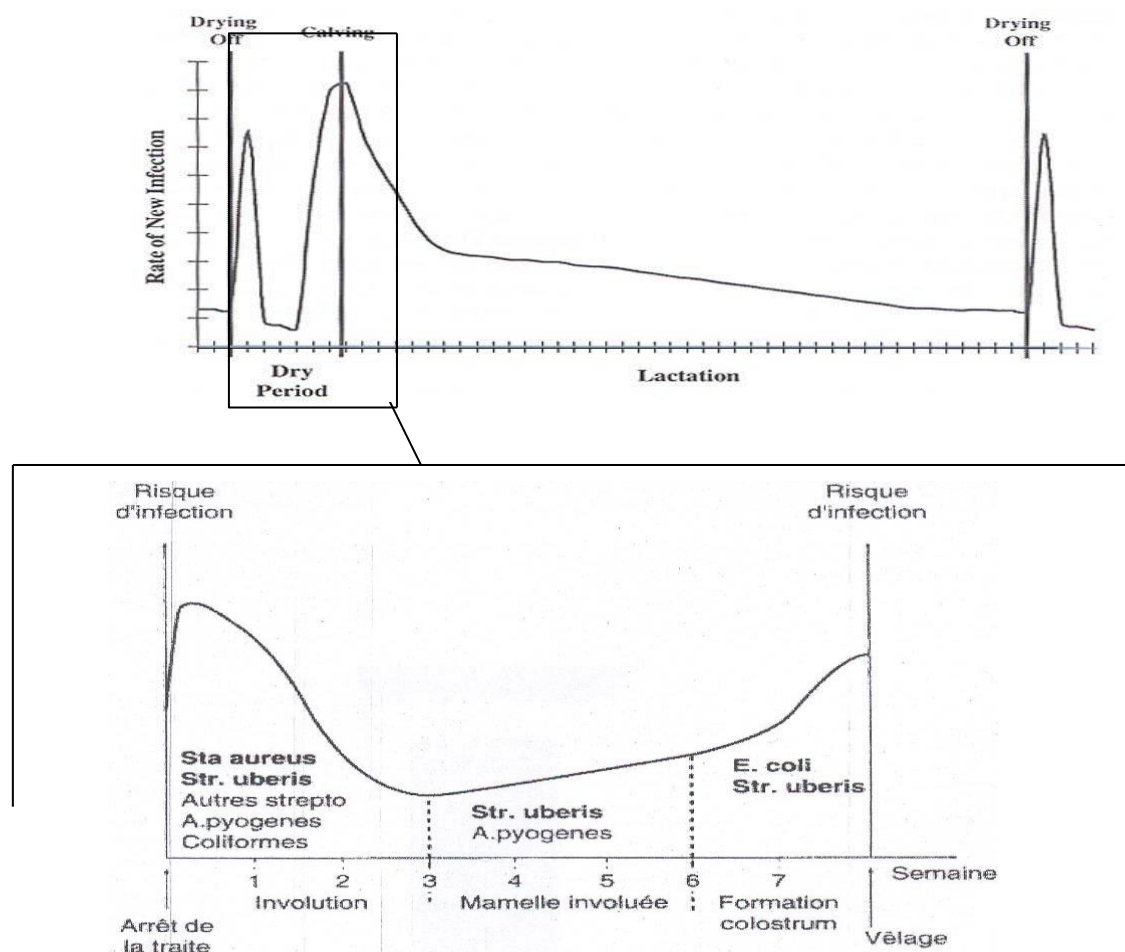


Figure N°05 : Courbes schématiques de l'incidence des mammites (Bradley *et al.*, 2004 ; Serieys *et al.*, 1997)

Ainsi, même pendant le tarissement, on observe des variations de la sensibilité de la mamelle aux infections. Ces observations sont dues à des modifications de l'importance relative des défenses de la mamelle (Meunier, 1999).

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 (**Meunier, 1999**).

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).

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 (**Meunier, 1999**).

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 colostogénèse, 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 (**Meunier, 1999**).

1.2. Pathogénie des infections mammaires :

1.2.1. 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 (**Debreil, 2008**). 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. La pénétration des bactéries se produit suivant trois possibilités :

➤ **Au cours de la traite :**

-Par le phénomène d'impact:

Une entrée d'air 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 (Debreil ,2008).

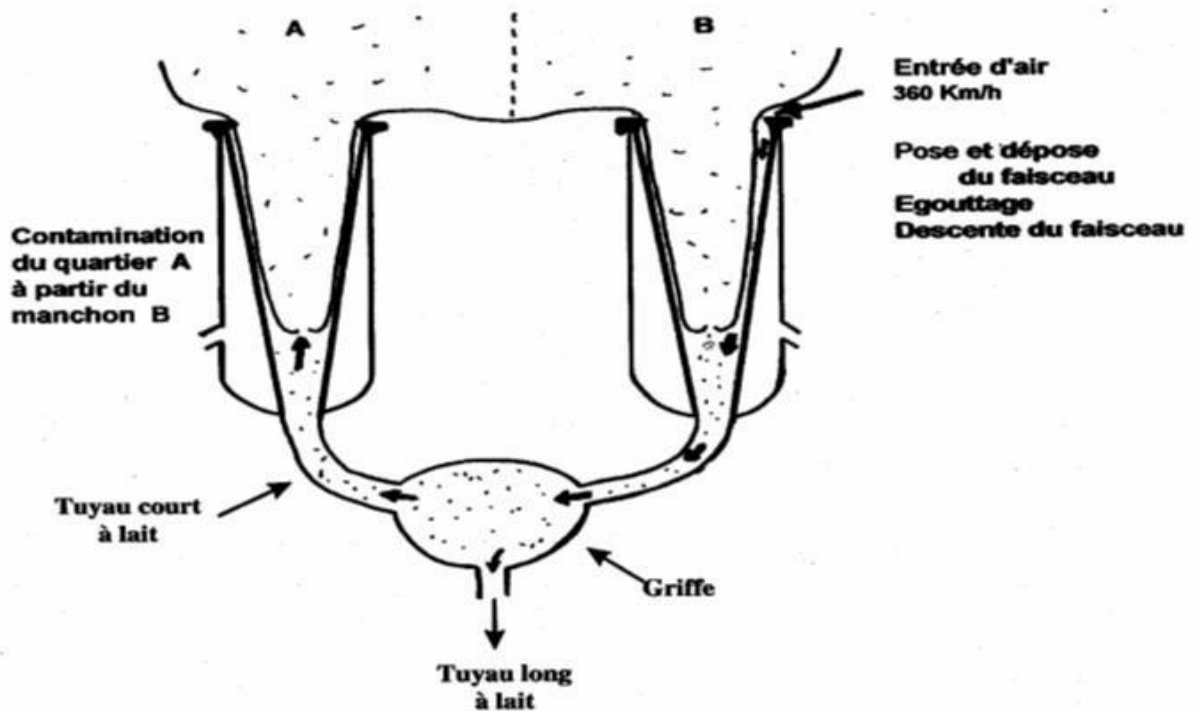


Figure N° 06 : Le phénomène d'impact (Hanzen, 2009 a).

-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 (Labbé, 2007).

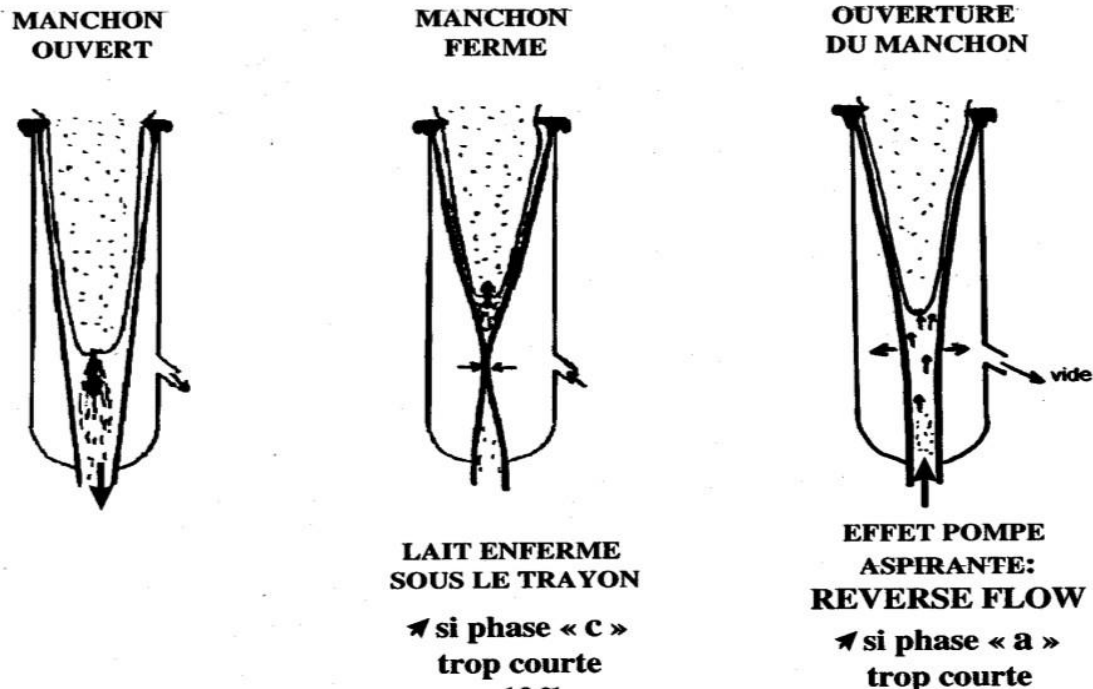
LORS DE MAUVAISE EVACUATION DU LAIT

Figure N° 07: Le phénomène de traite humide (Hanzen, 2009 a).

-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 (verruge, 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).

-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 intramammaire ou de sondage du canal du trayon de manière non adéquate (défaut d'hygiène) (Debreil, 2008).

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

1.2.2. 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 galactaphores. Les bactéries qui ont la capacité d'adhérer à la surface des épithéliums, ne seront pas chassés 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 (**Taponen et al., 2006**). 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 de caillots de fibrine et des grumeaux dans le lait de mammite. La mamelle possède entre autre, une auto-défense par la sécrétion de lactoferrines, le lysozyme, et le système lacto-péroxydase-thiocyanate-péroxydase dans le lait, qui limite la fixation des agents pathogènes sur les cellules épithéliales et leur multiplication (**Debreil, 2008**).

1.2.3. 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 intra-cellulaire est associée à des infections de type chroniques et récurrentes (**Bosquet et al., 2005**). 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).

Lafont et al., 2002, Middleton et al., 2009 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 connus pour résister à la bactéricidie des lysosomes, des macrophages et des polynucléaires et peuvent même s'y multiplier. L'action des adhésines, exotoxines, invasines des bactéries associées au passage massif des polynucléaires, provoque la désorganisation des liaisons inter-cellulaires 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 (**Bosquet et al., 2005**).

Un tissu fibreux réactionnel et cicatriciel se met en place pour circonscrire le foyer infectieux. Le tissu croît avec l'ancienneté de l'infection, formant des nodules durs dans le quartier, qui sont palpables. La pénétration intra-cellulaire 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**).

1.3. Étiologie :

1.3.1. *Staphylococcus aureus*:

Staphylococcus aureus est un coque Gram +, hémolytique, aéro-anaérobie facultatif. C'est une bactérie résistante dans le milieu extérieur.

Staphylococcus aureus est présent naturellement sur l'ensemble de la peau, des trayons et des muqueuses des bovins. Des lésions de la peau favorisent sa multiplication.

Son réservoir principal est la mamelle infectée des vaches laitières en production. La contamination se fait lors de la traite par la machine à traire, les mains du trayeur ou son matériel. Lors de la traite, une excrétion de 10 000 UFC/mL est usuelle mais cette excrétion peut aller jusqu'à 10^8 UFC/ml (**Asperger et Zangerl, 2011**). Après pénétration dans le canal du trayon, *Staphylococcus aureus* envahit les canaux galactophores. Il colonise les cellules épithéliales dès 24h après la pénétration dans le canal du trayon. Sa multiplication est plutôt lente dans l'épithélium, le pic étant atteint entre 2 et 11 jours suivant l'animal (**Durel et al., 2004**), puis assez rapide dans le parenchyme mammaire. La détection dans le parenchyme mammaire peut se faire dès 4 jours post-inoculation (**Salat et al., 2007**). L'inflammation provoquée par la multiplication bactérienne dans le parenchyme mammaire entraîne une

hyperplasie du tissu inter-alvéolaire en vue de circonscrire l'infection, ce qui forme des nodules de consistance ferme pouvant être détectés à la palpation de la mamelle. Les infections intra-mammaires à *S. aureus* provoquent fréquemment la formation de ces microabcès.

Staphylococcus aureus peut également pénétrer dans les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les cellules épithéliales, et s'y multiplier. Devenu intracellulaire, il n'est plus en contact avec les éventuels antibiotiques extracellulaires circulant dans le sang.

Staphylococcus aureus possède de nombreux facteurs de virulence lui permettant une meilleure adhésion aux épithéliums (adhésines), une invasion facilitée des cellules, etc. mais lui confère aussi une résistance aux attaques du système immunitaire avec, par exemple, la leucocidine qui détruit la membrane des leucocytes ou avec la protéine A qui bloque la phagocytose (Eicher *et al.*, 2002). *S. aureus* a également la capacité de constituer des biofilms.

L'excrétion dans le lait de *Staphylococcus aureus* est intermittente avec de grandes fluctuations et souvent en faible quantité. L'excrétion dans le lait varie de zéro à 10^4 cell/mL généralement, et peut aller jusqu'à 10^8 cell/L (Asperger et Zangerl, 2011). Ainsi un résultat bactériologique négatif sur un quartier ne signifie pas nécessairement que la bactérie est absente. En effet, seul un tiers des quartiers infectés par *Staphylococcus aureus* est positif en bactériologie (Blowey et Edmondson, 2010).

Lors de la traite, une vache à mammite staphylococcique contamine le trayon des six à huit vaches suivantes (Blowey et Edmondson, 2010).

Staphylococcus aureus est à l'origine d'infections persistantes présentant surtout une forme subclinique, mais pouvant parfois également s'exprimer par de courts épisodes cliniques. Dans certaines circonstances, *Staphylococcus aureus* provoque des mammites aiguës gangreneuses. Cette forme très grave est provoquée par une baisse d'immunité sévère de la mamelle et ne dépend pas de la souche bactérienne.

Staphylococcus aureus est une bactérie contagieuse entre bovins. Généralement, seules quelques souches sont présentes dans un élevage (mode mono-clonal). La plupart du temps, une à deux souches seulement sont responsables de plus de 80 % des infections sévissant dans un élevage donné. Enfin plus rarement une origine environnementale est suspectée lors de l'identification d'une grande variété de souches (Salat, 2008).

Certaines souches produisent des β -lactamases les rendant résistantes à certains

membres de la famille antibiotique des β -lactamines.

1.4. Diagnostic :

1.4.1. Diagnostic clinique :

Le diagnostic clinique des mammites est certes important au niveau individuel, mais encore plus au niveau du troupeau afin d'établir le modèle épidémiologique de mammites de l'élevage. L'examen de la mamelle et du lait doit permettre un dépistage simple et efficace des mammites cliniques. Une détection précoce améliore les chances de guérison par la mise en place d'un traitement précoce adapté. Elle passe par la détection des symptômes fonctionnels, avant l'apparition de symptômes locaux (**Angoujard, 2015**).

Les mammites subcliniques ne peuvent pas être détectées par la clinique puisqu'elles n'entraînent des modifications ni du lait ni de la mamelle et que les animaux atteints ne présentent pas de signes généraux associés (**Angoujard, 2015**).

1.4.1.1. Examen clinique de la mamelle :

Cet examen de la mamelle peut se faire lors de la traite quotidiennement ou mieux à chaque traite mais également dans d'autres occasions (au tarissement, après le vêlage, etc.). C'est évidemment moins simple à préconiser dans les élevages disposant de robots de traite. Il s'agit d'évaluer la mamelle et ses annexes (nœuds lymphatiques rétromammaires, vaisseaux). D'abord, la mamelle est observée à distance pour vérifier sa conformation. En cas de mamelle mal conformée, de décrochage ou de mamelle trop volumineuse, les trayons sont moins protégés par les membres et sont plus exposés à l'environnement, ce qui accroît le risque de mammite (**Durel et al., 2011**). Il faut observer les différents quartiers les uns par rapport aux autres afin de déceler une anomalie de symétrie (atrophie, hypertrophie), de volume, de couleur (congestion, un hématome) ou des excroissances cutanées (verrues).

L'examen des trayons permet de voir les éventuels effets délétères induits par la méthode de traite ou la machine à traire. Le type de lésion renseigne sur la durée de la contrainte. En effet, des lésions de type vasculaire (**Figure N° 08**) : pétéchies, rougeurs, œdème de l'extrémité, gerçures, etc., indiquent un dommage récent et sont rapidement réversibles. A l'inverse, des lésions de type hyperkératosique (**Figure N°09**) signalent une évolution lente sur 20 à 60 jours (**Durel et al., 2011**). L'hyperkératose correspond à une prolifération de la peau formant le plus souvent un anneau blanc centré sur l'orifice du traxon. C'est une réaction physiologique de la peau en réponse à une agression (une traite avec une machine à traire mal réglée) qui enlève une partie de la couche kératinisée de la peau de

l'intérieur du canal du trayon.

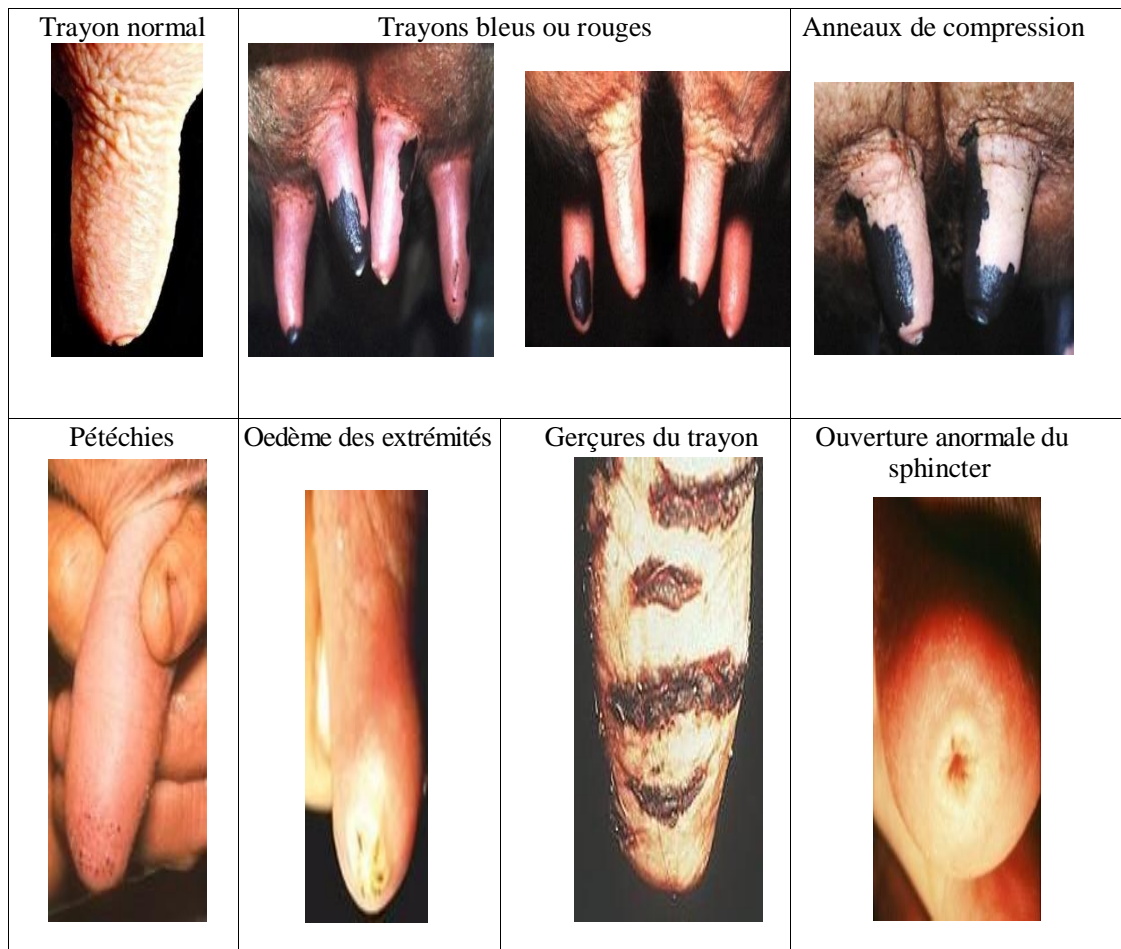


Figure N°08 : Lésions du trayon de type vasculaire (Durel *et al.*, 2011).



Figure N°09: Lésions du trayon de type hyperkératosique (évolution lente, 20-60 jours) (Durel *et al.*, 2011).

Après un examen visuel approfondi, vient la palpation intégrale de la mamelle puis la palpation individuelle de chaque quartier. Le but est d'identifier une zone de chaleur signalant une inflammation, un œdème, une induration marquant une fibrose du parenchyme mammaire, la présence de nodules, une douleur, etc. Les nœuds lymphatiques rétromammaires doivent aussi être palpés, leur augmentation de taille révèle une adénite et donc une atteinte de la mamelle du côté concerné par cette adénite (**Angoujard, 2015**).

1.4.1.2. 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 rosé 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 gangreneuses). 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**). L'apparition des symptômes peut être différée par rapport au début de l'infection. Ainsi l'utilisation systématique d'un bol à fond noir et la palpation de l'ensemble de la mamelle à la traite sont importants pour une détection aussi précoce que possible de l'infection.

1.4.1.3. L'examen clinique général :

Un examen clinique général complet de l'animal est nécessaire à chaque découverte de mammite clinique. Cela permet d'évaluer l'animal, de préciser le diagnostic, et d'envisager un

pronostic.

La prise de température est le premier geste à faire. Il faut en parallèle estimer la déshydratation de l'animal (**Tableau N°02**) et vérifier l'absence d'un état de choc en recherchant notamment les éléments suivants : hypothermie, abattement, augmentation du temps de recoloration capillaire, etc (**Angoujard, 2015**).

Tableau N°02: Grille d'évaluation du degré de déshydratation chez le bovin adulte (**Bosquet et al., 2013**).

Symptômes	Pertes d'eau (en % du poids vif)	Score de déshydratation
Légère énophtalmie, pli de peau persistant 3 à 5 secondes au niveau de la paupière supérieure Muqueuses encore un peu humides	6-7 %	1 (légère)
Énophtalmie franche, pli de peau persistant 6 à 10 secondes au niveau de la paupière supérieure Muqueuses collantes	8-9 %	2 (modérée)
Œil fortement enfoncé dans l'orbite, pli de peau persistant indéfiniment Muqueuses sèches Dépression évidente	10-12 %	3 (sévère)

La sévérité de la mammite clinique peut être facilement évaluée grâce au **tableau N°03**.

Tableau N°03: Score clinique des mammites bovines avec signes généraux (**Bosquet et al., 2013**)

Symptômes	Degré	Score clinique
Température corporelle	37,8 à 39,2	0
	39,3 à 39,8	1
	< 37,8 ou > 39,8	2
Déshydratation	Aucune	0
	Légère	1
	Modérée	2
	Sévère	3
Contraction du rumen (nombre/ minute)	Plus de 2	0
	1	1
	0	2
Signes de dépression	Aucuns	0
	Légers	1
	Marqués	2

1.4.1.4. Gradation des mammites :

Une gradation des mammites fondée sur un certain nombre de critères cliniques objectifs permet d'appréhender la sévérité de celles-ci et d'envisager un pronostic (**Tableau N°04**). Une mammite clinique comprenant seulement une augmentation de la concentration en cellules somatiques individuelle et des modifications du lait est considérée comme faiblement sévère et de grade 1. Le grade 2 correspond aux mammites cliniques modérément sévères dans lesquelles le quartier apparaît modifié. Le dernier grade est attribué aux mammites sévères avec une atteinte de l'état général (**Angoujard, 2015**).

Tableau N°04: Échelle de sévérité individuelle de la mammite (d'après Durel *et al.*, 2011)

Symptômes / Syndromes	Mammite subclinique	Mammite clinique à sévérité variable		
		Faible Grade 1	Modérée Grade 2	Sévère Grade 3
Augmentation des concentrations cellulaires somatiques individuelles (CCSI)	+	+	+	+
Modifications du lait	-	+	+	+
Modifications du quartier	-	-	+	+
Altération de l'état général	-	-	-	+

1.4.2. Le diagnostic cellulaire (le dénombrement des cellules du lait) :

Il repose d'une manière générale sur la mise en évidence des conséquences cellulaires de l'état inflammatoire de la mamelle (**Hanzen, 2009 b**).

Le comptage cellulaire est un outil diagnostique à la fois individuel et de troupeau. En étudiant les résultats de ce comptage, le vétérinaire peut définir le modèle épidémiologique principal auquel il est confronté. Le comptage cellulaire peut être réalisé par un organisme indépendant de l'élevage (contrôle laitier) ou par le robot de traite (**Angoujard, 2015**).

1.4.2.1. Méthodes directes :

Les cellules présentes dans le lait sont pour la majorité d'entre elles d'origine sanguine. Elles sont représentées par les globules rouges (rares), les leucocytes polymorphonucléaires (0 à 11%) neutrophiles surtout, acidophiles (rares), basophiles (très rares), les leucocytes mononucléaires tels les lymphocytes et les monocytes, les histiocytes, les macrophages et enfin les cellules épithéliales.

Les leucocytes polymorphonucléaires (0 à 11%) ont un rôle essentiel de défense contre les infections mammaires en phagocytant et lysant les germes pathogènes (**Hanzen, 2009 b**).

Les macrophages (68 à 88%) ont pour rôle essentiel de détruire les débris cellulaires, les bactéries par phagocytose, de prendre en charge les antigènes microbiens et de les présenter aux lymphocytes.

Les lymphocytes (10 à 27 %) (de type T pour la plupart soit 50 %) libèrent des lymphokines qui par chimiotactisme initialisent l'afflux des polymorphonucléaires

neutrophiles. Les lymphocytes B (20%) sont à l'origine de la production d'anticorps. Les leucocytes polymorphonucléaires jouent un rôle essentiel dans la phagocytose. Les cellules épithéliales (0-7%) Ils proviennent surtout de l'épithélium galactophore. Leur passage dans le lait résulte surtout d'abrasions liées à la traite. Une faible proportion est liée à une desquamation naturelle des épithéliums qui produit surtout des débris cellulaires. Ces cellules n'ont aucun rôle particulier **(Hanzen, 2009 b)**.

➤ **Le système Fossomatic (système fluoro-optoélectronique) :**

Suppose la coloration préalable de l'ADN des noyaux au moyen d'un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium. La fluorescence rouge ainsi émise après éclaircissement de la préparation au moyen d'une lampe auxénon, est proportionnelle à l'ADN du noyau. Un photomultiplicateur capte le signal fluorescent émis par les cellules et le transforme en signal électrique. Ce système ne détecte à peu près que les cellules inflammatoires puisque les amas de caséine et les particules inertes ne fixent pas le bromure d'éthidium. Les bactéries ont un ADN plus diffus qui émet une lumière moins intense. L'appareil est calibré pour ne pas enregistrer ces signaux de plus faible intensité. Ce système permet l'analyse de 80 (Fossomatic180) à 500 (Fossomatic 5000) prélèvements par heure qui au préalable doivent être homogénéisés par agitation **(Hanzen, 2009 b)**.

Les concentrations cellulaires somatiques individuelles (CCSI.) et de tank (CCST) sont mesurées dans la majorité des élevages par le contrôle laitier. Elles peuvent également être mesurées sur demande par la laiterie pour les éleveurs non adhérents au contrôle laitier.

➤ **Concentration cellulaire somatique individuelle (CCSI) :**

Chaque mois, le technicien du Contrôle laitier prélève le lait des quatre quartiers de chaque vache en lactation et l'envoie au laboratoire pour analyse afin de déterminer la qualité du lait et son prix. Il évalue à l'occasion de son contrôle la qualité du lait (taux butyreux, taux protéique, ...), la quantité de lait produite, et la CCSI. Les cellules dont la présence est ainsi évaluée dans le lait sont les macrophages, les leucocytes, et les cellules épithéliales. Seuls les leucocytes font varier significativement la concentration et sont le signe d'une infection **(Angoujard, 2015)**.

Entre deux traites et au cours de la lactation, la CCSI varie. Deux résultats de CCSI éloignés de plusieurs mois ne sont pas interprétables. La CCSI est réalisée sur le mélange de lait des quatre quartiers, le taux cellulaire du quartier infecté est donc dilué par les quartiers sains. De même, une CCSI élevée peut persister après la guérison bactériologique **(Angoujard, 2015)**.

Les CCSI doivent être réalisés tous les mois car leur interprétation se fait par comparaison aux mois précédents afin de noter les augmentations importantes signalant une infection et de positionner les résultats de la vache par rapport à des valeurs seuils. L'analyse mensuelle des CCSI ne permet pas de détecter les augmentations dues à des infections de courte durée inférieures à un mois (**Angoujard, 2015**).

Une vache ayant un ou plusieurs résultats mensuels de CCSI supérieurs à 800 000 cell/mL est considérée comme « infectée ». Il est possible de considérer une vache comme saine avec une CCSI inférieure à 100 000 cell/mL voire à 25 000 cell/mL (**Durel et al., 2004**). Les résultats de CCSI compris entre 300 000 et 800 000 cell/mL sont considérés comme douteux. Lorsqu'un quartier est infecté subcliniquement par une bactérie de type contagieux, le résultat du CCSI est compris entre 200 000 et plus de 10 000 000 cell/mL (**Risco et Melendez, 2011**). En conclusion, si une CCSI élevée permet de suspecter une infection, une CCSI basse ne permet pas de conclure à une absence d'infection.

Les résultats des CCSI permettent d'identifier les vaches qui sont infectées durablement par des agents pathogènes majeurs (**Bosquet et al., 2013**). Les autres vaches, celles qui ne sont pas infectées par des agents pathogènes majeurs, soit sont non infectées, soit sont infectées par un pathogène mineur, soit sont infectées par un pathogène majeur pendant une courte période.

Les résultats des CCSI sont souvent un moyen de sélection des animaux à surveiller et à examiner pour l'éleveur et le vétérinaire. Ils interviennent dans le diagnostic individuel des mammites subcliniques et cliniques, à condition de les interpréter par rapport aux résultats précédents. C'est un des critères d'alerte signalant un problème de mammites dans l'élevage (**Tableau N°05**) (**Angoujard, 2015**).

Les résultats des CCSI sont un des critères orientant vers un des modèles épidémiologiques : contagieux, environnemental, mixte. Les seuils présentés dans le tableau N°05 servent à la fois d'objectifs à atteindre pour l'éleveur mais aussi de seuils d'alerte pour identifier les animaux à examiner et/ou surveiller.

Tableau N°05: Critères, objectifs et seuils d'alerte du statut infectieux des vaches laitières (m : mois, L : lactation) (d'après **Durel et al., 2004**)

Critère	Objectifs	Seuils d'alerte
Vache en lactation		
Guérison clinique à 5 jours	> 80 %	< 70 %
CCSI < 300 000 cell/mL	> 85 %	< 75 %
CCSI > 800 000 cell/mL	< 5 %	> 8 %
CCSI primipares < 300 000 cell/mL	> 95 %	< 90 %
Infection mensuelles m+1/m <u>Vaches CCSI <300 000 cell / mL (m) et CCSI >300 000 cell / mL (m +1)</u> Vaches CCSI <300 000 cell / mL	< 5 %	> 10 %
Vaches tarries		
Guérison L+1/ L <u>Vaches CCSI tarissement >300000 cell /mL et CCSI vêlage <300000 cell /mL</u> vaches CCSI tarissement >300 000 cell / mL	> 70 %	< 50 %
Infections L+1 /L <u>Vaches CCSI tarissement <300000 cell /mL et CCSI vêlage >300000 cell /mL</u> vaches CCSI tarissement <300000 cell /mL	< 10 %	> 20 %
Variation des CCSI < 300 000 cell/mL	positif	négatif

➤ Concentration cellulaire somatique du tank (CCST) :

Le taux cellulaire de tank ou numération cellulaire de tank se définit comme la concentration en cellules dans le tank. Cette valeur est en général disponible soit par la fiche de paye établie par la laiterie qui collecte le lait, ou bien par les contrôles mensuels effectués par le contrôleur laitier. La laiterie calcule en général la moyenne géométrique des trois derniers prélèvements. Cette valeur ne peut être le signe d'alerte d'un problème de mammité dans le troupeau, mais la valeur seuil de 400 000 cellules par mL a été retenue comme référence pour l'arrêt de la collecte si elle persiste plus de deux mois. On considère que le seuil d'alerte bas qui doit être retenu est de 200 000 cellules, ce qui permet d'intervenir avant le seuil de 250 000 cellules/mL au-delà duquel l'éleveur se verra infliger des pénalités (**Allain, 2011**). Cependant, compte tenu des pratiques de tri/écart du lait, les numérations cellulaires du lait de tank ne reflètent qu'imparfaitement le niveau d'infection de la mamelle. Les CCI permettent de mieux juger du niveau de mobilisation leucocytaire (**Chassagne et al., 2003**). L'interprétation du CCT permet d'estimer le pourcentage de quartiers atteints, ainsi que les pertes quantitatives induites en lait. Ces

pertes en lait induites suite aux taux cellulaires élevés peuvent être estimées à partir d'un modèle statistique établi par le syndicat national des groupements techniques vétérinaires français (SNGTV) (M'sadak *et al.*, 2011).

$$P(\%) = [TCT - 200\ 000 / 100\ 000] \times 0,02$$

Avec P : pertes quantitatives en lait.

Cette formule signifiant qu'il ya perte en lait de 2 % par tranche de 100 000 cellules au-delà de 200 000 cellules/mL de lait (M'sadak *et al.*, 2011).

1.4.2.2. Méthodes indirectes :

➤Le California Mastitis Test (CMT) :

Cette méthode, également appelée test au Teepol, ou leucocyttest, est un test visuel permettant d'évaluer la concentration cellulaire du lait. Ce test peut être utilisé pour confirmer et/ou identifier le ou les quartiers infectés (Thomelin *et al.*, 2009). Il est basé sur l'utilisation d'un détergent (le Teepol à 10 %) et d'un colorant (le pourpre de bromocrésol) sur le lait. Le tensioactif 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. présente. 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 mammitique (Debreil, 2008). Le test CMT ne réagira de façon visible qu'à partir d'un taux de 400 000 cellules et plus (RCRMB, 2010 a). L'utilisation du CMT présente de nombreux avantages. Il s'agit d'un test rapide qui donne des résultats instantanés. Il est très simple d'utilisation, très bon marché (moins coûteux), et peut être fait directement par l'éleveur sur un grand nombre d'animaux. On peut utiliser ce test aussi bien sur du lait frais (jusqu' à 12 heures après le moment de prélèvement), que sur du lait réfrigéré (jusqu'à 36h après le prélèvement) (Jacquinet, 2009). Il reste de loin le test le mieux adapté en milieu rural, car il nécessite peu de matériel et de connaissance techniques (Gambo et Agnem Etchike, 2001). Ce test a l'avantage de faire économiser le temps et l'argent en permettant de cibler les quartiers infectés (M'sadak *et al.*, 2014). 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 (Debreil, 2008). Le seul inconvénient expliquant la non utilisation par certains éleveurs serait le caractère

subjectif de la lecture et donc du résultat obtenu puisque l'opérateur doit apprécier l'intensité du gel formé (**Jacquinet, 2009**). 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 (**Debreil, 2008**).

-Valeur du test :

Ce test a surtout une valeur ponctuelle comme complément de la détermination du taux cellulaire lorsqu'il s'agit de décider de la réforme d'un animal ou du traitement spécifique de l'un ou l'autre quartier. Il permet également de vérifier la guérison de l'animal. Réalisé systématiquement lors de la traite, il en allonge la durée et suppose la notation d'un nombre important d'informations. Enfin, il permet de déterminer l'importance des pertes de production laitière (**Gambo et Agnem Etchike, 2001**). La répétition de l'examen sur des vaches douteuses améliore le diagnostic d'infections mammaires (**Lepage, 2003**).

Le CMT, lorsqu'il est réalisé régulièrement, présente les mêmes indications que le CCI. Il a l'avantage, par rapport à celui-ci, d'être moins coûteux, de pouvoir être réalisé par tous les éleveurs et de délivrer une image plus précise des infections en donnant des résultats quartier par quartier (**Hanzen, 2009 a**). Ce test ne permet pas de déduire la nature du germe en cause (**Ferrouiller et al., 2004**).

Il peut également être utilisé pour vérifier voire sélectionner les animaux à traiter au moment du tarissement (**Gambo et Agnem Etchike, 2001**).

► Le test de mammite de Californie (CMT)

Limites du CMT :

- 1- Le CMT est une estimation et non pas une valeur exacte du CCS.
- 2- Le résultat du CMT, par quartier, peut ne pas refléter celui obtenu sur un échantillon composite prélevé lors du contrôle laitier.
- 3- La réalisation et l'interprétation correctes dépendent de l'usager.
- 4- Le résultat peut être plus difficile à interpréter pour le colostrum.

	Grade	Signification	Description de la réaction	Interprétation (cellules/ml)
	N	Négatif	Le mélange demeure liquide et homogène. Le godet se vide goutte à goutte.	0 – 200 000
	T	Trace	Le mélange devient légèrement visqueux. La réaction est réversible, la viscosité tend à disparaître.	150 000 – 500 000
	1	Faiblement positif	Le mélange devient visqueux sans formation de gel au centre et la viscosité tend à persister. Le mélange quoique épaissi, se vide graduellement.	400 000 – 1 500 000
	2	Clairement positif	Formation d'un gel qui tend à se retrouver au centre du godet s'il y a un mouvement de rotation de la palette. Le gel recouvre le fond du godet si on arrête de tourner. Si on verse le mélange, la masse gélatineuse tombe et peut laisser du liquide dans le godet.	800 000 – 5 000 000
	3	Fortement positif	Formation d'un gel au centre du godet qui n'adhère pas au pourtour mais au fond du godet. Si on verse le mélange, celui-ci tombe d'un coup sans laisser de liquide.	> 5 000 000
	+	Alcalin	On ajoute ce symbole si la réaction est distinctement alcaline indiquée par une coloration mauve intense.	
	A	Acide	On ajoute ce symbole si la réaction devient jaune (pH < 5,2).	

*Notez, dans le registre, le n° de la vache et le grade observé du CMT.
Si le CMT n'est pas effectué juste avant la traite, procédez à un bain de trayon pour prévenir les infections.*

Figure N° 10: Grille de lecture du test CMT (RCRMB, 2009).

► Mesure de la conductivité du lait :

La conductivité du lait est basée sur la capacité du lait à conduire le courant électrique. Le lait contient plusieurs ions (ou électrolytes) : du chlore, du sodium et du potassium responsables de cette conductivité du courant électrique. Au cours de la lactation, la concentration en ions et le taux butyreux évoluent de manière physiologique. La conductivité est élevée dans le colostrum puis elle diminue pour ré-augmenter en fin de lactation suivant la concentration en ions et le taux butyreux (Durel *et al.*, 2004).

Lors d'une infection, la perméabilité des capillaires sanguins est augmentée, les jonctions serrées entre les lactocytes disparaissent de manière plus ou moins importante et les systèmes de pompage des ions sont donc altérés. L'ensemble de ces modifications va conduire à une baisse du lactose et du potassium dans le lait et à l'augmentation compensatoire du chlore et du sodium pour assurer un équilibre osmotique. La teneur en chlorures du lait est ainsi proportionnelle au degré d'infection (Durel *et al.*, 2004). De telles

modifications peuvent se produire 24 à 36 heures avant que les signes visibles se développent (**Anonyme 2, 2016**).L'augmentation de la conductivité apparaît en même temps que l'augmentation des CCSI.

Pour interpréter ces résultats de conductivité, il faut prendre en compte les nombreuses sources de variations : la race de l'animal, le stade de lactation, l'alimentation et la technique de traite (**Durel et al., 2004**).Elle est en général comprise entre 4 et 5.5 mS/cm à 25°C (**Jacquinet, 2009**).

Les agents pathogènes responsables d'une inflammation importante provoquent des augmentations importantes de conductivité, supérieures à 50 % pour les mammites cliniques et à 20% pour les mammites subcliniques .Une bonne connaissance du système de mesure est nécessaire pour interpréter les résultats face à la diversité de systèmes existants, et face à leurs qualités (sensibilité et spécificité) très différentes. L'augmentation de la conductivité apparaît en même temps que l'augmentation des CCSI (**Durel et al., 2004**).

➤Le papier indicateur de pH :

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 (**Debreil, 2008**).

➤Méthodes enzymatiques :

Ces méthodes sont des techniques de laboratoire permettant la mise en évidence de mammites subcliniques de manière précoce.

A. Activité de lactate déshydrogénase :

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme lysosomiale contenue en très faible quantité dans le lait normal, suite au processus physiologique de renouvellement du tissu mammaire. En cas d'inflammation, il y'a afflux massif de macrophages et de neutrophiles ; la lyse de ces cellules libérant le LDH dont l'activité augmente dans le lait. La mesure de cette activité se réalise par spectrophotométrie à 340 nm, en mesurant l'absorption du L-lactate produite lors de la réaction (**Amandine, 2007**).

B. Activité de la N-acétyl-D-glucosaminidase :

La N-acétyl- β -D-glucosaminidase est une enzyme lysosomale et cytosolique relarguée dans le lait par les neutrophiles durant la phagocytose, lors de la lyse cellulaire et dans une moindre mesure suite aux dommages subis par les cellules épithéliales. Cette enzyme est donc un indicateur de l'état d'inflammation de la mamelle et à ce titre peut être utilisée comme moyen de détection des mammites (**Jacquinet, 2009**).

D'autres méthodes peuvent mettre en évidence une inflammation mammaire au niveau d'un robot de traite (**Bosquet *et al.*, 2013**) :

- La colorimétrie : elle se base sur la variation colorimétrique du lait lors d'inflammation induite par le passage de pigments provenant du sang.
- La concentration en lactose mesurée par spectrophotométrie infrarouge : sa diminution indique une augmentation de la perméabilité de l'épithélium sécrétoire.

Pour toutes ces méthodes, il faut être vigilant quant à l'interprétation des résultats. Les paramètres d'analyses doivent être correctement réglés et les seuils judicieusement choisis afin d'éviter les fausses alertes.

1.5. Modèles épidémiologiques :

L'identification du modèle épidémiologique des mammites d'un troupeau permet de s'adapter à la situation de l'élevage et d'orienter les mesures préventives et curatives vers les agents pathogènes identifiés. Dans cette approche, il existe trois modèles : le modèle contagieux où la transmission se fait de vache à vache, le modèle environnemental où la transmission se fait entre l'environnement et la vache, et le modèle mixte qui comprend les deux modes de transmission (**Angoujard, 2015**).

Ces modèles épidémiologiques orientent le diagnostic vers une suspicion d'un type de bactéries probablement impliquées, alors que la bactérie réellement en cause n'a pas encore été et ou ne sera pas identifiée. Ils nécessitent une étude des documents d'élevage afin de déterminer le contexte épidémiologique dominant de l'élevage. Le but est d'adapter les traitements et les mesures préventives à la situation vécue par le troupeau concerné (**Angoujard, 2015**).

1.5.1. Modèle mammaire ou modèle contagieux :

Dans le modèle mammaire, les trayons des vaches infectées constituent le réservoir primaire des germes. Pendant la traite, les pathogènes passent de quartiers à quartiers ou de

mamelles à mamelles via l'intermédiaire des réservoirs secondaires (lavettes, manchons trayeurs, mains de l'éleveur), de plaies ou à cause du mauvais fonctionnement de la machine à traire (**Institut de l'élevage, 2008**).

Ces bactéries ont d'ailleurs la capacité de coloniser rapidement l'intérieur du trayon et du pis et adhèrent fortement aux tissus mammaires (**RCRMB, 2010 b**).

Les bactéries concernées par ce modèle contagieux présentent un caractère oligoclonal c'est à dire qu'une à deux souches seulement sont retrouvées dans le troupeau, d'où une très grande contagiosité. La prévalence, soit le nombre de vaches atteintes, est élevée ; et l'incidence, soit le nombre de nouveaux cas, est stable tout au long de la lactation. Les germes concernés induisent des mammites subcliniques ou des mammites chroniques, avec de temps en temps (mais non systématiquement) l'émergence de signes cliniques (**Remy, 2010**). La forme subclinique des infections transforme les animaux atteints en porteurs inapparents qui constituent alors des réservoirs redoutables (**Hanzen, 2009 a**). Les espèces à réservoir mammaires ont tendance à persister lors d'infections avec des concentrations cellulaires qui restent élevées pendant plusieurs mois. La réponse au traitement est moyenne avec une guérison au tarissement ou en lactation qui est faible à modérée (inférieure à 50%). Les rechutes sont fréquentes (**Roussel et al., 2011**).

Les bactéries responsables sont essentiellement : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *dysgalactiae*, ainsi que certaines souches de *Streptococcus uberis*. Les staphylocoques à coagulase négatif peuvent aussi être classés dans ce modèle, bien que certains soient d'origine environnementale (**Gehring et Smith, 2006**).

Tableau N°06: Caractérisation épidémiologique du modèle contagieux (d'après **Bosquet, 2004**).

Critères	Modèle contagieux
Comptage cellulaire	- CCST > 200 000 - moins de 85 % de CCSI < 300 000
Incidence de cas cliniques	Faible à modérée (< 30 cas / 100 vl / an)
Sévérité des cas cliniques	Plus faible
Facteurs de risques	- Traite favorisant la contagion. - Défaut de trempage. - Crevasses, lésions sur les trayons. - Tarissement mal conduit. - Réforme insuffisante.

CCST : Comptage cellulaire somatique de tank.

CCSI : Comptage cellulaire somatique individuel.

VL : vaches laitières.

Tableau N°07: Caractérisation épidémiologique des sous modèles à staphylocoques (d'après Bosquet, 2004)

Critères	Sous modèle à staphylocoques
Séries de CCSI > 300 000	Longues >4 mois
Rechutes	Fréquentes
CCSI avant mammite clinique	Élevés en moyenne
Indice de guérison au tarissement	Faible à modéré
Sévérité des mammites cliniques	Faible à modérée
Quartier fibrosé après mammite	Fréquent
Facteurs de risques	Lésion du trayon, défaut de réforme

1.6. Facteurs de risque :

L'identification des facteurs de risque présents dans l'élevage et concourant à la présence de mammites permet de conforter ou de remettre en cause le modèle épidémiologique supposé de l'élevage. L'objectif est de mettre en place les mesures préventives les plus adaptées pour diminuer l'impact des facteurs de risques majeurs. Afin d'identifier ces facteurs de risque de mammites, il est recommandé d'effectuer une visite de l'élevage (bâtiments) et une visite de traite. Les conditions de logement inadéquates pendant la lactation et/ou le tarissement et/ou le péripartum orientent vers un modèle environnemental, tout comme un défaut de lavage et essuyage des trayons (Angoujard, 2015).

Le réservoir des bactéries dans le modèle de type environnemental est le plus souvent la litière. Tout élément qui favorise la multiplication des bactéries dans la litière augmente ainsi le risque de contamination : les défauts d'hygiène du logement (surface, ventilation, pentes, ...), une durée de stabulation longue, une densité trop importante d'animaux, des aires de couchages contaminées (température, humidité, circulation, ...). Une période sèche longue et des traitements préventifs au tarissement insuffisants favorisent les mammites dans ce modèle épidémiologique (Angoujard, 2015).

Avant la traite, un défaut de lavage et essuyage des trayons favorise la pénétration des

bactéries restées sur la peau des trayons. Après la traite, il est recommandé de ne pas laisser les vaches se coucher. Un défaut d'hygiène autour du vêlage oriente vers un sous-modèle à entérobactéries (**Bosquet et al., 2013**).

Des défauts d'hygiène lors de la traite et/ou des défauts de machine à traire orientent vers un modèle contagieux (**Tableau N° 08**). La contamination est favorisée par des défauts d'hygiène pendant la traite par des mains, lavettes et/ou matériel contaminés par une vache infectée, et après la traite par un défaut de trempage des trayons. Le défaut de dépistage des mammites cliniques, des traitements curatifs (en lactation et/ou au tarissement) mal conduits et une réforme insuffisante des vaches à infection persistante favorisent les mammites à bactéries de type contagieux (**Bosquet et al., 2013**). Les lésions de la peau (crevasse) permettent la multiplication des bactéries et augmentent le risque de contamination de la mamelle. Les lésions de la peau, du trayon et du quartier dues à des traumatismes chimiques ou physiques (froid, humidité, machine à traire, ...) entraînent également une douleur qui induit la libération d'adrénaline donc inhibe l'ocytocine et conduit à une rétention lactée. Cette rétention lactée empêche l'évacuation des bactéries et favorise le développement des mammites (**Rémy, 2010**).

La parité est un facteur de risque du modèle contagieux car la période d'exposition à un lait contaminé augmente avec l'âge de la vache, mais est aussi un facteur de risque du modèle environnemental car les sphincters des trayons des vaches âgées sont moins efficaces et n'assurent plus totalement leur rôle de barrière face aux infections (**Risco et Melendez, 2011**).

Tableau N°08: Facteurs de risque spécifiques du modèle contagieux et du modèle environnemental (d'après **Bosquet et al., 2013**).

Modèle	Facteurs de risque spécifiques
Contagieux	<ul style="list-style-type: none"> -Traite favorisant la contagion (mains, lavettes, manchons). -Défaut de trempage des trayons après la traite. -Trayons crevasses. -Défaut de dépistage des mammites cliniques. -Traitements curatifs (lactation, tarissement) mal conduits. -Réformes insuffisantes.
Environnemental	<ul style="list-style-type: none"> -Durée de stabulation longue. -Défaut d'hygiène du logement (surface, ventilation, pentes, ...). -Aires de couchages contaminées (température, humidité, circulation,...). -Défaut de lavage et essuyage des trayons avant la traite. -Période sèche longue. -Traitement préventif au tarissement insuffisant. -Défaut d'hygiène des parturientes, vaches couchées. -Défaut d'hygiène des traitements intra-mammaires.

1.7. Examens complémentaires :

Les examens complémentaires sont utiles pour confirmer ou infirmer la suspicion épidémiologique et ainsi poursuivre la démarche diagnostique. L'objectif est d'identifier concrètement les agents pathogènes responsables de mammites au sein du troupeau afin de mettre en place des mesures de lutte adaptées (**Angoujard, 2015**).

1.7.1. Bactériologie :

L'examen bactériologique systématique d'un échantillon de lait devrait être la base de tout diagnostic. Il permet en effet d'établir avec précision l'espèce bactérienne impliquée et donc de mettre en place le traitement antibactérien adapté. Or, cet examen étant coûteux et contraignant à mettre en place, il n'est en fait que très peu utilisé sur le terrain. Les résultats ne sont de plus fournis par le laboratoire que 48h après le prélèvement. Les éleveurs pratiquent donc une antibiothérapie probabiliste et n'utilisent cet examen que lors d'échecs thérapeutiques (**Rémy, 2010**). Il faut savoir limiter les prélèvements aux circonstances où elles

s'avèrent indispensable se'est-à-dire en cas de mammites cliniques si l'exploitation est confrontée à une augmentation brutale de leur incidence ou à un problème de récurrence après échec de mesures préventives ou curatives et en cas de mammites sub-cliniques pour en contrôler l'origine infectieuse et l'efficacité des mesures préventives utilisées. Le plus souvent il sera indiqué si l'analyse épidémiologique réalisée (examen des CCI, audit de santé mammaire, visite de traite, analyse des cas cliniques) ne conclut pas à une situation univoque. Par ailleurs, il peut également revêtir une connotation pédagogique pour convaincre l'éleveur de l'exactitude du diagnostic posé (Hanzen, 2009 b).

Le diagnostic bactériologique peut également permettre de confirmer un sous-modèle épidémiologique, déterminé grâce aux CCSI (Remy, 2010). Il est inutile sur des animaux ayant reçu un traitement anti-infectieux dans les 15 jours qui précèdent (Mezine, 2006).

L'examen bactériologique doit être réalisé sur chacun des quatre quartiers de la vache atteinte par une mammite subclinique. Le prélèvement se réalise en salle de traite. Dans un premier temps, il est nécessaire de se laver les mains et d'enfiler des gants. Après avoir nettoyé la mamelle à l'eau et au savon, on sèche les trayons avec une feuille de papier, puis on désinfecte les quatre trayons à l'alcool ou à l'aide d'une serviette désinfectante. On élimine ensuite les premiers jets de lait, puis, on recueille dans un flacon stérile tenu horizontalement le ou les deux jets suivants, comme présenté dans la Figure N°11 (Remy, 2010).

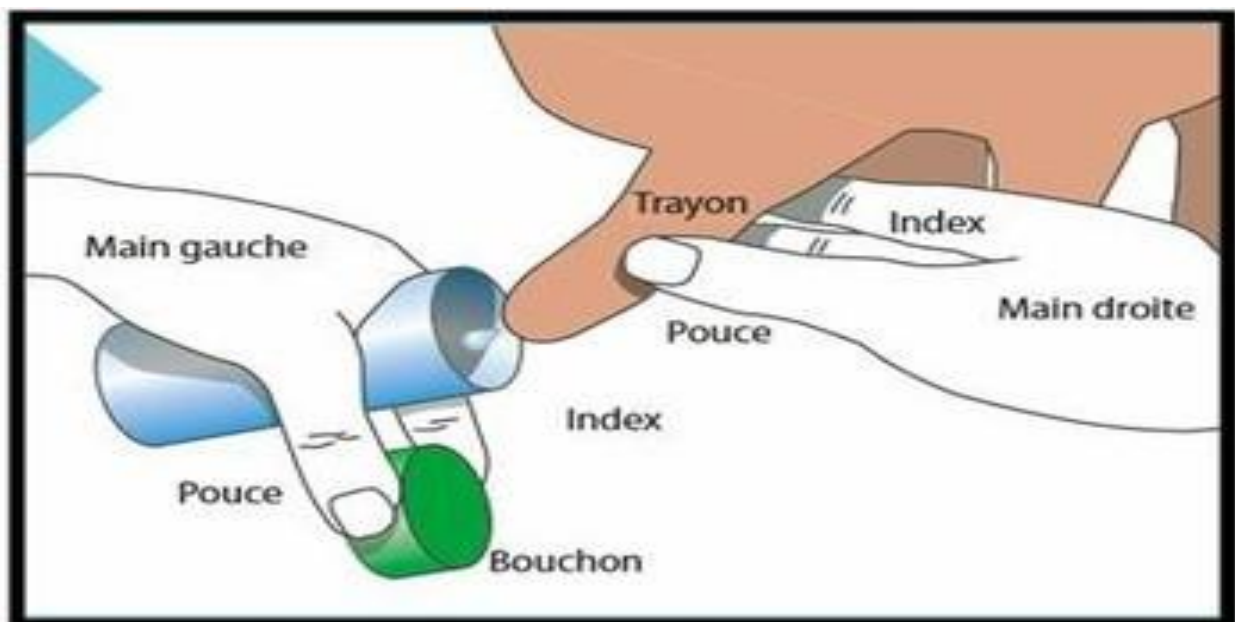


Figure N°11_: Prélèvement aseptique d'un échantillon de lait en vue d'une analyse bactériologique (Remy, 2010).

Ceci doit représenter environ 1 mL de lait. Il est inutile de chercher à en recueillir plus, au contraire, plus le prélèvement est long, plus on court le risque d'une contamination. De même, il est important d'éviter tout contact entre l'extrémité du trayon et le flacon stérile (**Figure N°11**). On referme finalement le flacon qui doit être immédiatement identifié avec le numéro de la vache et la désignation du quartier prélevé. La même opération doit être répétée pour chacun des quartiers, avec à chaque fois un nouveau flacon stérile.

Les résultats ne doivent mettre en évidence qu'une seule espèce bactérienne (éventuellement deux). Au delà, il s'agit d'une contamination du prélèvement, et l'examen bactériologique est à refaire ; d'où l'importance de travailler dans de bonnes conditions d'asepsie (**Remy, 2010**).

Lors d'un sondage bactériologique, **Bosquet et al., 2013** recommandent pour une estimation statistique fiable un nombre de prélèvements compris entre 40 et 60 % des cas de mammites enregistrés. Un nombre de prélèvements inférieur donne toutefois une tendance utile pour confirmer ou rejeter le modèle épidémiologique suspecté de l'élevage.

Plusieurs étapes sont nécessaires à la détermination de la présence ou non d'agents bactériens et, s'il y a présence bactérienne, à la détermination du genre et de l'espèce. Tout d'abord, l'ensemencement d'un milieu solide et non sélectif permet de contrôler la qualité du prélèvement. La gélose au sang de mouton est le milieu de référence pour le diagnostic des mammites. Il faut l'ensemencer avec un volume de lait constant. Des öses de 10µL simplifient les manipulations. Suite à l'incubation, l'isolement des colonies est possible (**Durel et Poutrel, 2006**).

La méthode bactériologique consiste à ensemencer des géloses sélectives pour un type de bactérie et de les mettre à incuber pendant 24 heures à 37°C. A la suite de l'incubation, l'aspect des colonies et la réalisation de tests enzymatiques permettent l'identification du genre bactérien (staphylocoques, streptocoques, entérobactéries). Ils existent des systèmes comprenant plusieurs géloses sélectives et permettant un travail simplifié et plus rapide (**Schmitt-Van de Leemput et al., 2013b**).

L'antibiogramme mesure la sensibilité *in vitro* de la bactérie vis à vis de différents antibiotiques. L'objectif est d'identifier la présence des résistances acquises et d'orienter le choix du traitement antibiotique utilisé même si l'activité d'un antibiotique *in vitro* diffère de celle *in vivo*. **Kuang et al., 2009** ont montré que les tétracyclines ont une activité réduite dans le lait par rapport à l'antibiogramme et suspectaient la formation de complexes entre l'antibiotique et les protéines du lait, notamment la caséine. Un échec thérapeutique, en dépit de résultats favorables d'un antibiogramme, peut être dû à un défaut de pharmacocinétique

(par exemple, l'accès à la mamelle à des concentrations insuffisantes).

Des tests rapides d'évaluation de la résistance existent comme celui à la nitrocéfine pour la production de β -lactamase par *Staphylococcus aureus*, révélant la résistance aux pénicillines (Angoujard, 2015).

1.7.2. Polymerase Chain Reaction(PCR) :

La méthode de PCR est une amplification génique de l'ADN. Dans le cadre des mammites, elle est utilisée pour la recherche des acides nucléiques de bactéries, de levures et d'algues dans le lait. L'analyse PCR est une alternative à la bactériologie. L'analyse nécessite la même qualité de prélèvement stérile que la bactériologie. L'ADN contenu dans les bactéries est extrait et amplifié grâce à des amorces qui correspondent aux séquences recherchées. Les résultats sont présentés de manière semi-quantitative et indiquent si l'agent pathogène est présent dans l'échantillon en plus ou moins grande quantité. L'analyse entière prend quatre heures dont deux nécessitant des manipulations (Schmitt-Van de Leemput *et al.*, 2013a). Les analyses sont réalisées le plus souvent par un laboratoire.

L'analyse PCR est difficile à interpréter pour des cas individuels en raison de sa trop grande sensibilité de détection, elle détecte aussi les bactéries présentes en très petite quantité. Elle permet d'identifier les agents pathogènes responsables de mammites à l'échelle d'un troupeau (Schmitt-Van de Leemput *et al.*, 2013a).

Les résultats d'une analyse PCR et de la bactériologie sont identiques dans une majorité de cas concernant les mammites cliniques comme subcliniques. L'analyse PCR, plus sensible au niveau de la détection, décèle cependant la présence de bactéries qui ne sont pas détectées en bactériologie classique. Cela rend son interprétation plus complexe surtout quand les quantités de bactéries sont faibles. L'analyse PCR est quand même utile à l'établissement de profils d'élevages, même si elle ne permet pas d'apprécier la résistance aux antibiotiques des souches identifiées (Schmitt-Van de Leemput *et al.*, 2013a).

1.8. Traitement des infections intra-mammaires :

La mise en place d'une approche curative de la mammite dans un élevage n'est pas chose aisée. Elle doit prendre en considération divers paramètres relatif au **diagnostic** (symptomatique versus étiologique, précoce ou tardif, individuel ou d'élevage), au **germe** (localisation au niveau des réservoirs, résistance), à l'**animal** (symptômes cliniques ou subcliniques, locaux ou généraux), à l'**antibiotique** (propriétés pharmacodynamiques, pharmacocinétiques, interactions, efficacité), au **moment du traitement** (en lactation vs au tarissement), aux **conséquences du traitement** (aspects économiques, résidus, bonnes pratiques

vétérinaires) (Faroult et Seryes, 2005).

Il n'est pas inutile de rappeler que la réussite d'une antibiothérapie est liée à une intervention **précoce** (traitement dès l'apparition des premiers symptômes pour éviter l'extension ou la persistance de l'infection et augmenter les chances de réussite thérapeutique), **massive** (pour assurer l'élimination aussi complète que possible des germes: seule la voie diathélique permet d'obtenir des concentrations suffisantes d'antibiotiques sur le site de l'infection), **prolongée** (c'est-à-dire pendant au moins 3 traites successives voire plus selon les recommandations du fabricant sans interruption même si les symptômes disparaissent), en respectant les conditions d'**asepsie** (pour éviter des surinfections ou des nouvelles infections par des mycoses ou *Nocardia*) et en utilisant un produit ne renfermant **qu'un voire deux antibiotiques** (pour limiter la pression de sélection des populations bactériennes) (Faroult et Seryes, 2005).

Pour les producteurs laitiers, l'objectif immédiat du traitement des mammites cliniques est de diminuer les signes cliniques de la maladie et les souffrances de la vache, en plus d'assurer le retour à la normale du lait et du quartier infecté et le retour à la production laitière initiale (Descoteaux, 2004). Parvenir à une guérison bactériologique : le but à atteindre est l'élimination totale des bactéries afin d'éviter une rechute, un enkystement possible dans la mamelle (cas notamment des staphylocoques), l'évolution vers une forme subclinique et le maintien de réservoir de germes, source potentielle d'infection pour les autres animaux du troupeau (De Cremoux, 2010). La guérison bactériologique est souvent plus tardive que la guérison clinique. Cependant lors d'infections colibacillaires, les dégâts tissulaires peuvent alors être tellement importants que la mamelle et l'aspect du lait resteront modifiés plusieurs jours après la disparition du germe responsable (De Cremoux, 2010).

1.8.1. Vaccination :

La vaccination a pour objectif de protéger l'animal vacciné avec trois axes : diminuer la sévérité des signes cliniques, réduire le nombre de cas et baisser les CCSI.

En France, un seul vaccin dispose d'une autorisation de mise sur le marché (AMM), il s'agit du vaccin Starvac® du laboratoire Hipra. Ce vaccin est composé de deux valences : l'une est constituée d'une souche d'*E. coli*, et l'autre d'une souche de *S. aureus*. La souche d'*E. coli* possède un lipopolysaccharide (LPS) de membrane incomplet, elle apporte donc des antigènes communs aux souches d'*E. coli* mais également aux autres entérobactéries (*Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, etc.). La souche de *S. aureus* comprend un polysaccharide capsulaire de type 8 et produit un composant extracellulaire pseudocapsulaire dit « slime », antigène commun aux souches de *S. aureus* et aux staphylocoques à coagulase négative (Poutrel, 2014). Il s'agit

donc en principe d'un vaccin à « spectre large » vis à vis des bactéries Gram négatives et des staphylocoques responsables de mammites bovines.

Le protocole de vaccination comprend trois injections intramusculaires profondes : la première **45** jours avant la date présumée du vêlage, la deuxième **10** jours avant le vêlage et la troisième **52** jours après celui-ci. Un autre protocole est proposé selon le fabricant quelque soit le stade physiologique de l'animal. Il est composé d'une primovaccination avec deux injections à trois semaines d'intervalle suivi d'un rappel tous les trois mois. L'immunité apparaît à partir du treizième jour suivant la première injection et persiste jusqu'au soixante-dix-huitième jour suivant la troisième injection d'après le fabricant (**Poutrel, 2014**). L'estimation approximative et inexacte de la durée de la gestation, les avortements et les vêlages précoces sont les principales sources de vaccination incomplète, ces événements courants dans la vie réelle d'un élevage impactent l'efficacité de la vaccination.

Les études européennes sur le sujet ont des résultats différents. L'efficacité du vaccin contre *S. aureus* dépend des caractéristiques de l'élevage et de la conduite de celui-ci (**Schukken et al., 2014**). **March et al., 2010** dans leur étude pour l'obtention de l'AMM du vaccin ont constaté une diminution du nombre de mammites à entérobactéries, à *S. aureus* et à SCN, une baisse du nombre de traitements utilisés dans les lots vaccinés ainsi que des CCSI inférieures bien que élevées par rapport à la norme (328 000 cell/mL). **Sérieys (2011)** a également observé une diminution des CCSI mais uniquement pour les vaches multipares.

Middleton et al., 2009 ont observé une faible efficacité vaccinale contre *S. aureus*. Le vaccin a permis une diminution modérée de l'incidence des nouvelles mammites à *S. aureus* et une baisse moins prononcée de la durée des mammites à *S. aureus* et aux SCN dans l'étude de **Schukken et al., 2014**. Dans cette étude, les résultats étaient meilleurs chez les primipares.

Wilson et al., 2007 ont constaté une baisse de la sévérité des symptômes locaux et généraux des mammites à entérobactéries grâce à la vaccination. Selon **Schmitt-Van De Leemput et al., 2012**, la prévention vaccinale est partielle contre les entérobactéries et *S. aureus*, elle est absente contre les SCN.

La vaccination est un moyen de lutte contre les entérobactéries et les staphylocoques. Elle doit être toujours associée à une très bonne conduite d'élevage avec une bonne gestion des facteurs de risques et une bonne détection des mammites.

1.8.2. Traitements symptomatiques et de soutien :

➤ Fluidothérapie :

Le premier geste à faire lors de mammite, surtout toxigène, est de lutter contre la déshydratation et l'hypovolémie et rétablir l'équilibre hémodynamique afin de favoriser la perfusion et donc l'oxygénation des différents tissus (**Baillet, 2009**).

Lors de déshydratation et surtout de choc, la fluidothérapie est la base du traitement de réanimation. L'état de choc est provoqué lors de mammites par la libération d'endotoxines par les agents pathogènes comme les entérobactéries ou par des exotoxines produites par les staphylocoques, les streptocoques, les clostridies et *Trueperella pyogenes* (**Le Page et al., 2014**).

Lors d'une déshydratation inférieure à 10 %, la fluidothérapie peut être réalisée avec une solution hypertonique de NaCl (entre 4,5 et 7,2 %) pour un volume maximal réhydraté à 0,9 % de 24 litres. En complément, la réhydratation orale est possible avec des volumes allant de 10 à 30 litres par buvée spontanée ou drenchage (administration forcée par voie orale d'un liquide à l'aide d'une sonde).

Lors de déshydratation sévère donc supérieure à 10 %, les solutés hypertoniques sont à éviter. Les cellules sont plus déshydratées (**Le Page et al., 2014**). La fluidothérapie est à base de soluté isotonique Ringer Lactate ou NaCl 0,9 % et doit être agressive, un volume total de 40 à 60 litres est nécessaire (**Le Page et al., 2014**).

Une alcalose métabolique apparaît lors d'un état de choc suite à l'hypochlorémie provoquée par l'arrêt de la réabsorption de l'acide chlorhydrique par le duodénum. L'utilisation de solutés acidifiants comme le NaCl permet de corriger ce trouble électrolytique.

En cas de sévères hypotensions, une acidose métabolique hypoxémique ante-mortem s'installe. Pour la corriger, la fluidothérapie doit être alcalinisante avec un soluté comme le Ringer lactate par exemple. Les mammites dues à des entérobactéries comme *E. coli* induisent une hypocalcémie. Une complémentation calcique est à réaliser par voie orale. En effet, le calcium peut se révéler toxique pour le fonctionnement du cœur lorsqu'il est injecté par voie parentérale (**Le Page et al., 2014**).

➤ Anti-inflammatoires :

Le recours aux AIS est controversé. Ils seraient intéressants dans le traitement des mammites endotoxiques pour améliorer la guérison mais favoriseraient des infections

cliniques chez les vaches ayant une mammite subclinique à staphylocoques *via* la baisse de l'immunité qu'ils peuvent induire (**Le Page et al., 2014**).

Les doses le plus souvent préconisées (30 mg de dexaméthasone en IV ou IM pour une vache) sont trop faibles pour traiter le choc mais suffisantes pour exercer un effet anti-inflammatoire. Cela explique pourquoi les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent être utilisés lors de mammite grave survenant avant le vêlage (sans risque de provoquer la mise bas). Ont ainsi été recommandée l'aspirine (30 g per os toutes les 8 heures ou 60g toutes les 12 heures), la flumixinemeglumine (1 à 2 mg/kg en IV ou IM toutes les 24 heures) (**Hanzen, 2009 a**).

L'ensemble des AINS a un effet positif sur les signes cliniques de l'inflammation (**Le Page et al., 2014**). Le carprofène améliore l'état général des animaux par son action antipyrétique et la restauration des contractions ruminales (**Vangroenweghe et al., 2005**).

1.8.3. Traitement hygiénique :

➤Hygiène et santé des animaux :

L'hygiène de la traite et des bâtiments est une composante importante de la lutte contre les mammites. Les principaux facteurs de risque de l'élevage identifiés sont à prendre en compte dans le plan de lutte. Il convient de diminuer leur impact voire de les supprimer si cela est possible (**Durel et al., 2011**).

La santé des animaux est un facteur important dans la lutte contre les mammites. Une surveillance particulière doit être apportée aux animaux en mauvais état général ou ayant une autre maladie. Les autres maladies prédisposent aux mammites par une action mécanique comme la fièvre de lait qui induit un relâchement du sphincter, par une baisse de l'immunité telles les métrites et les acétonémies, ou parce qu'elles modifient le comportement de l'animal comme les boiteries qui augmentent le temps de couchage (**Durel et al., 2011**).

➤Augmentation du nombre de traites par jour :

La traite permet l'évacuation du lait et avec celui-ci d'une partie des bactéries, des toxines et des médiateurs de l'inflammation (**Roberson et al., 2004**). Dans certains cas (mammites colibacillaires, mycosiques...), seules des traites répétées (6 à 10 fois par jour) permettent d'obtenir la guérison. Ces traites s'effectuent à la main et sont parfois facilitées par l'administration d'ocytocine. L'application de pommades décongestionnantes ou antiphlogistiques sur la mamelle permettrait de diminuer l'inflammation locale et de résorber les indurations. La traite fréquente constitue une démarche logique pour traiter une mammite. Son rôle est de

renouveler les leucocytes présents dans la glande mammaire. En effet, après quelques heures dans du lait, les PMN et les macrophages perdent toute activité phagocytaire suite à l'ingestion de protéines et de matière grasse. La traite permet d'éliminer ces leucocytes et de les remplacer par une population nouvelle et donc beaucoup plus efficace pour lutter contre l'infection. A noter que la stimulation des trayons est indispensable pour cet afflux. Il ne faut donc pas vider le quartier au moyen d'une canule. Il n'est pas nécessaire non plus de vider totalement le quartier. Retirer quelques centaines de ml est déjà très bénéfique, au contraire des pratiques actuelles où l'éleveur fait beaucoup de surtraite (et donc de lésions au trayons) en voulant absolument «vider» le quartier. On veillera à ne pas expulser le lait dans la litière sur laquelle la vache serait amenée à se coucher (Faroult et Seryes, 2005).

1.8.4. Antibiotiques :

1.8.4.1. Plans d'antibiothérapie :

Le plan de traitement proposé par le vétérinaire praticien se base sur le modèle épidémiologique du troupeau établi à partir des documents de l'élevage et d'un sondage bactériologique. Il permet de choisir l'antibiotique à privilégier en première intention, excepté pour les mammites cliniques accompagnées de signes généraux où la gravité de la situation autorise l'utilisation d'antibiothérapie large spectre en première intention quelque soit le modèle épidémiologique du troupeau (Angoujard, 2015).

Il existe 3 types de préparations antibiotiques intra-mammaires dans le commerce :

- * **AR** = action rapide. Ces traitements sont en général administrés en cas de mammite aiguë en lactation. Les délais d'attente pour le lait et la viande sont alors peu importants (respectivement 4 à 6 traites et 0 à 7 jours).
- * **LA** = longue action. Ces traitements sont indiqués en cas de mammite chronique en lactation. Les délais d'attente pour le lait et la viande sont légèrement plus importants que pour les traitements AR (respectivement 7 à 10 traites et 0 à 7 jours).
- * **HL** = hors lactation. Ces traitements sont destinés aux mammites subcliniques ou chroniques encore en cours ou au moment du tarissement. Les délais d'attente pour le lait et la viande sont alors plus élevés (respectivement 15 à 30 jours après l'administration en cas de vêlage prématuré et 28 jours) (Gerault, 2014).

1.8.4.1.1. Plan de traitement des mammites cliniques en lactation en première intention:**➤Antibiothérapie des mammites cliniques accompagnées de signes généraux en première intention:**

Le traitement des mammites cliniques accompagnées de signes généraux débute par la gestion du choc *via* la fluidothérapie, la correction des troubles électrolytiques éventuels et l'administration d'un anti-inflammatoire (AINS de préférence). Le traitement antibiotique se fait par voie diathélique (= intra-mammaire) avec un spectre large Gram – et Gram +, et générale pour lutter contre les infections secondaires à la bactériémie. Les mammites cliniques avec signes généraux nécessitent un traitement de première intention le plus efficace possible afin d'éviter l'évolution vers la septicémie et la mort de l'animal.

Pour l'antibiotique par voie diathélique, **Bosquet *et al.*, 2013** recommandent une association large spectre Gram + et Gram – de type β -lactamine – aminoside, amoxicilline – acide clavulanique ou bacitracine – néomycine. Le traitement par voie générale cible les Gram – afin de lutter contre les conséquences de la bactériémie avec des fluoroquinolones, du sulfamide – triméthoprim, des aminosides ou de la colistine (**Bosquet *et al.*, 2013**).

Lago *et al.*, (2011a et 2001b) recommandent l'utilisation d'antibiotiques ciblés en cas de mammites cliniques de grade 1 à 2 dues à des bactéries Gram + et un traitement symptomatique seul pour les mammites dues à des bactéries Gram -.

➤Antibiothérapie des mammites cliniques non accompagnées de signes généraux en première intention :

Les mammites cliniques non accompagnées de signes généraux sont souvent des infections récentes et de localisation parenchymateuse superficielle. **Bosquet *et al.*, 2013** recommandent l'utilisation de la voie diathélique en première intention. La voie générale est justifiée seulement lors de congestion importante du quartier, qui restreint la bonne diffusion de l'antibiotique intra- mammaire ou lors de mammite subclinique précédemment détectée qui devient clinique.

Le choix des antibiotiques se fait sur la base du modèle épidémiologique et des bactéries suspectées (**Tableau N°09**). Lorsque les bactéries Gram – sont majoritairement suspectées, **Bosquet *et al.*, 2013** privilégient les associations d'antibiotiques pour obtenir un large spectre d'action telle l'association bacitracine - néomycine. Le choix d'antibiotiques est le même lorsque le modèle épidémiologique est mixte ou indéterminé. En cas de suspicion principale de bactéries Gram +, les antibiotiques sont ciblés avec un spectre d'action principalement Gram +.

Tableau N°09: Traitement antibiotique des mammites cliniques sans signes généraux en première intention (d'après **Bosquet et al., 2013**)

Modèle épidémiologique	Mixte, indéterminé	Environnemental		Contagieux	
		> 20 % de Gram -	< 20 % de Gram -	< 20 % de SCP+	> 20 % de SCP +
Spectre d'activité	Large Gram + et Gram -	Restreint Streptocoques et SCP -		Gram + (Streptocoques, SCP + et SCP -)	
Voie d'administration	Diathélique (+ générale si congestion, ancienneté)				
Choix des antibiotiques par voie diathélique	β -lactamine – aminoside, amoxicilline – acide clavulanique, bacitracine – néomycine	β -lactamines (benzylpénicilline, pénéthamate)		Pénicilline M, Céphalosporines de 1ère et 2ème génération, Lincosamides	
Choix des antibiotiques par voie générale	Macrolides, β -lactamines (pénéthamate)	β -lactamines (pénéthamate)		Macrolides	

1.8.4.1.2. Antibiothérapie des mammites subcliniques en lactation en première intention:

Le traitement des mammites subcliniques se fait au tarissement à de rares exceptions que nous précisons ci dessous durant la lactation. Le taux de guérison des mammites subcliniques durant la lactation est de 50 % en moyenne contre 70 à 80 % au tarissement (**Bosquet et al., 2013**). Le coût important de ce traitement en matière de médicaments et surtout de pertes de lait est un critère majeur de décision. Un traitement en lactation permet de diminuer les CCSI et la concentration en bactéries dans le lait. Le choix des animaux à traiter est restreint pour que l'opération soit rentable. Il s'agit de vaches en première ou deuxième lactation dans les 3 premiers mois de cette lactation et ayant un CCSI $\geq 1\ 500\ 000$ cell/mL sans lésions fibreuses du quartier (**Bosquet et al., 2013**).

Le traitement sera à base de prilimycine par voie diathélique contre les bactéries Gram +, à base de gentamicine et de cloxacilline par voie diathélique ou de pénéthamate par voie générale pour une action à large spectre. Un traitement de seconde intention serait trop coûteux (**Bosquet et al., 2013**).

►Échec de l'antibiothérapie de première intention:

L'échec du traitement de première intention correspond à plusieurs situations différentes et pour lesquelles la réalisation d'une bactériologie, afin d'identifier la bactérie responsable, est un atout majeur. En cas d'absence d'amélioration clinique dans les 48 heures, l'antibiotique de première intention a un défaut d'activité dû soit en raison de caractéristiques pharmacodynamiques inadaptées et/ou de résistance bactérienne soit parce qu'il ne correspond pas à la bactérie responsable qui est différente de celle suspectée.

Lors d'une absence de guérison complète à 5 jours post-traitement, l'antibiotique de première intention a probablement un défaut de pharmacocinétique (la concentration ou le temps de contact sont insuffisants) ou la bactérie responsable de la mammite n'est pas celle suspectée. En cas de réapparition des signes cliniques entre 5 et 21 jours, il s'agit également d'un défaut de pharmacocinétique de l'antibiotique mais les chances de guérison de l'animal sont beaucoup plus faibles (**Bosquet et al., 2013**).

1.8.4.1.3. Plans de traitement au tarissement :

Le traitement au tarissement a plusieurs objectifs : l'élimination des mammites subcliniques apparues pendant la lactation et la prévention des infections pendant la période sèche (**Bosquet et al., 2013**).

Le traitement au tarissement pourra être plus efficace qu'un traitement au cours de la lactation car on pourra utiliser une dose plus importante d'antibiotiques sans crainte de résidus dans le lait et le contact sera étroit et prolongé avec le germe du fait de l'involution mammaire et de l'absence d'effet chasse-lait (**Alexandre, 2005**).

Deux plans de traitement existent, l'antibiothérapie systématique et l'association d'une obturation du trayon systématique avec une antibiothérapie sélective. De nombreuses variantes de ces deux plans sont retrouvées sur le terrain (**Bosquet et al., 2013**).

L'antibiothérapie systématique consiste à traiter toutes les vaches au tarissement avec un antibiotique à spectre large. Elle est indiquée pour des élevages où la prévalence des mammites apparues au cours de la lactation est moyenne à élevée (plus de 20 % de CCSI > 300 000 cell/mL) et quand le risque de nouvelles infections pendant le tarissement est moyen à élevé (**Bosquet et al., 2013**).

Il s'effectue principalement par voie diathélique grâce à l'utilisation de seringues intramammaires (**Alexandre, 2005**), ou en association d'une antibiothérapie parentérale ce qui est bénéfique pour assainir la mamelle au tarissement, car l'arrêt de la vidange lactée, au moment du tarissement, permet aux antibiotiques administrés par voie injectable de

s'accumuler plusieurs jours à l'intérieur de la mamelle (**Clerentin, 2014**).

L'antibiotique utilisé doit avoir une concentration minimale inhibitrice (CMI) suffisante au cours des 2 dernières semaines avant le vêlage même s'il a été injecté au moment du tarissement (**Alexandre, 2005**).

La gamme de spécialité hors lactation est large, la plupart contient 1 à 2 principes actifs dont l'activité est essentiellement anti-gram+ (**Alexandre, 2005**).

L'association d'une obturation du trayon systématique avec une antibiothérapie sélective permet une baisse de l'utilisation des antibiotiques pendant le tarissement et la lactation suivante. Les obturateurs de trayon sont des pommades à injecter dans le canal du trayon de chaque quartier des vaches au moment de leur tarissement (**Clerentin, 2014**). Toutes les vaches auront une obturation du trayon mais seules les vaches infectées auront une antibiothérapie avec un spectre large. L'obturation du trayon réduit l'incidence des mammites lors de la contamination de la mamelle avant le vêlage et diminue la prévalence des mammites entre 0 et 5 jours après le vêlage (**Mcdougall et al., 2009b**).

Chapitre 2

Etude de l'espèce *Staphylococcus aureus*

2.1. Historique:

Ennemi intime et permanent depuis la nuit des temps, le Staphylocoque fut démasqué à la fin du XIX^e siècle. L'observation au microscope faisant apparaître des « amas de grains » dans le pus de furoncles.

Le Staphylocoque a été d'abord observé par Robert Koch en **1878 (Le loir et Gautier, 2009)**.

En **1880**, Alexander Ogston a fait état de l'isolement de *S. aureus* d'une infection chirurgicale des plaies. Les organismes ont pu produire un abcès lorsqu'ils ont été injectés à des cobayes et à des souris. Toujours en **1880**, Louis Pasteur a produit des abcès chez des animaux auxquels on avait injecté du pus provenant d'infections staphylococciques humaines (**Somerville, 2016**). La poursuite des travaux d'Ogston aboutit, en **1882**, à la description des staphylocoques (du grec « staphyle » pour grappe de raisin), par opposition aux streptocoques (coques en chaîne) précédemment décrits par Billroth en **1874 (Accarias, 2014)**.

En **1884**, Anton J. Rosenbach, chirurgien allemand, isola deux souches différentes de staphylocoques qu'il baptisa en fonction de la couleur des colonies obtenues : *S. aureus* (dorées) et *S. albus* (blanches) (**Accarias, 2014**). Ces désignations sont demeurées en vigueur jusqu'en **1939**, lorsque Cowan a différencié *S. epidermidis* en tant qu'espèce distincte sur la base de tests de coagulase (agglutination sur lame), et cela a été défini plus avant par des tests sérologiques en **1964 (Somerville, 2016)**.

Initialement, les staphylocoques furent classés au sein du genre *Micrococcus* (**Accarias, 2014**).

En **1965**, le système Baird-Parker a été introduit pour la classification des staphylocoques et des micrococques, dans lequel " les cocques Gram positif et catalase-positives sont mieux séparées en, le genre *Staphylococcus* et le genre *Micrococcus* sur la capacité des membres de *Staphylococcus* à se développer et à produire de l'acide à partir du glucose en anaérobiose" (**Somerville, 2016**).

Le genre *Staphylococcus* et le genre *Micrococcus* ont été regroupés au sein de la famille des *Micrococcaceae* (**Accarias, 2014**). Ceci est resté le schéma standard jusqu'en **1975**, lorsque Kloos et Sheffler ont proposé un schéma simplifié pour l'identification du *Staphylococcus*, qui est devenu la norme des laboratoires cliniques de microbiologie. La spéciation était basée sur le pigment, les exigences de croissance, l'activité fermentative et oxydative sur les glucides, la sensibilité à la novobiocine, les activités enzymatiques (nitrate -

réductase, phosphatase alcaline, arginine dihydro-lase, ornithine décarboxylase, uréase, cytochrome- oxydase, staphylocoagulase dans le plasma du lapin) (Somerville, 2016).

Un test élargi de spéciation a été adopté en 1999, qui comprenait la définition d'un Staphylocoque comme " coccus Gram positif qui forme des grappes, produit de la catalase, une paroi cellulaire appropriée et une teneur en G+C de 30-40 mol%. Comparé à celui des staphylocoques, le pourcentage en bases G+C de l'ADN des microcoques (63-73%), indique qu'il n'existe pas de relation entre les deux genres (Stephen et Hawkey, 2006).

Garrity *et al.*, 2002 ont proposé de radier le genre *Staphylococcus* de la famille des *Micrococcaceae* (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) grâce à l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques. Actuellement sa position taxonomique est bien définie il s'agit de la famille des *Staphylococcaceae* (Garrity *et al.*, 2002). Cette famille comporte les genres *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macrococcus*, ainsi que le plus important le genre *Staphylococcus* (Dworkin *et al.*, 2006).

2.2. Habitat :

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Sa niche écologique dominante est la partie antérieure du nez. Le taux de portage nasal chez les sujets sains varie entre 20% et 55% selon la population étudiée. Trois profils de portage nasal peuvent être distingués : environ 20% des sujets sains sont porteurs permanents, 60% sont des porteurs intermittents, et 20% ne sont pas porteurs. Ces profils peuvent changer dans le temps (Touaitia, 2016).

Ces capacités expliquent que ces bactéries soient aussi des commensaux occasionnels ou permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux qui semblent constituer le principal réservoir de ces germes, secondairement localisés dans la nature, vrai semblablement par les squames et les poils .

S.aureus possède des capacités d'adaptation et de résistance au stress importantes et il est capable de survivre dans un large éventail d'habitats environnementaux. La bactérie peut être isolée de façon sporadique dans le sol, l'eau douce, le sable de la plage, l'eau de mer, la surface des plantes. Concrètement, elle est largement présente dans les poussières dispersées dans l'air et les surfaces (Touaitia, 2016).

2.3. Position taxonomique :

Selon la 9^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC, comme suivant:

Règne : *Bacteria*

Division: *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *Staphylococcus aureus* (Prescott *et al.*, 2010).

À ce jour, cinquante espèces et sous-espèces ont été identifiées au sein du genre *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* est le plus connu et est fréquemment impliqué dans l'étiologie d'infections et de toxi-infections variées chez l'homme. D'autres espèces de Staphylocoques peuvent cependant causer des infections opportunistes. Ces infections, souvent nosocomiales, engagent parfois le pronostic vital et requièrent un traitement adapté (Le loir et Gautier, 2009).

2.4. Identification de l'espèce au sein du genre :

2.4.1. Caractères morphologiques :

A l'examen microscopique, *Staphylococcus aureus* se présente sous l'aspect de cocci sphériques de 1µm de diamètre, à coloration de Gram positive, immobile, non sporulé. La grande majorité des souches sont capsulées in vivo mais perdent progressivement leur capsule en culture, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'une pseudocapsule (Fauchere et Avril, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (Ananthanarayan et Paniker, 2006) (figure N°12).

La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues (Touaitia, 2016) .

En milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) (Le loire *et al.*, 2003). Examinés sur lames, après avoir été isolés d'une gélose, l'aspect en mosaïque est habituel.

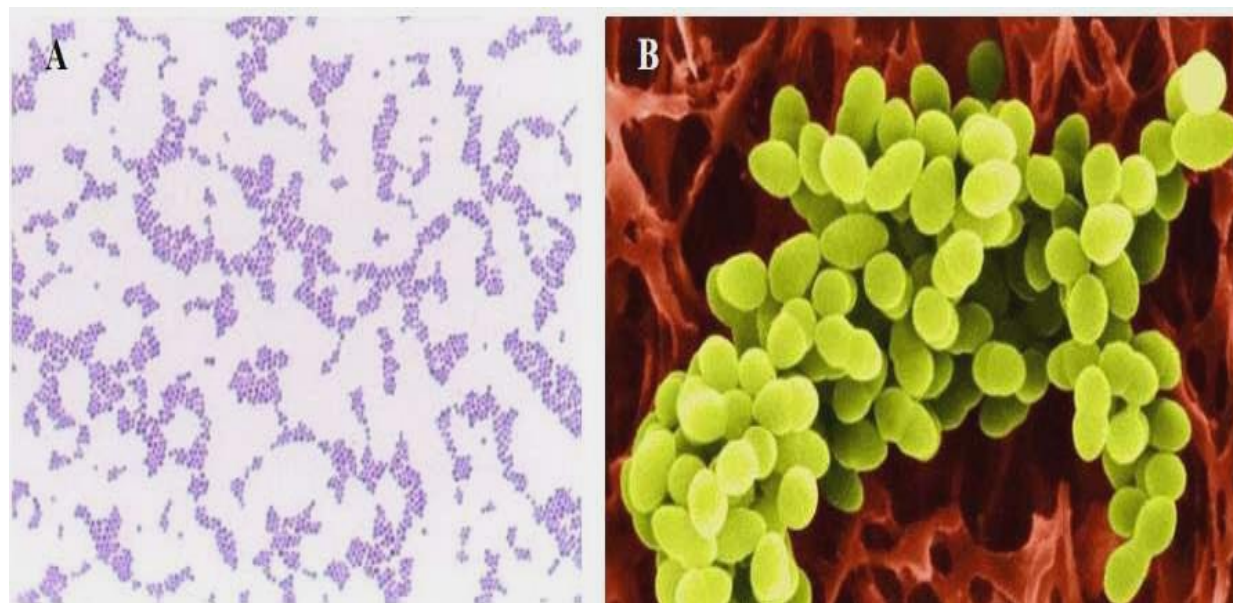


Figure N°12 : Aspect morphologique de *S.aureus* en microscopie optique (A) (X1000) et en microscopie électronique (B) (X15000) (El-Anzi, 2014).

2.4.2. Caractères culturels :

Staphylococcus aureus est un germe peu exigeant sur le plan nutritif et tolère de grandes variations (Guiraud et Rosec, 2004), se cultive facilement sur milieux usuels simples en aérobie comme anaérobie dans des températures de 7 °C à 48.5 °C avec un optimal de 30 °C à 37 °C et un pH de 4.2 à 9.3 avec un optimal de 7 à 7.5 (Le Loire et al., 2003 ; Bhatia et Zahoor, 2007 ; Di Giannatale et al., 2011). Il est capable de se multiplier dans des milieux contenant 5 à 10% de NaCl. Ces caractéristiques confèrent à *S. aureus* la capacité de coloniser une grande variété d'aliments (Bhatia et Zahoor, 2007).

En milieu liquide, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (Ananthanarayan et Paniker, 2006).

Sur milieux solides, Les colonies observées après 24 heures d'incubation sur gélose ordinaire sont larges (2-4 mm de diamètre) circulaires, légèrement bombées lisses, luisantes. La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou jaune orangé (Denis et al., 2007 ; Flandrois, 1997 ; Ananthanarayan et Paniker, 2006).

Sur gélose au sang, les souches typiques de *S. aureus* peuvent produire des colonies de grand diamètre que celles produites sur gélose nutritive et de couleur jaune doré, entourées

d'une hémolyse bêta (Couture, 1990 ; Denis *et al.*, 2007). *S. aureus* peut également être cultivé en milieu sélectif tel que : le milieu Chapman, milieu gélosé hypersalé (7.5 % de Na Cl) qui contient du mannitol, il permet une culture abondante de *S. aureus* après une incubation de 24-48 heures. Les colonies sont alors entourées d'un halo jaune puisqu'elles fermentent le mannitol.

La pousse sur ce milieu ne constitue qu'une indication puisque d'autres germes tel que les entérocoques ou les Proteus, peuvent cultiver dessus.

Par contre, en bactériologie alimentaire pour isoler et caractériser le staphylocoque, le milieu de Baird Parker est utilisé. Il est à base de téllurite de potassium et de jaune d'œuf. *S. aureus* s'y présente sous forme de colonies noires (réduction du tellurite) avec un halo clair autour (protéolyse) (Ananthanarayan et Paniker, 2006 ; Denis *et al.*, 2007).

2.4.3. Caractères biochimiques :

De nombreuses études ont permis de dresser des profils métaboliques pour la plupart des espèces de staphylocoques. Les principaux caractères biochimiques pris en compte sont la production de catalase, la capacité à métaboliser les sucres et la production d'arginine dihydrolase (ADH) (Le loir et Gautier, 2009).

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Le Minor and Veron, 1990).

La plupart des souches sont lipolytiques produisant une zone opaque lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux contenant le jaune d'œuf (Ananthanarayan et Paniker, 2006).

La paroi cellulaire des staphylocoques est résistante au lysozyme et sensible au lysostaphine, qui clive spécifiquement les ponts pentaglycine de *Staphylococcus* spp (Le loire *et al.*, 2003).

De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque.

S. aureus possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (Couture, 1990). Le métabolisme glucidique est particulièrement intéressant. La plupart des sucres sont fermentés; (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. Cependant, la production de pigments

(caractères culturels), d'hémolyse et la dégradation du mannitol n'ont pas toujours lieu; ce sont des indices auxquels on ne peut se fier pour identifier le germe de façon certaine. Il faut donc procéder à son identification par l'étude de différentes propriétés biologiques et biochimiques (Couture, 1990). Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase (Fauchere et Avril, 2002). Cependant, certaines souches de *S.aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (Couture, 1990).

2.5. Facteurs de virulence :

Cette bactérie est solidement armée pour effacer un certain nombre de défenses que son hôte pourrait lui opposer (anticorps, phagocytose ou cytotoxicité) (Gordon et Lowy, 2008).

Pratiquement toutes les souches de *Staphylococcus aureus* expriment de nombreux facteurs de virulence potentiels qui contribuent à la pathogénicité du germe, en produisant des enzymes et des cytotoxines (Todar, 2005) qui permettent en particulier de convertir les tissus locaux de l'hôte en nutriments nécessaires à la croissance bactérienne : il s'agit d'hémolysines, de nucléases, de protéases permettant une pénétration des tissus et une adhésion sélective, mais aussi des lipases, des hyaluronidases et des collagénases (Dinge et al., 2000 ; Nehal et al., 2010).

Certaines souches produisent une ou plusieurs exoprotéines : la toxine-1 du syndrome du choc toxique (TSST-1), des entérotoxines (SE), des toxines exfoliatives (ET) qui affectent les cellules du système immunitaire ou le TSST-1 et les entérotoxines staphylococciques sont considérées comme des toxines pyrogènes super antigènes (PTSAGs) (Dinges et al., 2000 ; Thomas et al., 2007).

La synthèse des facteurs de virulence chez *S.aureus* est biphasique. A la phase initiale de la croissance bactérienne, ce sont surtout les gènes codant pour des adhésines qui sont activés. Secondairement, les gènes des toxines prennent le relais. Cette activation séquentielle est sous la dépendance du système de régulation de la virulence appelé agr (accessory gene regulator) (Bronner et al., 2004; Dufour et al., 2002).

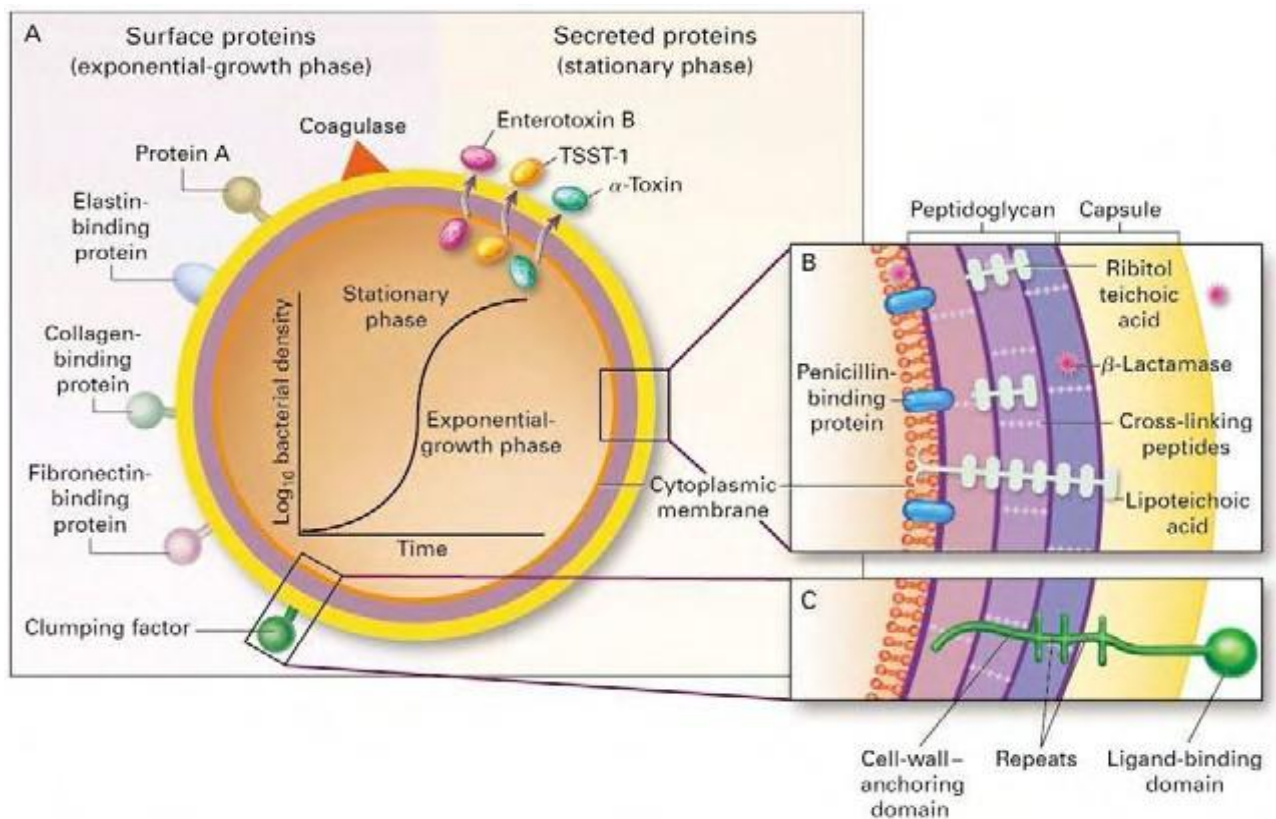


Figure N°13 : facteurs de virulence de *S. aureus* (Gordon *et al.*, 2008).

2.5.1. Protéines de surface (colonisation):

Pour qu'une bactérie colonise un tissu, il faut au préalable qu'elle y adhère. Cette étape est déterminante dans le développement ultérieur de l'infection. *S. aureus* colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire. *S. aureus* possède un grand nombre de protéines exposées à la surface de la bactérie et qui ont la capacité de se fixer sur des molécules de l'hôte. On parle d'adhésines. Un certain nombre de ces adhésines appartiennent à la famille des Microbial Surfacecomponent Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM) c'est-à-dire qu'elles reconnaissent les molécules de la matrice extracellulaire (Touaitia, 2016).

Les (MSCRAMM) qui sont en majorité ancrées aux peptidoglycanes de la paroi bactérienne, vont permettre la fixation de *S.aureus* aux cellules. La plupart des protéines de surface de *S.aureus* partagent une même structure, au moins en partie (El-Anzi, 2014). Plus d'une dizaine d'adhésines ont été identifiées, les mieux caractérisées sont :

➤La protéine A :

Elle est considérée comme une MSCRAMM car elle se lie au facteur de von Willebrand. Le facteur de von Willebrand est un peptide présent au niveau de l'endothélium lésé. Il s'agit d'une protéine (PM: 42 kDa, pI: 5.1) caractéristique de l'espèce *S. aureus*, constitutive de la paroi et insoluble à l'état natif. Elle est élaborée par plus de 90% des souches d'origine humaine (biotype A) (**Baggett et al., 2004**).

Les souches d'origine animale étant moins souvent productrices. Elle est absente chez les staphylocoques à coagulase négative, sauf chez certains qui possèdent une nucléase thermostable (**Sutra et Poutrel, 1994**).

La protéine A est produite lors de la phase exponentielle de croissance (**Koreen et al., 2004**). Elle se fixe sur le fragment Fc des immunoglobulines de classe G et M ce qui perturbe l'opsonisation et donc la phagocytose de la bactérie (**Falugi et al., 2013**). Elle a un rôle dans le phénomène d'agrégation bactérienne et favorise le développement de biofilms, renforçant ainsi l'adhésion et la protection de la bactérie face à l'action des agents antimicrobiens produits par les cellules immunitaires (**Merino et al., 2009**).

En plus de son aptitude à réagir avec les IgG, la protéine A possède plusieurs propriétés biologiques et semble intervenir dans le pouvoir pathogène; elle interfère avec le système immunitaire; active le complément par la voie classique et déclenche la réaction de phagocytose, elle est mitogène et cytotoxique (**Schlievert et al., 2010**).

➤Les protéines de liaison au fibrinogène:

En plus de la coagulase " libre ", on retrouve une coagulase insoluble " liée ", à la surface des bactéries. Elle est appelée clumping factor, diffusible dans le milieu après autolyse (**Bronner et al., 2004**). C'est une protéine de surface, très riche en lysine (PM de 21 kDa) (**Francois et al., 1997**).

Il existe deux Clf ; ClfA et ClfB codés par deux gènes distincts et reconnaissant deux régions différentes du fibrinogène.

Contrairement à ce que son nom semble indiquer, elle est dépourvue d'activité enzymatique. Sa structure, complémentaire de celle du fibrinogène, lui permet d'interagir directement avec lui ou avec des monomères de fibrine. Ainsi, elle inhibe la phagocytose par les neutrophiles en formant à la surface de *S. aureus* une couche protectrice de fibrinogène, empêchant la reconnaissance du pathogène, même opsonisé (**Ko et al., 2013**). Ce facteur d'affinité pour le fibrinogène peut être mis en évidence par contact de la souche à étudier avec les hématies de moutons ou de particules de latex recouvertes de fibrinogène. Une agglutination apparaît en quelques secondes et est retrouvée chez 98% des souches de *S.*

aureus. Cette adhésine joue un rôle dans les infections des plaies et les infections sur corps étranger. Il semble que le ClfB soit fortement impliqué dans la colonisation nasale (**Bronner et al., 2004**).

➤ **La protéine de liaison à la fibronectine :**

La fibronectine est une glyco-protéine dimérique qui sert notamment à ancrer les cellules des tissus dans la matrice extracellulaire. Cette protéine contribue à l'adhérence de *S. aureus* aux caillots plasmatiques mais aussi aux biomatériaux ayant un contact prolongé avec le sang. Elle joue un rôle très important dans l'initialisation des infections sur corps étrangers. Elle serait impliquée dans les phénomènes d'internalisation du staphylocoque dans la cellule endothéliale, cette étape prenant part à la physiopathologie des endocardites infectieuses à *S. aureus*. La Fibronectine Permet au staphylocoque de s'accrocher à nos cellules sous-endothéliales, soit à la membrane basale des vaisseaux sanguins (**Batard et al., 2007**).

La FnBPA est une protéine de 108 kDa composée de 982 acides aminés. Le récepteur FnBPA s'attache simultanément à plusieurs sites de la partie amino-terminale de la fibronectine et acquiert une structure secondaire constituant les épitopes de liaison. La FnBPB possède 45% d'homologie avec FnBPA dans sa partie N terminale et plus de 95% d'homologie dans les domaines C, D (domaines de liaison à la fibronectine), W et M. Grâce à ces protéines, *S.aureus* se lie à la fibronectine avec une très forte affinité et de façon quasiment irréversible.

L'implication des FnBPs dans l'adhérence et l'internalisation de *S.aureus* dans des cellules épithéliales en culture primaire a été confirmée par Sinha et al (**El-Anzi, 2014**).

➤ **La protéine de liaison au collagène :**

L'attachement au collagène est nécessaire et suffisant pour l'adhésion de *S. aureus* au cartilage in vitro. Ce récepteur du collagène pourrait constituer un facteur de virulence important dans les infections osseuses et articulaires à *S. aureus* (**Buckingham et al., 2004**).

L'interaction avec le collagène favorise l'attachement de la bactérie aux tissus endommagés où la couche sous-jacente a été exposée (**Accarias, 2014**).

➤ **La protéine de liaison à l'élastine(EbpS) :**

La protéine de liaison à l'élastine de *S.aureus* (EbpS) est une protéine de 25 kDa associée à la surface cellulaire. C'est une protéine transmembranaire intégrale contrairement aux autres protéines de surfaces qui sont ancrées aux peptidoglycanes via leur motif LPXTG (**Downer et al., 2002**). Elle se lie à la région N terminale de l'élastine qui est une région toujours libre.

2.5.2. Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose:

➤La capsule :

Des polysaccharides capsulaires sont trouvés chez 90 % des souches. Onze types capsulaires ont été décrits et les types 5 et 8 sont les plus fréquents en pathologie humaine. La majorité des staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (SARM) appartiennent au type 5.

La capsule permet une meilleure résistance des souches à l'opsonisation et à la phagocytose (**Baggett et al., 2004**). Elle facilite aussi l'adhérence de *S. aureus* aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes. Dans ce cas, elle induit la sécrétion par ces cellules de cytokines inflammatoires telles qu'IL-1 β , IL6, TNF α et IFN γ et la chimiokine IL-8 (**Accarias, 2014**).

Certaines souches produisent un exo polysaccharide (glycocalix) qui entraîne la formation d'un biofilm, engluant les bactéries et constituant ainsi une forme de résistance au site de colonisation. Il existe 14 sérotypes mis en évidence par réaction d'agglutination au moyen d'immunsérums (**Baggett et al., 2004**).

La capsule polysaccharidique est exprimée durant la phase de croissance post exponentielle (**O'riordan et Lee, 2004**). Les souches de *S. aureus* isolées d'infections expriment des niveaux élevés du polysaccharide, mais perdent rapidement la capacité lorsqu'elles sont cultivées en laboratoire (**Chaalal, 2013**).

➤La paroi :

Elle est formée du peptidoglycane, des acides teichoïques et lipoteichoïques (**Figure N°14**).

➤Le peptidoglycane :

Le peptidoglycane est immunogène et mitogène. Il a une activité chimiotactique sur les neutrophiles en stimulant l'activation de la cascade du complément. Il stimule la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 IL8, CCL2, CCL3, CCL4) par les monocytes et les macrophages. Bien que le peptidoglycane seul entraîne une faible induction de l'expression de cytokines, il a un effet synergique avec les acides téichoïques (**Accarias, 2014**).

➤Les acides téichoïques (TA) :

Les acides teichoïques sont des polymères linéaires du ribitol phosphate, liés de façon covalente au peptidoglycane, et représentent les constituants principaux de la paroi (**Baggett et al., 2004**). Ce sont les WTA pour « wall teichoic acids ». Le WTA de *S. aureus* est impliqué dans la forme cellulaire, la division cellulaire, l'adhésion cellulaire, la formation de biofilm et la pathogénicité. De plus, il confère une résistance aux β -lactames dans les souches résistantes

à la méticilline. Par ailleurs, sa structure semble gouverner le THG puisque *S. aureus* échange plus efficacement de l'ADN avec une bactérie possédant un WTA de structure similaire et ce, même si elle appartient à un autre genre. Au vu de son importance dans la biologie de *S. aureus*, le WTA est aujourd'hui considéré comme une cible potentielle pour de nouveaux antibiotiques (Accarias, 2014).

► **Les acides lipoteichoïques :**

Les acides lipoteichoïques sont des polymères de glycérol phosphate avec un glycolipide terminal ancré à la membrane cytoplasmique (Baggett *et al.*, 2004). Le LTA de *S. aureus* provoque une réponse inflammatoire en induisant la sécrétion de cytokines et chimiokines (TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-8, LTB₄, C5a, MCP-1, MIP1 α et GCSF) par les phagocytes mononucléés. Le profil cytokinique induit par le LTA est similaire à celui produit par la bactérie entière. Le LTA participant ainsi à la formation de pus en recrutant les neutrophiles via les chimiokines (Accarias, 2014).

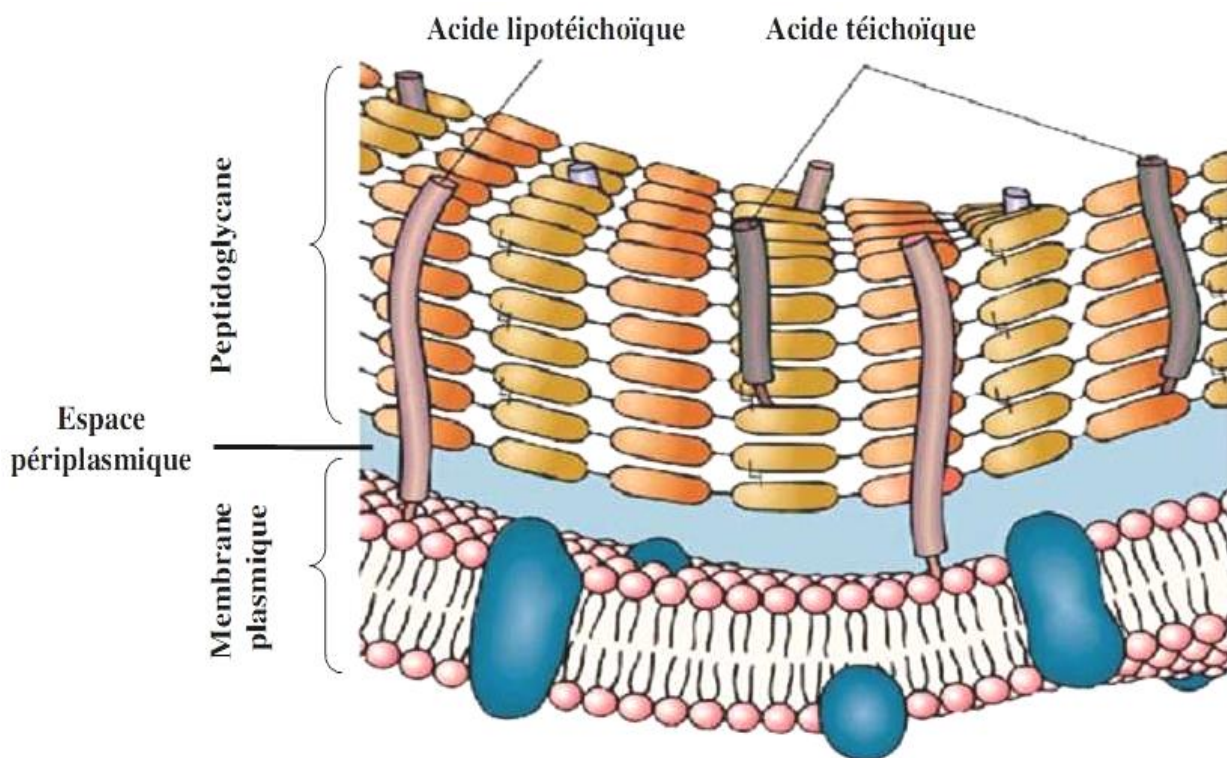


Figure N°14: Ultra structure de la paroi bactérienne de *S.aureus* (El Anzi, 2014).

2.5.3. Facteurs conduisant à l'extension de l'infection:

2.5.3.1. Toxines staphylococciques :

S. aureus produit plusieurs toxines ayant pour cible les membranes cellulaires. Ces toxines se fixent à des cellules cibles et provoquent la formation de canaux membranaires laissant passer les ions (pore-forming toxins). On peut citer les hémolysines et les toxines synergohymenotropes.

➤ Les hémolysines :

Quatre hémolysines différentes ont été identifiées, elles diffèrent par leur mécanisme d'action et leur spécificité d'action sur les hématies (humaines et animales) (Touaitia, 2016).

-L'alpha-hémolysine ou alpha-toxines :

L' α -hémolysine est une toxine cytolytique produite par plus de 90% des souches de *S. aureus* (Tavares *et al.*, 2014). Son gène de structure est cloné et la séquence d'acide aminé est connue. La toxine est inactivée à 60°C et réactivée à 100°C (effet Arrhénius) (Davido, 2010). Elle est particulièrement active sur les érythrocytes de lapin (Dinges *et al.*, 2000).

C'est un des facteurs de virulence majeurs de *S. aureus* et un des mieux caractérisés. C'est une protéine thermostable et antigénique, exprimée lors de la phase exponentielle de croissance. Cette α -toxine a la capacité de former des pores dans les membranes cellulaires de l'hôte. Pour ce faire, elle se lie tout d'abord à son récepteur à la surface de la cellule cible, la molécule ADAM10 (Wilke et Bubeck-Wardenburg, 2010). Puis, elle s'insère dans la membrane plasmique où elle s'oligomérisse sous forme d'heptamères cylindriques. Les canaux amphipatiques ainsi formés induisent une entrée de diverses molécules de faible poids moléculaire et notamment d'ions calcium, second messager important impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires chez les mammifères. Majoritairement, ce phénomène conduit à la lyse cellulaire. En contexte d'intoxication sub-lytique, des études ont mis en évidence une réponse de la cellule cible consistant notamment en l'altération des voies de signalisation cellulaires responsables de la prolifération cellulaire, de la réponse inflammatoire, de la sécrétion de cytokines et des interactions cellulaires. Lors de l'infection, l'effet cytolytique est un facteur primordial dans la progression de la maladie puisqu'il induit une altération des tissus en exerçant une action dermonécrotique mais aussi neurotoxique (Accarias, 2014).

- β -hémolysine :

La bêta-hémolysine est thermolabile possédant une activité de sphingomyélinase qui altère les membranes riches en lipides. Elle est produite en grande quantité par de nombreuses souches de *S. aureus* (Fanny *et al.*, 2008). Elle possède un haut niveau d'expression chez les souches animales, la majorité des isolats humains de *S. aureus* n'expriment pas de β -toxine. (Todar, 2005).

Glenny et Stevens, qui l'ont identifiée en 1935, ont montré qu'elle était hautement hémolytique pour les érythrocytes de mouton mais pas de lapin.

Son activité hémolytique sur les érythrocytes dépend de leur contenu en sphingomyéline (Accarias, 2014). Son activité hémolytique est remarquable par les conditions d'apparition, car elle est de type "chaud-froid": les érythrocytes soumis à son action à 37°C ne sont pas lysés sauf si on les refroidit à 4°C (Gras, 2006).

Elle a aussi un rôle dans la colonisation de la peau par sa capacité à endommager les kératinocytes (Katayama *et al.*, 2013).

-Gamma-hémolysine ou gamma-toxine :

Elle est antigénique chez l'homme, et est formée de deux constituants I et II agissant en synergie. Elle est active sur les hématies de lapin, de mouton, de l'homme mais inactive sur les hématies de cheval. Elle est cependant inhibée par l'agar, certains polymères sulfatés, le cholestérol et bien d'autres lipides. (Merlet, 2010)

Produite par 30 % des souches hospitalières de *S. aureus*, elle possède un spectre d'activité assez large de part son action sur les lymphocytes T, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages (Gravet *et al.*, 2001).

-Delta-hémolysine ou delta-toxine :

La delta-toxine est faiblement antigénique (Vincenot *et al.*, 2008). Il s'agit d'un petit peptide d'environ 3 kDa, constitué de 26 acides aminés. Elle forme une hélice alpha avec un domaine hydrophobe d'un côté et un domaine hydrophile à son opposé. Elle est synthétisée par 97% des souches de *S. aureus* en phase stationnaire de croissance. Ce peptide est capable de lyser différentes cellules dont les érythrocytes ainsi que des structures subcellulaires telles que les organelles et les protoplastes mais son activité est inhibée par la présence de phospholipides (Loulergue et Turrett, 2003). Elle exerce un effet pro-inflammatoire en raison de sa spécificité de liaison pour les neutrophiles et les monocytes (Schmitz *et al.*, 1997).

►Leucocidine de Panton-Valentine (PVL) :

La PVL fait partie d'une famille de toxines synergohyménotropes. Ce sont des protéines à deux composants non associés mais agissant en synergie sur les membranes cellulaires. Ces toxines ont des cellules cibles (polynucléaires, monocytes, macrophages) sur lesquelles elles se fixent et provoquent la formation de canaux membranaires laissant passer les cations divalents.

La PVL, constituée d'un composant de classe S pour « Slow eluted » (LukS-PV) et d'un composant de classe F pour « Fast eluted » (LukF-PV) est leucotoxique et dermonécrotique. Le locus codant pour la production de PVL est porté par un phage et n'est retrouvé que dans un nombre restreint de souches de *S.aureus* en France (2 à 5 %) alors qu'en Afrique 30 % des souches produisent cette toxine (**Batard et al., 2007**).

2.5.3.2. Super antigènes :

En situation normale les lymphocytes T4 (LT4) reconnaissent les antigènes présentés à la surface d'une membrane cellulaire présentatrice d'antigène via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, puis forment un complexe tri-moléculaire activant la cascade des LT4 (complexe TCR des LT4+antigène+CMH II). Un super antigène est une protéine bactérienne capable d'activer le CMH du macrophage et la chaîne V-béta du récepteur des LT4 (TCR).

Le *S. aureus* est capable de produire plus d'une trentaine de superantigènes, comprenant entre autres des entérotoxines. Cette interaction entre le super antigène et le domaine Vbéta du LT4 ne permet plus une réponse spécifique, et est à l'origine de l'expansion de mille fois plus de LT4, responsable de la stimulation massive et indistincte du système immunitaire. Des cytokines (TNF α , IL-1) sont ainsi produites en trop grande quantité, induisant une réponse inflammatoire incontrôlée pouvant aboutir à un état de choc vasoplégique (**Schlievert et Case ,2007**).

►Entérotoxines :

Les entérotoxines staphylococciques sont de potentiels agents d'intoxication alimentaire suite à la consommation d'aliments contaminés (elles sont émétisantes, avec ou sans diarrhée). Elles sont thermostables, résistants aux enzymes protéolytiques et assez stables sur une large gamme de pH (**Bendahou et al., 2009 ; Di Giannatal et al., 2011**).

Neuf types antigéniques majeurs ont été reconnus et désignés ; A, B, C, D, E, G, H, I et J (**Zhang et al., 1998**). Toutes ces toxines présentent une

activité superantigéniques (**Balaban et Rasooly, 2000 ;Nehal et al., 2010**).Parmi les super antigènes seule les entérotoxines ont une activité émétique.

Les propriétés biologiques des entérotoxines peuvent rester inchangés après pasteurisation (**Asao et al., 2003 ; Holecková et al., 2004**). Selon **Anderson et al., 1996**, l'entérotoxine A (SEA), par exemple, réserve certaines de ses activités biologiques après 28 min à 121°C.

L'entérotoxine A pourrait par ailleurs augmenter le risque de choc septique. Ces propriétés superantigéniques seraient également impliquées dans la chronicisation du portage et de l'infection par *S. aureus* par une diminution de la réponse anticorps et de la capacité du macrophage à détruire les bactéries internalisées et dans certaines vascularites associées à *S. aureus*, tel que le syndrome de Kawasaki de l'enfant.L'entérotoxine B produit une intoxication alimentaire. Cette toxine garde son activité même après avoir bouilli durant 30 minutes et résiste aux enzymes de l'estomac et du jéjunum. Ces toxines agissent directement sur les récepteurs neuronaux du système gastro intestinal, conduisant ainsi à une stimulation des centres du cerveau responsables des vomissements et de la diarrhée. Dans ce cas-ci, c'est la toxine qui est dangereuse et non le staphylocoque comme tel qui est dangereux (**Touaitia, 2016**).

►Toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1):

La toxine TSST-1 a été reconnue comme la cause majeure du syndrome de choc toxique staphylococcique, caractérisé par une fièvre, une hypotension, desquamation. La TSST-1 est une protéine extracellulaire à unique chaîne appartenant à une grande famille d'exotoxine pyrogènes (**Nagase et al., 2002**). TSST-1 est la seule des PTSAgs à pouvoir traverser les membranes muqueuses (**Hamad et al., 1997**).Elle est produite par un nombre limité de souches de *S.aureus* (environ 15 à 20%) (**Gras, 2006**).

La TSST-1 agit comme un super antigène. Une fois dans le sang, elle va induire une forte réponse inflammatoire conduisant notamment à la libération de grande quantité de TNF α , conduisant au syndrome de choc toxique (**Accarias, 2014**).

►Exfoliatines :

Certaines souches de *S. aureus* (environ 5%) secrètent une toxine à tropisme cutané: la toxine épidermolytique ou exfoliatine. Bien que sa découverte soit récente, cette toxine est avec l'entérotoxine, l'une des plus intéressantes par la spécificité de son action sur la peau et son rôle pathogène indiscutable.On distingue deux sérotypes différents sur les plans biologique et sérologique: exfoliatine A, la plus fréquente et exfoliatine B. Le sérotype A est thermostable, codée par un gène chromosomique (90% des exfoliatines). Le sérotype B est

thermolabile et d'origine plasmidique (4 à 5% des exfoliatines), les deux sérotypes peuvent être produits par une même souche (Aouati, 2009).

Elles sont responsables d'érythème et de clivage de l'épiderme, causant l'épidermolyse bulleuse staphylococcique (A et B responsables d'infections néonatales : syndrome de Ritter, impétigo bulleux).

Les exfoliatines A et B ont pour cible la desmogléine-1. Cette glycoprotéine du desmosome est impliquée dans l'adhésion intercellulaire au sein du derme superficiel. Le clivage de la desmogléine-1 par les toxines exfoliatives interrompt les ponts intercellulaires, aboutissant à la formation de bulles. Les pathologies associées à cette toxine sont la nécrolyse épidermique staphylococcique généralisée (appelée également en pédiatrie syndrome des enfants ébouillantés) et l'impétigo bulleux (Batard *et al.*, 2007). L'exfoliatine n'agit spécifiquement que sur les cellules de certaines espèces: homme, singe, souris et hamster (Aouati, 2009).

2.5.3.3. Les enzymes :

➤La Coagulase libre :

La coagulase libre, ou staphylocoagulase, est une protéine diffusible thermostable exprimée pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne (Cheng *et al.*, 2010). C'est un marqueur classique de l'identification de *S. aureus* (Baggett *et al.*, 2004) à l'exception de certaines souches staphylococciques d'origine animale telles que *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, et *Staphylococcus delphini* qui possèdent également la coagulase (Langlet *et al.*, 1999). La coagulase forme avec la prothrombine (coagulase-reacting factor : CRF) du plasma, un complexe appelé Staphylothrombine qui converti le fibrinogène en fibrine (Peacock , 2006). C'est la base du test de la coagulase en tube (Baggett *et al.*, 2004). Cette réaction entraîne la coagulation locale du plasma autour des cocci les protégeant de la phagocytose. Elle est à l'origine de la thrombophlébite suppurée (Brenes *et al.*, 2012).

➤Hyaluronidase :

La hyaluronidase est une enzyme extracellulaire thermolabile qui digère l'acide hyaluronique. Cette dépolymérisation de l'acide hyaluronique, substance fondamentale de la matrice du tissu conjonctif de l'hôte, contribue au processus infectieux en favorisant la dissémination via la dégradation des tissus (Accarias, 2014). Elle peut être recherchée par viscosimétrie (Touaitia, 2016). Au sein du genre *Staphylococcus*, seule *S. aureus* possède cette enzyme (Hart *et al.*, 2009).

➤ Lactamases :

Les β -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type serine (classes A, C et D) ou métallo-enzymes (classe B) dont les substrats sont des β -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle β -lactame (Philippon et Arlet, 2006).

➤ Désoxyribonucléase thermostable :

Elle a une activité exo- et endo-nucléasique qui lui permet de dégrader l'ADN mais aussi l'ARN des cellules de l'hôte. Elle est active à pH alcalin en présence de calcium (Hu *et al.*, 2013). La désoxyribonucléase thermostable (thermonucléase) est produite par toutes les souches de *S. aureus*, ainsi que par environ 5% de souches de staphylocoques à coagulase négative, appartenant aux espèces ;*S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis* et *S. schleiferi*, alors que celle des autres espèces bactériennes est thermolabile. Ces nucléases interviennent dans la formation des lésions tissulaires (Avril, 2003).

➤ Les lipases :

Une des façons dans laquelle les cellules hôtes répondent à une infection est la production des acides gras et des lipides, qui forment des petits trous dans la membrane bactérienne, alors que *S. aureus* produit des enzymes appelées lipases qui détruisent ces acides gras avant de causer des dommages au niveau de la membrane bactérienne (Tally, 1999).

Les lipases sont un ensemble de protéines regroupant les lipases elles-mêmes, les phosphatases et les estérases. La lipase semble aussi avoir un rôle dans le prélèvement des nutriments dans l'environnement, dans la formation de biofilms et d'abcès, participant ainsi dans la pathogénicité de *S. aureus* (Hu *et al.*, 2012). Ainsi, des souris infectées avec une souche mutante pour la lipase ont un défaut dans la formation d'abcès et une moindre charge bactérienne dans différents organes comparés à la souche sauvage.

➤ Les protéases :

Les protéases retrouvées chez *S. aureus* regroupent les métalloprotéases, les thiols protéases et les sérines protéases. Parmi ces dernières, les mieux décrites sont les protéases glutamate dépendantes dont la protéase V8, ou glutamyl-endopeptidase qui clive les polypeptides préférentiellement après un glutamate mais aussi, plus rarement, après un aspartate (Accarias, 2014).

Initialement identifiée chez la souche *S. aureus* V8, il est maintenant établi qu'elle est exprimée par 67% des souches virulentes. Lors de l'infection, elle peut cliver certaines protéines de l'hôte comme les chaînes lourdes des Immunoglobulines, indépendamment de

leur classe ou l'inhibiteur de protéase $\alpha 1$, induisant une augmentation de l'activité protéolytique de l'hôte. Elle assure également la protection de *S. aureus* en clivant certains peptides antimicrobiens cationiques tels que la cathélicidine LL17 produite par les kératinocytes et les neutrophiles. Parallèlement, la protéase V8 agit également sur les protéines bactériennes elles-mêmes, notamment par clivage de la coagulase liée, entraînant une diminution de l'adhérence aux cellules hôtes et donc une meilleure dissémination. En terme de pathogénicité, il a été montré qu'un mutant *S. aureus* n'exprimant plus la protéase V8 présentait une virulence atténuée dans trois modèles murins d'infection différents (Accarias, 2014).

➤ **Catalase :**

La catalase convertit le peroxyde d'hydrogène produit par les neutrophiles en molécules d'eau et d'oxygène. Elle empêche ainsi la formation de radicaux oxygénés toxiques pour la bactérie et améliore ainsi sa survie dans le phagocyte (Accarias, 2014).

➤ **La fibrinolysine :**

La fibrinolysine, ou staphylokinase, est une protéine thermolabile et antigénique. Elle est capable de métaboliser le plasminogène en plasmine et ainsi induire la fibrinolyse (Mölkänen *et al.*, 2002). En conditions physiologiques, ce mécanisme est associé à celui de la coagulation pour éviter l'apparition de thromboses. Dans le cas d'une infection à *S. aureus*, la fibrinolysine perturbe cet équilibre en favorisant la fibrinolyse et entraîne des saignements. Parallèlement, la fibrinolysine possède la capacité de se lier aux défensines et de former un complexe avec celles-ci en inhibant leur activité bactéricide (Jin *et al.*, 2004).

Elle peut jouer un rôle dans la formation de microembolus suppurés responsables des métastases septiques (Flandrois, 1997 ; Jin *et al.*, 2003).

2.5.4. Facteurs de persistance :

S. aureus peut former des biofilms. Ce mode de croissance entraîne la diversification de la population bactérienne en favorisant l'apparition de variants (Savage *et al.*, 2013). Ces variants sont un état de dormance de la bactérie et jouent un rôle majeur dans la stabilité et la persistance des biofilms (Mirani *et al.*, 2014). Ces variants, ou small colony variants (SCVs) sont originaires de mutation dans les gènes métaboliques, tels que sigB et agr, et présentent ainsi une diminution de la pigmentation, une perte de l'activité hémolytique et de dissémination (Savage *et al.*, 2013). Ils peuvent faire partie du cycle normal de croissance de la bactérie ou être induit par des conditions de stress, telles que les antibiotiques, l'inanition et les peptides cationiques de l'hôte. Ces SCVs formés par *S. aureus* ont été liés aux infections

chroniques, récurrentes et résistantes aux antibiotiques (Proctor *et al.*, 2014). Ces SCV jouent donc un rôle majeur dans la persistance de la bactérie, en particulier dans les ostéomyélites, les infections associées aux corps étrangers (Sendi *et al.*, 2006) et les infections respiratoires dans les patients en fibrose kystique (Kahl *et al.*, 1998). Ils ont la capacité de survivre à l'intérieur des cellules hôtes, et notamment dans les cellules épithéliales et endothéliales (Schröder *et al.*, 2006). En effet, ils peuvent résister à l'activité bactéricide des lysosomes. De plus, ils sont moins sensibles à l'activité bactéricide des peptides antimicrobiens (Gläser *et al.*, 2014). Ainsi, les SCV de *S. aureus* permettent d'échapper aux défenses de l'immunité innée et de favoriser l'établissement et la persistance de l'infection.

2.6. Support génétique de la virulence :

Le génome de *S. aureus* se caractérise par sa complexité et sa plasticité. La comparaison des génomes séquencés et l'analyse par la technique des micropuces à ADN d'un échantillon représentatif des différentes lignées de *S. aureus* montrent qu'environ 75% du génome est hautement conservé (Lindsay et Holden, 2004). La majorité des gènes de ces régions conservées sont impliqués dans la réplication de l'ADN, la synthèse protéique, les fonctions métaboliques.

Un quart du génome est caractérisé par une variabilité génétique importante et les gènes de ces régions sont dévolus à des fonctions non essentielles à la croissance et à la survie. Ces régions variables sont composées d'éléments génétiques mobiles acquis par transferts horizontaux à partir d'autres souches de *S. aureus* et d'autres espèces bactériennes plus ou moins éloignées (Fitzgerald *et al.*, 2001). Ces éléments génétiques mobiles comprennent des génomes prophages, des transposons, des séquences d'insertion, des plasmides, des cassettes chromosomiques, des îlots de pathogénicité et des îlots génomiques (Lindsay et Holden, 2004). La plupart de ces éléments génétiques mobiles transportent des gènes de virulence ou des gènes de résistances aux antibiotiques (Iandolo *et al.*, 2002).

Il existe un très grand nombre de gènes liés à la virulence : au moins 40 gènes codant pour des toxines, 20 codant pour des facteurs d'adhésion et 44 régulant la transcription de produits associés à la virulence. Les gènes codant pour les toxines sont regroupés dans des îlots de pathogénicité qui sont des éléments génétiques mobiles (Kuroda *et al.*, 2001). Près de 75% des souches cliniques de *S. aureus* ont des gènes codant pour des toxines (Becker *et al.*, 2003).

2.7. Régulation des facteurs de virulence :

Deux grandes familles de régulateurs contrôlent l'expression des facteurs de virulence chez *S. aureus*. Ce sont les systèmes de régulation à deux composants, dont le mieux connu est le système agr (accessory gene regulator), et les homologues de SarA. D'une façon générale, le système agr peut être considéré pour *S. aureus* comme un stimulateur des exotoxines, et un inhibiteur des facteurs de colonisation et de formation des biofilms. Il induit l'expression d'exoprotéines en même temps qu'il réprime l'expression de protéines de surface. Les protéines de surface sont principalement synthétisées pendant la phase de croissance, et les exoprotéines pendant la phase stationnaire. Les différentes étapes de l'infection staphylococcique requièrent un panel différent de facteurs de virulence : la phase initiale d'infection demande la présence des protéines de surface pour pouvoir se lier à la matrice extracellulaire et permettre la colonisation du tissu, tandis que la sécrétion d'exoprotéines favorise la dissémination de l'infection (**Batard et al., 2007**).

Le système agr possède un polymorphisme génétique avec quatre groupes alléliques identifiés. Ce polymorphisme pourrait expliquer la diversité des infections entraînées par *S. aureus*. Par exemple, le système agr type IV est retrouvé dans les souches productrices d'exfoliatines alors que les souches produisant TSST-1 ont un système agr de type III (**Jarraud et al., 2002**).

2.8. Résistance de *S. aureus* aux antibiotiques :

2.8.1. Définition de l'antibiorésistance :

Plusieurs définitions ont été proposées pour l'antibiorésistance, elles dépendent du domaine dans lequel elle est étudiée (**Guillemot et al., 2006**).

En clinique, une souche bactérienne est dite résistante en cas d'échec thérapeutique avec l'antibiotique utilisé. Pour les pharmacologues, une souche est qualifiée de résistante si la concentration qu'elle atteint au niveau du site d'action est inférieure à la CMI. En microbiologie, une souche résistante est une souche qui dispose d'un mécanisme de résistance lui permettant d'augmenter sa CMI. Enfin, en épidémiologie, c'est la variation de la CMI d'une souche par rapport à celle de la population habituelle qui lui confère le statut de résistante.

C'est finalement à Chabbert que l'on doit la définition générale et synthétique de l'antibiorésistance suivante: «Une souche est dite résistante à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de tolérer des concentrations d'antibiotique nettement plus élevées que celles qui inhibent la croissance in vitro de la majorité des autres souches de la même espèce, dites sensibles» (**Guerin-Fauble, 2010**).

D'autre part, il convient également de distinguer les niveaux de résistance. On parle de résistances « à haut niveau » si l'augmentation relative de la CMI chez la souche considérée est importante et « à bas niveau » si elle est faible (**Guerin-Fauble, 2010**). Enfin, il est important de différencier le phénomène de résistance acquise, par acquisition de mécanismes non existants dans la population bactérienne normale, de celui de résistance naturelle d'une certaine bactérie à un antibiotique donné, qui est commune à toutes les souches bactériennes de l'espèce. Ce sont d'ailleurs ces résistances naturelles qui permettent la définition d'un spectre habituel d'action d'un antibiotique. Il existe aussi des résistances que l'on dit adaptatives, lorsque la CMI augmente suite à un premier contact avec l'antibiotique; elles disparaissent après le retrait de l'antibiotique et n'incluent pas de modifications génétiques de la souche (**Guillemot et al., 2006 ; Guerin-Fauble, 2010**).

C'est en comparant un ensemble de gènes vieux de 30 000 ans codant des résistances aux bêta-lactamines, aux tétracyclines et aux antibiotiques glycopeptidiques avec des gènes plus récents que des chercheurs ont pu mettre en évidence la similarité, la complexité et l'ancienneté des origines de ces mécanismes de résistances (**D'costa et al., 2011**). Il faut donc comprendre que la résistance est une réponse physiologique des bactéries à tout usage d'antibiotique, réponse liée à des « gènes de résistance » qui existaient bien avant la découverte et l'utilisation des antibiotiques (**AFSSA, 2006**).

2.8.2. Evolution de l'antibiorésistance de *S. aureus*:

2.8.2.1. Situation en médecine humaine :

Dans les années 1940, la pénicilline permit la guérison de patients atteints d'infections auparavant mortelles, signant le début de l'ère de l'antibiothérapie. Néanmoins, en 1942, apparut la première souche de *S. aureus* résistante à la pénicilline. De par leur nouvel avantage sélectif, ces souches résistantes sont rapidement devenues majoritaires, rendant la pénicilline inefficace contre près de 90% des souches de *S. aureus* (**Benhamou et al., 2005**).

Le développement de nouvelles molécules efficaces contre ces souches, telles que la méticilline, a alors permis de poursuivre la lutte contre *S. aureus*. Malheureusement, quelques années seulement suffirent pour voir émerger les premières souches résistantes à la méticilline, avec la première souche résistante isolée en 1961 (**Tremblay, 2008**). Le mécanisme de résistance envers la pénicilline puis la méticilline, mal compris à l'époque, est aujourd'hui élucidé. Ces souches possèdent des enzymes appelées bêtalactamases du fait de leur activité d'hydrolyse des noyaux bêta-lactames caractéristiques de la classe d'antibiotiques des bêta-lactamines à laquelle appartiennent la pénicilline et la méticilline

(Fuda *et al.*, 2005). Il existe aujourd'hui de nombreuses bêta-lactamases différentes, capables d'inhiber les effets d'une ou de plusieurs bêtalactamines, comme c'est le cas pour les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), récemment apparues.

Le phénomène de l'acquisition de nouvelles résistances par une souche donnée de *S. aureus* est quant à lui de plus en plus documenté. Sous la pression de sélection exercée par le traitement antibiotique, les bactéries peuvent acquérir de nouveaux gènes codant pour ces résistances (Lindsay, 2014 ; Scharn *et al.*, 2013) par transfert horizontal. Jusqu'à présent, les mécanismes à l'origine de l'acquisition de nouveaux gènes par les staphylocoques étaient inconnus. Cependant, il a récemment été démontré que l'activation d'un gène de *S. aureus*, appelé sigH, codant pour un facteur sigma alternatif, permet à ce dernier, dans certaines conditions, de mettre en route une machinerie spécialisée lui permettant de capturer l'ADN présent dans son environnement, et donc potentiellement d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques (Morikawa, 2012). Les auteurs concluent que l'inhibition du gène sigH serait une piste sérieuse pour lutter contre l'apparition de souches de *S. aureus* multi-résistantes aux antibiotiques.

Concernant plus particulièrement la résistance à la pénicilline, problème majeur de santé publique à l'heure actuelle, elle est le fruit du gène *mecA*, localisé sur la cassette chromosomale staphylococcique (SCC) et qui code pour des protéines de liaison à la pénicilline (PLPs) modifiées (Chamberset DeLeo, 2009). Les souches résistantes à la pénicilline (SARM) sont résistantes à l'ensemble des bêta-lactamines mais aussi souvent à d'autres classes d'antibiotiques telles que les aminoglycosides et les fluoroquinolones, améliorant leur fitness et restreignant les possibilités de traitement.

Les souches de SARM sont néanmoins encore sensibles à certaines molécules telles que la rifampicine, l'acide fusidique, les glycopeptides et certains aminosides. La rifampicine et l'acide fusidique sont souvent utilisés en combinaison car utilisées seules, ces molécules doivent être utilisées à plus forte dose et exercent donc une forte pression de sélection sur les souches bactériennes risquant d'entraîner l'apparition de résistances (Benhamou *et al.*, 2005).

Les aminosides et les glycopeptides, souvent utilisés en association, ont une action néphrotoxique sur l'organisme. Ils sont donc utilisés pour des traitements de courte durée, et notamment pour les infections endovasculaires (Garau *et al.*, 2009). En effet, la combinaison de ces 2 molécules permet de diminuer rapidement la bactériémie et montre des résultats cliniques rapides comparés à un traitement avec une seule molécule dans ces infections.

Jusqu'à maintenant, la vancomycine, un glycopeptide, restait le traitement de choix pour les infections sévères à SARM. Mais l'émergence récente de souches résistantes à la vancomycine limite de nouveau les alternatives thérapeutiques. Les dernières molécules utilisées contre *S. aureus* sont la daptomycine et le linézolide, mais leur utilisation reste limitée et coûteuse et des souches résistantes ont déjà été reportées (Nannini *et al.*, 2010).

En conclusion, le choix de l'antibiothérapie doit être réfléchi en fonction de la souche en cause, de la localisation et de la gravité de l'infection, du niveau d'immunocompétence et d'éventuelles allergies du patient.

2.8.2.2. Situation en médecine vétérinaire :

Tout comme en médecine humaine, l'utilisation d'antimicrobiens en médecine vétérinaire peut contribuer au développement de la résistance chez les bactéries (Lowy, 2003). Ce phénomène est d'autant plus inquiétant lorsqu'il touche des bactéries d'origine animale transmissibles à l'humain. Durant les 50 dernières années, plus de 50% de la masse totale d'antibiotiques utilisés provenait des pratiques vétérinaires et de l'agriculture.

L'utilisation d'antibiotiques à doses suboptimales comme promoteur de croissance et l'usage massif en prophylaxie ont contribué à la mauvaise perception que l'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire participait à l'émergence de l'antibiorésistance. De plus, puisque de nombreux antibiotiques sont utilisés en médecine humaine et en médecine vétérinaire, cela ne fait que renforcer l'hypothèse de l'implication de la médecine vétérinaire dans ce phénomène d'antibiorésistance (Teuber, 2001). Une des voies de dissémination des résistances consiste en des contacts rapprochés entre animaux et humains (Madec *et al.*, 2012).

La première description d'une résistance à la méticilline chez une souche de *S. aureus* animale remonte à 1972, isolée en Belgique d'une infection mammaire bovine. Depuis, d'autres souches de SARM ont été décrites dans l'espèce bovine au Pakistan (2004), en Corée (2007), en Hongrie (2007) ou aux Pays-Bas (2008) pour les plus récentes (Cuny *et al.*, 2010). Chez les chevaux, les premières descriptions de SARM l'ont été simultanément au Japon et aux USA (1996). Plus récemment, des cas ont été rapportés en Grande-Bretagne (2005), en Irlande (2005), en Autriche (2006) et en Allemagne (2006). Des souches de SARM ont été également décrites récemment chez la volaille en Belgique (2008, 2009), ainsi que chez le chien pour la première fois en Angleterre en 2005. Enfin, c'est surtout chez le porc que la description de souches de SARM a fait prendre conscience à la communauté médicale humaine de l'existence de ce pathogène en filière animale. Les premières descriptions du

clone ST398 de *S. aureus* chez des porcs et leurs éleveurs en portage l'ont été en 2004 par une équipe française (Armand-Lefevre *et al.*, 2005), puis c'est la description d'infections humaines par des souches porcines aux Pays-Bas (2006), qui a, à l'évidence, marqué le point de départ d'un large questionnement scientifique sur le risque de transmission à l'homme de SARM d'origine animale (Krziwanek *et al.*, 2009). Une attention toute particulière a sans doute été également portée à ce risque en raison de la très faible prévalence de SARM à l'hôpital dans ce pays (moins de 1 %), par comparaison à d'autres États membres tels que la France (environ 25 %).

En 2014, Agnoletti *et al.*, ont décrit des souches de SARM isolées dans un élevage de lapins ; le typage moléculaire des souches isolées semble orienter vers une origine porcine, espèce dans laquelle ces souches circulent de façon asymptomatique.

2.8.3. Mécanismes de résistance :

Trois grands mécanismes permettent aux bactéries de résister face à un antibiotique, le premier mécanisme consiste pour la bactérie à modifier la cible de l'antibiotique. Cette modification peut être soit directement due à une modification de la structure de la cible soit due à une modification de la voie de synthèse de cette cible pour lui conférer une nouvelle structure tridimensionnelle. Ce mécanisme va jouer sur différents composants cellulaires. Prenons l'exemple des macrolides qui agissent en se fixant aux ribosomes des bactéries. Pour contourner cet effet, une mutation génétique permet de synthétiser un nouveau ribosome qui ne sera pas reconnu par l'antibiotique. Ce mécanisme confère aux bactéries une résistance croisée pour toutes les molécules de la même famille (Collectif, 2008 ; Scott, 2009; Guerin-fauble, 2010).

Le deuxième mécanisme consiste à détruire ou modifier l'antibiotique par une inactivation enzymatique l'empêchant alors de reconnaître sa cible. Ce mécanisme se rencontre surtout contre les bêta-lactamines, les macrolides, le chloramphénicol et les aminosides. Une résistance croisée est également possible mais moindre que pour le premier mécanisme. Enfin, les bactéries peuvent également rendre leurs cibles inaccessibles. Ce mécanisme consiste soit à diminuer la perméabilité membranaire nécessaire à la pénétration de l'antibiotique soit à rejeter l'antibiotique par phénomène actif d'efflux. La diminution de la perméabilité membranaire est rendue possible grâce à une mutation des gènes codant les porines membranaires, portes d'entrée des antibiotiques, réduisant leur diamètre et empêchant leur passage dans le milieu intracellulaire. Le phénomène

d'efflux est un mécanisme actif rejetant directement les antibiotiques à l'aide de pompes membranaires spécifiques (Collectif, 2008 ; Scott, 2009; Guerin-Fauble, 2010).

La figure N° 15 illustre ces différents mécanismes.

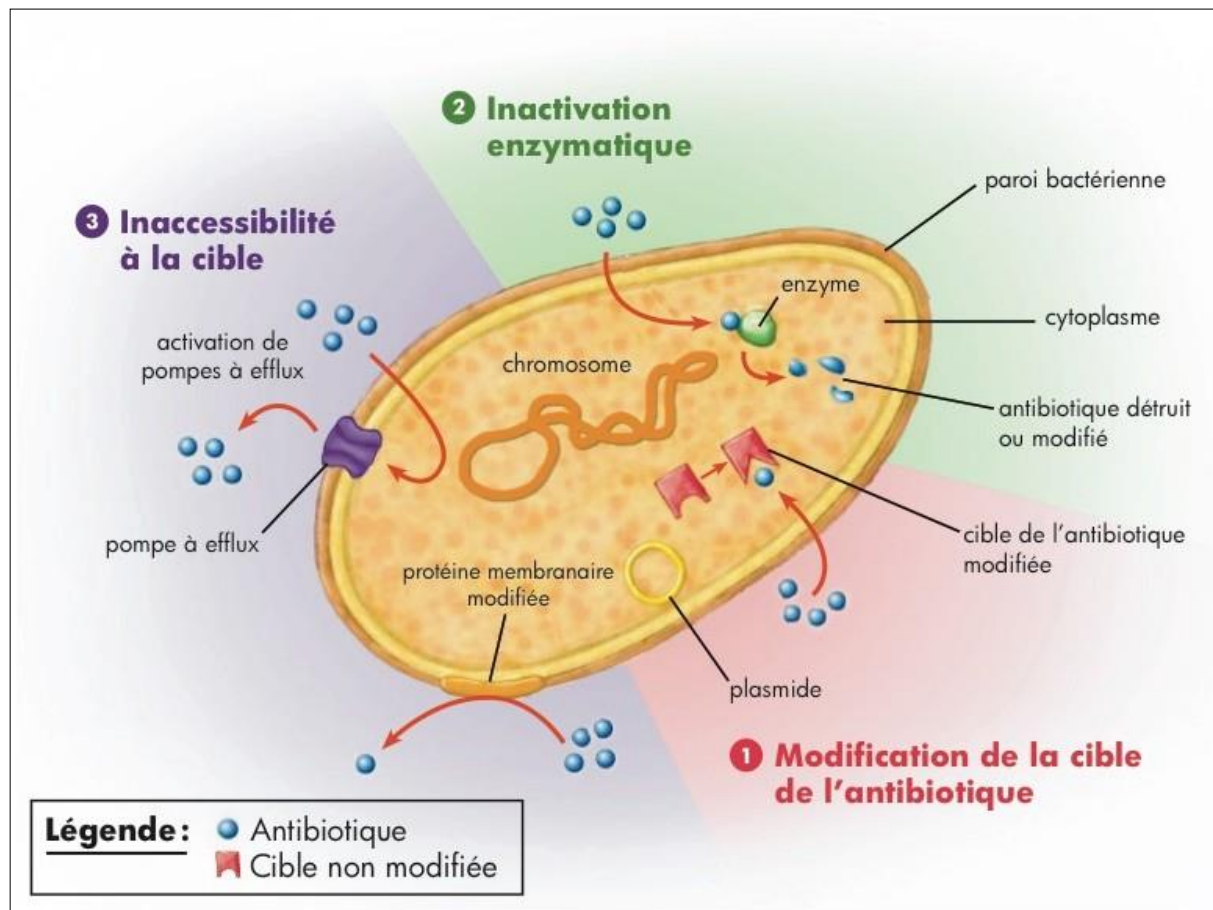


Figure N°15 : Exemples des mécanismes de résistance aux antibiotiques (d'après l'encyclopedia Britannica ,2009)

2.8.3.1. Résistance à la méthicilline :

En 1961, la méthicilline est la première pénicilline semi -synthétique à envahir le marché. Tout comme les autres molécules du groupe des bêta-lactames, elle agit en liant les PBPs (transpeptidases et carboxypeptidases), des enzymes impliquées dans la synthèse des peptidoglycanes. Toutefois, des chaînes latérales volumineuses la protègent de l'action des bêta-lactamases produites par les staphylocoques, ce qui lui procure un avantage (Prescott, 2006).

Les PLP, enzymes essentiels qui catalysent la transpeptidation des liens entre les peptidoglycanes de la paroi cellulaire, sont la cible des bêtalactamines chez les souches sensibles de *S. aureus* (Gilmore *et al.*, 2008). La liaison de méthicilline, ou autre β -lactamine, aux PLP inhibe la réaction de transpeptidation de celle-ci, ce qui entraîne un arrêt de la biosynthèse de la paroi conduisant à la mort de la bactérie (Prescott *et al.*, 2000)

Les *S. aureus* possédant le gène *mecA* qui code pour la protéine «penicillin binding protein 2a» (PBP2a) sont résistants à la méthicilline. Lorsqu'elles sont produites, les PBP2a remplacent les PBPs au niveau du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Chez les SARM la PLP2a est soit constitutionnellement présente ou induite lorsque la bactérie est en présence d'une bêtalactamine. La PLP2a, ayant une faible affinité pour les bêtalactamines, n'est pas affectée par ces antibiotiques et permet ainsi à la bactérie de continuer la biosynthèse de sa paroi (Gilmore *et al.*, 2008).

Le gène *mecA* qui code pour la résistance à la méthicilline, est situé sur un élément génétique mobile nommé «staphylococcal cassette chromosome» *mec* (SCC*mec*) (Werckenthin, 2001). Le transfert horizontal du gène *mecA* se produit d'un SARM à un *S. aureus* exempt, mais il semble y avoir des restrictions spécifiques à l'hôte pour la stabilité et le maintien du gène chez les staphylocoques, ce qui pourrait expliquer le faible nombre de clones (Poole, 2004). Les poids moléculaires de ces îlots génomiques varient entre 21 et 67 kb. Plusieurs gènes de résistance à d'autres antimicrobiens se retrouvent dans ces îlots et sont associés au SCC*mec* (Lowy, 2003).

Les souches de SARM sont donc la plupart du temps résistants aux β -lactamines, aux aminoglycosides, aux macrolides et aux tétracyclines.

2.8.3.2. Autres résistances :

Le tableau N°10 récapitule les autres Mécanismes de résistance de *S. aureus* aux antibiotiques.

Tableau N°10: Mécanismes de résistance de *S. aureus* aux antibiotiques (Freney *et al.*, 2000 ; Kotra et Mobashery, 1998 ; Child *et al.*, 1995 ; Ramirez et Tolmasky, 2010)

Antibiotique	Mécanisme d'action	Mécanisme de l'antibiorésistance
La pénicilline	Inhibition de la formation des liens inter-peptidoglycanes dans la paroi cellulaire bactérienne	l'hydrolyse de cycle β -lactame des pénicillines par β -lactamase ou pénicillinase
Aminosides	Inhibition de la synthèse protéique par fixation sur la sous unité 30S du ribosome bactérien	Production des enzymes modifiant la cible ribosomale (acetyl, nucleotidyl, phospho-transferase)
Glycopeptides	Inhibition de la formation du peptidoglycane en bloquant l'assemblage des précurseurs formant la paroi	Epaississement de la paroi bactérienne qui piège les glycopeptides dans les couches superficielles en les empêchant d'atteindre la membrane cytoplasmique où le peptidoglycane est synthétisé
MLS	Inhibent la synthèse protéique en stimulant la dissociation entre ribosomes et l'ARN de transfert	Production d'une méthylase plasmidique qui modifie la cible ribosomale par méthylation
Sulfamides	Inhibition de la synthèse des bases nucléiques	Hyperproduction d'acide para aminobenzoïque
Tétracyclines	Empêche la fixation de l' aminoacyl-ARNt entrant dans le site A du ribosome	Un mécanisme d'efflux par une protéine membranaire plasmidique ou une protection de la cible par une protéine transposable
Fosfomycine	Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	Sélection de mutants au niveau du système de transport de la molécule dans la bactérie
Acide fusidique	Inhibiteur de la biosynthèse des protéines chez les bactéries	Sélection de mutants résistants au niveau du facteur d'élongation -Modification de la perméabilité
Fluoroquinolons	Inhibition de la croissance bactérienne par arrêt de la synthèse d'ADN	Modification de la cible ADN gyrase et ADN topoisomérase

Chapitre 3

Technique d'amplification en chaîne par polymérase

3-1-Définition:

La réaction en chaîne par polymérisation est un outil de biologie moléculaire de réplication génique ciblée, *in vitro*. Elle permet la production d'un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN, même à partir d'une très faible quantité de matrice initiale, c'est-à-dire d'acides nucléiques dans un échantillon donné (**Betelli, 2013**).

3-2-Historique :

En 1983, Kary Mullis un scientifique travaillant pour la Société Cetus, imagine une technique totalement nouvelle et innovante, la polymérase chain reaction (PCR) (**Mullis, 1987**).

En 1987, il dépose un brevet où la technique est adaptée et simplifiée grâce à l'utilisation de la Taq polymérase, une ADN polymérase stable à haute température provenant d'un microorganisme « extrémophile » vivant à 100° C, *Thermus aquaticus* évitant des ajouts itératifs de la polymérase, thermosensible, après chaque cycle de chauffage (**Green et al., 2010**). Kary Mullis recevra le prix Nobel de chimie en 1993 (**Berche, 2016**).

En 1992, Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en « temps réel » utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chacune des réactions d'amplification et un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV.

L'émission de la fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device). Une augmentation de l'émission de la fluorescence était observée lorsque le bromure d'éthidium se fixait à l'ADN double brin produit au cours de l'amplification. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produit des courbes d'amplification exhibant un schéma plus complet du processus de la PCR que la simple détermination d'amplicons (produits d'amplification) accumulés en fin d'amplification (**Higuchi et al., 1992**).

3-3-Principe de la technique :

La PCR (polymerase chain reaction) est fondée sur une réaction enzymatique *in vitro* permettant d'amplifier plusieurs millions de fois des séquences d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire (ADNc, généré par transcription inverse à partir d'une molécule d'ARN).

Elle nécessite de connaître les séquences des extrémités de la région à amplifier, et de les utiliser pour élaborer des amorces nucléotidiques. Après fixation des amorces sur leurs séquences cibles par complémentarité, la région d'ADN cible est copiée par incorporation de

désoxyribonucléotides libres grâce à une enzyme ADN polymérase thermostable. Des variations cycliques de températures vont permettre successivement ; **la dénaturation** de l'ADN, **l'hybridation** des amorces et **leur extension** par l'ADN polymérase. La succession des cycles permet une augmentation quasi exponentielle de la quantité d'ADN. La réaction, réalisée de façon automatique grâce à un thermocycleur, permet de générer en moins d'une heure des millions de copies de la séquence cible à partir de très faibles concentrations initiales d'ADN (de l'ordre de 10^{-15} mol/l) (Eisenstein ,1990).

3-4-Etapes de la PCR :

A- Dénaturation : une première étape de chauffage à 95 °C permet de séparer les deux brins d'ADN, d'homogénéiser le milieu réactionnel et d'inhiber d'autres enzymes potentiellement présentes dans la solution. La Taq ADN polymérase est en revanche stable à cette température (Uhel *et al.*, 2019).

B-Hybridation des amorces (56–64 °C) : les amorces s'apparient spécifiquement avec leur brin complémentaire d'ADN dénaturé (Uhel *et al.*, 2019).

C- Élongation (72 °C) : l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de chaque brin d'ADN matrice à partir des désoxyribonucléotides libres présents dans le milieu réactionnel (Uhel *et al.*, 2019).

D- Lors du cycle suivant, la nouvelle étape de dénaturation sépare les brins d'ADN matrices des brins néo synthétisés qui deviennent à leur tour matrice de la réaction suivante (Uhel *et al.*, 2019).

E- La répétition du cycle de variation de température environ 25 à 35 fois permet d'amplifier la quantité totale d'ADN correspondant à la séquence cible de façon quasi exponentielle (Uhel *et al.*, 2019).

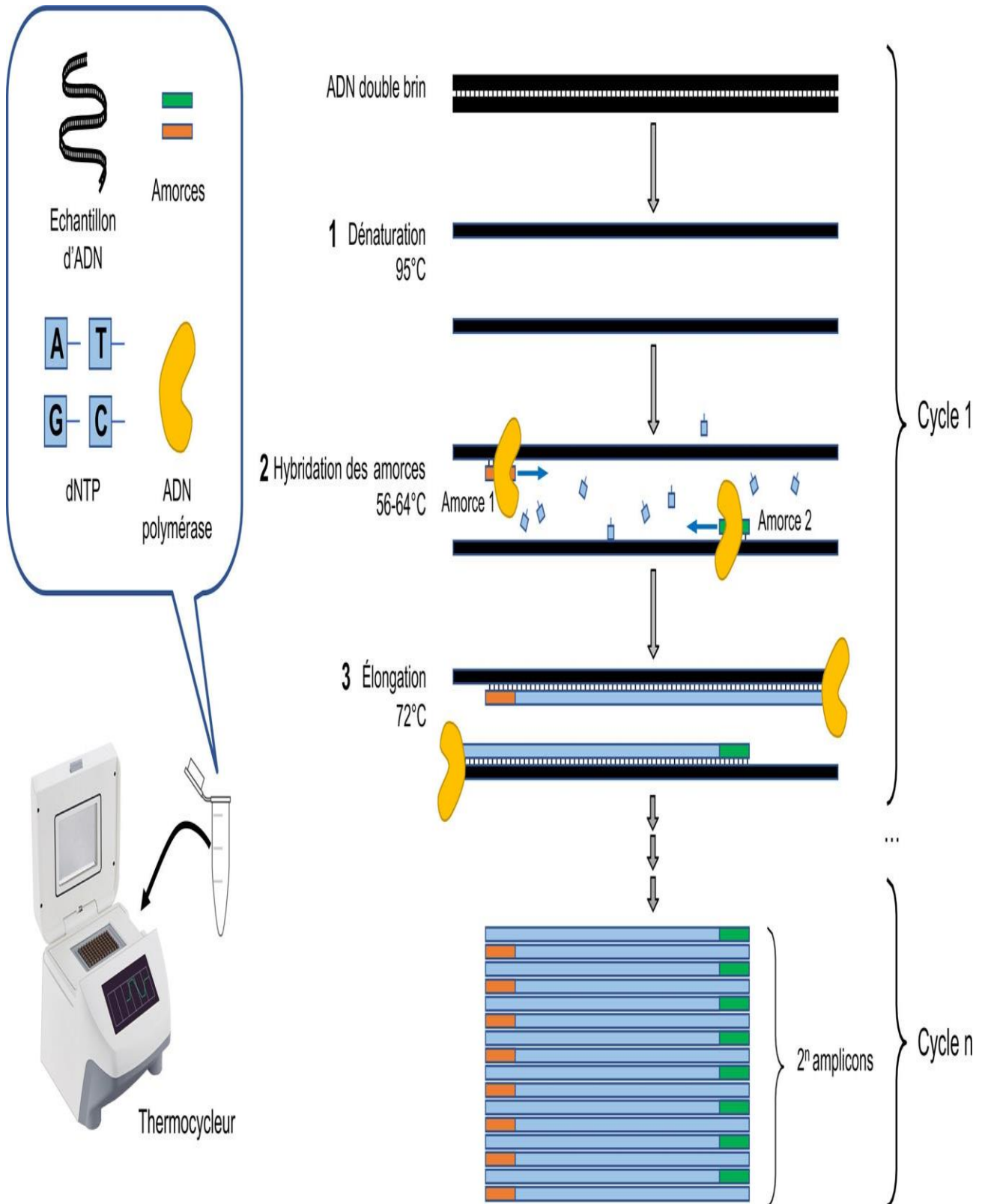


Figure N° 16: Etapes de la PCR (Uhel et al., 2019).

3-5-Variantes de la PCR:

3-5-1-La PCR classique :

La détection des produits est faite en end-point (à la fin des réactions de PCR) soit en couplant un test ELISA, soit en réalisant une migration électrophorétique sur gel d'agarose (Diarra, 2014). Cette dernière est la plus largement utilisée pour analyser le produit de PCR en séparant les produits d'ADN en fonction de la taille et de la charge. L'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode la plus simple de visualisation et d'analyse du produit PCR. Il permet de déterminer la présence et la taille du produit PCR. Un ensemble prédéterminé de produits ADN avec des tailles connues est exécuté simultanément sur le gel en tant que marqueurs moléculaires standardisés pour aider à déterminer la taille du produit (Garibyan et Avashia, 2013).

3-5-2-La PCR en temps réel (PCR quantitative) :

La PCR quantitative permet d'allier la simplicité et la rapidité de la PCR qualitative avec possibilité de quantifier des produits d'amplification obtenus non pas au final mais tout au long de la réaction donc en temps réel d'où le nom de «PCR en temps réel». A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification d'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale (Kaltenboeck et Wang, 2005).

3-5-3- La PCR multiplex :

La PCR multiplex est l'amplification simultanée de plusieurs séquences cibles dans un même tube réactionnel. Elle a l'avantage de permettre un gain de temps par rapport à une PCR qui utilise un seul couple d'amorces. Néanmoins, la difficulté réside dans l'obtention d'une bonne combinaison d'amorces et d'un mélange réactionnel adapté, afin d'obtenir les produits d'amplification voulus. Du fait de phénomènes de compétition, cette technique est limitée par le nombre de couples d'amorces et on peut actuellement, utiliser cinq voir six couples maximum dans une même réaction (Yao *et al.*, 2010).

3-5-4-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) :

Lorsqu'on recherche à amplifier des ARN messagers, il est impératif d'introduire une étape préalable de transcription inverse (reverse transcription ou RT). On parle alors de la RT-PCR. L'étape de RT va consister à synthétiser le brin complémentaire (ADNc) des ARN à

partir d'une amorce oligonucléotidique, grâce à une enzyme à activité ADN polymérase ARN dépendante, la transcriptase inverse (reverse transcriptase ou RTase) (Cavé *et al.*, 2003).

La RT-PCR se déroule en deux phases : Une première phase correspond à la copie d'ARN messenger en ADN complémentaire (ADN) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADN synthétisé. Dans la première phase, l'ARN messenger à étudier est repéré en utilisant une sonde oligonucléotidique spécifique (amorce 1 qui s'hybride à l'extrémité 3' du seul ARNm auquel on s'intéresse), puis la transcriptase inverse (ou rétrotranscriptase) permet la synthèse du brin complémentaire (sous une forme d'ADN simple brin), une seconde amorce oligonucléotidique spécifique (amorce 2) permettra la synthèse du second brin par extension (Cavé *et al.*, 2003).

L'ADN complémentaire synthétisé servira ensuite de matrice pour une réaction PCR classique (Cavé *et al.*, 2003).

3-6-Domains d'application :

La PCR permet d'amplifier, à partir de doses infimes, de l'ADN provenant de tissus vivants ou morts. Cette technique a littéralement bouleversé la biologie, ouvrant des perspectives dans de nombreux domaines allant de l'archéologie à la médecine légale, l'écologie, le diagnostic médical, la génétique, l'identification des micro-organismes inconnus ou encore la généalogie. Véritable machine à remonter le temps, la PCR a permis aussi de travailler sur l'ADN « ancien », à partir d'ossements d'animaux ou de restes humains datant de milliers d'années, permettant par exemple de réaliser la séquence complète du génome de l'homme de Néanderthal disparu il y a 30 000 ans (Green *et al.*, 2010). De même, à partir d'une phalange de l'auriculaire d'une fillette morte il y a 80 000 ans dans la grotte de Denisova, en Sibérie, il était possible de décrypter le génome d'une espèce inconnue d'hominidé (Reich *et al.*, 2010).

Partie II
Etude expérimentale

Matériel et méthodes

1. Rappel sur les objectifs :

Notre étude vise les souches de *Staphylococcus aureus* impliquées dans les mammites bovines en les caractérisant :

- Phénotypiquement (caractères culturels, identification biochimique, antibiogramme).
- Génotypiquement (recherche de quelques gènes codant des facteurs de virulence, recherche du gène qui code la résistance à la méthicilline, recherche du gène codant les bêtalactamases).

2. Durée et lieu de l'étude :

L'étude s'est étalée sur une période de trente mois allant du mois de Décembre **2018** jusqu'au mois de Juin **2021**.

La partie sur terrain a débuté en mois de Décembre **2018** et a couvert une période de **10** mois. Elle a été menée dans douze exploitations situées dans différentes régions de la wilaya de TIARET (Tiaret, Oued Lili, Ain Deheb, Naima, Rahouia, Guertoufa, Ain Hedid et Mellakou).

Les critères de choix des exploitations ont été la facilité d'accès et la disponibilité des éleveurs.

La partie relative à l'isolement bactériologique et à la caractérisation phénotypique des isolats a été réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène et de pathologie animale –Institut des sciences vétérinaires –Université Ibn Khaldoune de Tiaret- pendant la période s'étalant du mois de Décembre **2018** jusqu'au mois de Décembre **2020**.

La caractérisation moléculaire des isolats a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche bactériologique- institut de recherche vétérinaire - Université d'el Manar-Tunis- tout en couvrant une période de **04** mois allant du **23 février 2021** au **23 juin 2021**.

➤ Description des animaux et des échantillons :

La taille des troupeaux a été variable .Un total de **302** prélèvements de lait de quartier réalisés sur **77** vaches en lactation a fait l'objet d'un CMT (**06** quartiers se sont révélés non fonctionnels).

3. Méthodologie :

3.1. Examen clinique des mamelles :

Un examen clinique de la mamelle a été effectué avant de procéder au test CMT pour différencier entre mammite clinique et subclinique.

Cet examen passe par ;

- Une inspection visuelle de la mamelle.
- Une palpation de la mamelle pour rechercher toute induration ou douleur.
- Un examen visuel des sécrétions mammaires.

3.2. L'unité du prélèvement :

Les prélèvements ont été effectués quartier par quartier et les examens bactériologiques ne peuvent être effectués sur le lait de mélange de 04 quartiers (**Hanzen, 2009 b**).

3.3. Moment du prélèvement :

Les prélèvements du lait ont été effectués directement de la mamelle, avant la traite du soir. Deux prélèvements ont été réalisés sur chaque quartier : le premier passe par le test de California mastitis test (CMT). Le deuxième a été destiné à l'analyse bactériologique et n'a concerné que les échantillons de lait détectés positifs par le CMT. Le volume prélevé de chaque quartier est de 20 millilitres environ.

3.4. Test CMT :

Le principe de ce test est le suivant : le mélange à parties égales d'un agent tensioactif (le Teepol) et de lait provoque la lyse des cellules du lait et la libération de l'ADN de leurs noyaux. L'ADN constitué de longs filaments, forme alors un réseau qui enrobe les globules gras ainsi que d'autres particules. Plus les cellules sont nombreuses, plus le réseau est dense et plus l'aspect de flocculat pris par le mélange est intense. L'addition au Teepol d'un indicateur de pH coloré (pourpre de bromocrésol) facilite la lecture de la réaction (**Hanzen, 2009 b**).

➤ Matériel nécessaire :

- Un plateau adapté.
- Le Teepol.
- Une seringue ou un flacon doseur.
- Un seau contenant de l'eau chaude.
- Un seau vide.

➤ Technique :

Nous avons suivi les recommandations de **De Cremoux et al., 2013** qui sont les suivantes :

Après une bonne préparation de la mamelle (lavage, essuyage et extraction des premiers jets de lait), vérifiez la présence de lait anormal à l'aide d'une tasse filtre.

- Adoptez toujours la même position pour tenir le plateau sous le pis afin de faciliter le repérage des quartiers lors de l'interprétation.
- Recueillez du lait de chaque quartier dans le godet correspondant.
- Chaque coupelle possède un trait qui indique la quantité de lait à recueillir (environ 2ml).
- Pour vérifier la quantité de lait que vous avez recueillie, inclinez le plateau vers vous.
- Rajoutez une quantité de Teepol identique à celle du lait. C'est une condition indispensable pour que les mesures soient fiables et répétables. Pour cela, il est conseillé d'utiliser une seringue ou un flacon doseur.
- Agitez le plateau à l'aide de petits mouvements circulaires pendant quelques secondes.
- Interprétez immédiatement le test pour chaque quartier : en poursuivant le mouvement circulaire pour voir l'épaississement et en l'inclinant d'un côté à l'autre, puis en versant le mélange.
- Attribuez une note à chaque coupelle en comparant les résultats obtenus avec le tableau suivant (**Tableau N°11**) :

Tableau N°11 : table de lecture du test CMT (**De Cremoux et al., 2013**).

Aspect du gel	Note
Pas de précipité.	0
Précipité trouble, qui disparaît.	1
Leger gel persistant avec filament grumeleux.	2
Epaississement immédiat Gel de type «blanc d'œuf »se détachant du fond en filament lors des rotations du plateau.	3
Gel bombé, glissant en masse sur le fond du plateau lors de ses rotations.	4

-Ce test est considéré positif à partir d'un score de 2. Si au moins un quartier est positif, la vache est déclarée positive et si tous les quartiers sont négatifs, la vache est déclarée saine.

Attention ; le Teepol étant un détergent, une mauvaise utilisation peut le faire mousser. Dans ce cas, recommencez la mesure car la lecture en serait faussée.

-A l'issue de la notation, videz le précipité obtenu dans un seau et rincez le plateau à l'eau chaude pour éliminer les résidus de lait et de détergent.

3.5. Réalisation du prélèvement pour la bactériologie:

La valeur de l'examen bactériologique du lait de mammites dépend en grande partie de la qualité du prélèvement, qui dépend de la technique de l'opérateur. La technique de prélèvement suit les recommandations de MIALOT (Mialot, 1983) :

- Lavage des mains.
- Lavage et séchage des trayons.
- Désinfection de l'extrémité du trayon à l'aide d'un coton imbibé d'alcool à 70°.
- Elimination des premiers jets de lait.
- On saisit le flacon à prélèvement entre le pouce et les doigts de la main droite et on retourne le flacon de façon à diriger le bouchon vers le bas.
- On dévisse le bouchon de la main gauche et on le porte entre l'index et le majeur de la main droite. Tube et bouchon ont alors leurs ouvertures dirigées vers le bas afin d'éviter toute contamination.
- On saisit alors le trayon de la main gauche, on le ramène en position horizontale et on trait dans le flacon incliné un peu plus de 10 millilitres de lait.
- On referme le flacon avant de le redresser.
- On identifie aussitôt le flacon avec la date, le numéro de la vache et le quartier prélevé.

Lorsque l'on prélève plusieurs quartiers, on respecte un ordre de prélèvement inverse de l'ordre de désinfection, afin d'éviter de toucher un trayon non prélevé avant de le prélever.

3.6. Enquête épidémiologique :

Une enquête épidémiologique a été entreprise par le biais d'une fiche de renseignements relatifs à la conduite de la traite, à son hygiène et au traitement au tarissement.

3.7. Conservation et transport des prélèvements :

Les prélèvements ont été acheminés au laboratoire dans des conditions strictes de réfrigération (4 °C) dans un délai de 18 heures maximum (Benhassen *et al.*, 2003).

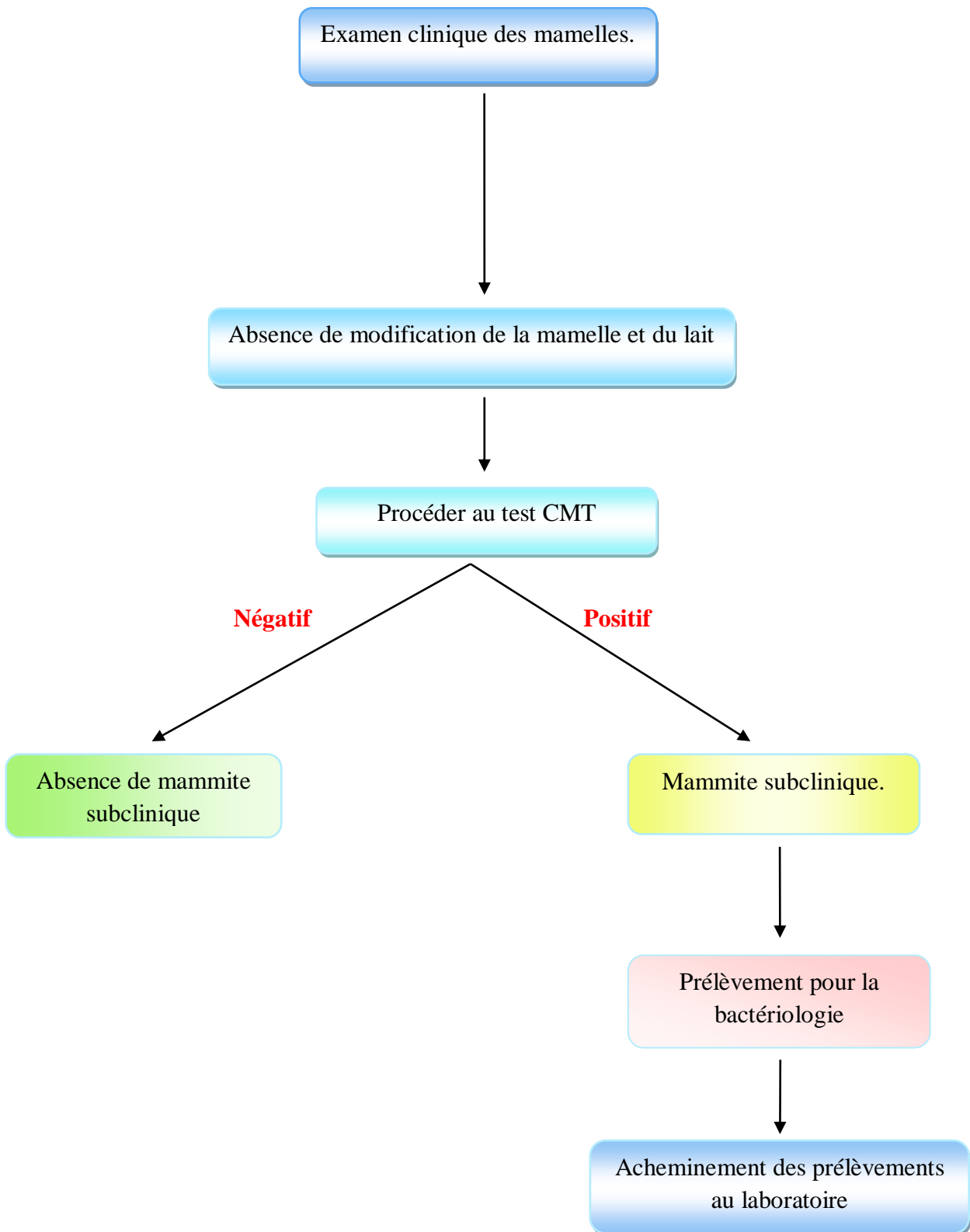


Figure N° 17 : Organigramme de la démarche adoptée dans la collecte des échantillons de lait de vaches atteintes de mammite subclinique.

3.8. Préparation des échantillons :

Nos échantillons ont été agités soigneusement afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes.

3.9. Isolement et caractérisation phénotypique des souches :

Les méthodes utilisées dans l'isolement et l'identification de *Staphylococcus aureus* sont des méthodes de routine décrites par **Marchal et al., 1987**.

3.9.1. Isolement:

On dépose à la surface du milieu de Chapman coulé en boîte, un volume connu d'inoculum (en générale 0,1 ml de lait) qu'on étale de façon homogène à la pipette râteau.

Les boîtesensemencées sont mis 24 à 36 h à l'étuve à 37°C.

3.9.2. Purification des isolats :

Cette étape est basée sur les caractères cultureux et la coloration de Gram. A partir des colonies isolées sur le milieu de Chapman, procéder directement à la coloration de Gram. Ensuite, sélectionner les colonies présentant des cocci à Gram positif. La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pure présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement. La dernière culture pure doit être faite sur gélose nutritive pour faire l'objet d'autres tests (tests préliminaires, identification biochimique, antibiogramme...).

3.9.3. Recherche du caractère hémolytique:

Le caractère hémolytique est mis en évidence sur la gélose au sang frais.

A l'aide d'une pipette pasteur, on prend quelques colonies caractéristiques de l'espèce *Staphylococcus aureus* isolées sur le milieu de Chapman et on les réensemence en stries selon la méthode des cadrans sur la gélose Trypto-Caséine-Soja ; additionnée de 5% de sang défibriné stérile de mouton et coulé en boîte sur une faible épaisseur (3 mm).

Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C ± 1°C pendant 24 h ± 2 heures (**Marchal et al., 1987**).

3.9.4. Identification biochimique :

❖ Identification du genre :

✓ Recherche de la catalase :

➤ Principe :

Ce test à une importance capitale pour la différenciation entre les genres *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

La catalase est une enzyme qui empêche l'accumulation d' H_2O_2 , dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne, catalysant la réaction : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse.

➤ Technique :

Plusieurs procédés peuvent être utilisés, le plus simple et le plus classique consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes et à y dissocier directement un peu de la culture à étudier, prélevé sur milieu solide (le milieu de Chapman) (Marchal *et al.*, 1987).

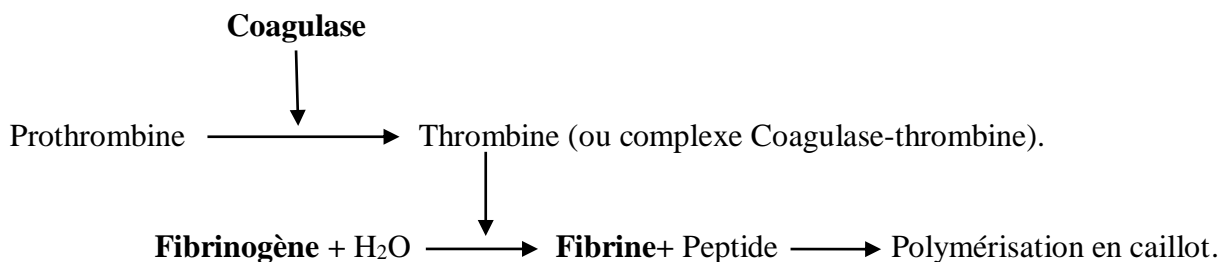
❖ Identification de l'espèce :

✓ Recherche de la staphylocoagulase :

➤ Principe :

La recherche d'une coagulase libre, enzyme capable in vitro de coaguler le plasma de lapin, est de toute première importance pour l'étude du genre *Staphylococcus*. Sa mise en évidence permet en effet l'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

La coagulase libre est une enzyme libérée dans le milieu au cours de la culture. Elle agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium.



➤ Technique :

Réaliser une culture en bouillon cœur-cerveille de la souche à étudier et étuver 24h à 37°C.

Dans un tube à hémolyse on mesure 10 gouttes de plasma oxalaté et 10 gouttes de culture en bouillon de la souche à étudier.

Placer le mélange au bain-marie à 37°C.

Des lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures (**Marchal et al., 1987**).

-Lecture :

S.aureus provoque la coagulation du plasma en un temps variant d'une demi-heure à 24 h.

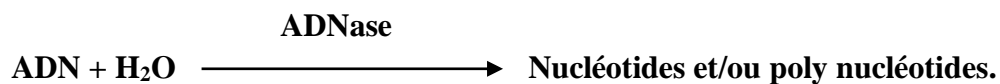
La prise en masse du plasma est généralement totale, au point que le tube peut être retourné. Quelque fois, le caillot est moins compact mais encore dans ce cas, l'épreuve doit être tenue pour positive si elle se produit avant la 24^{ème} heure (**Marchal et al., 1987**).

✓Recherche de la DNase (la Désoxyribonucléase) :

➤Principe :

Certaines bactéries comme les Staphylocoques sont capables d'hydrolyser l'ADN grâce à une enzyme ; l'ADNase.

La réaction catalysée est la suivante :



La recherche de la DNase consiste après culture de la souche à étudier sur un milieu solide contenant de l'acide désoxyribonucléique, à contrôler par un réactif révélateur (HCL ou bleu de toluidine) la disparition de ce dernier (**Marchal et al., 1987**).

➤Technique à l'acide chlorhydrique :

Sur gélose à l'ADN, ensemercer les souches à étudier soit par plages de 5 mm de diamètre, soit en stries épaisses de 2 cm de long. Il est possible d'étudier simultanément 4 ou 5 souches différentes (stries rayonnantes) sur une même boîte de pétri. Ne pas dépasser le nombre de 5 essais en raison de la diffusion de l'enzyme qui peut gêner la lecture des résultats.

Incuber jusqu'à obtention d'une culture suffisante, en générale 24 à 48 h et de préférence à la température du laboratoire.

Inonder la surface du milieu avec quelques millilitres d'HCL N ; réaspirer l'excès éventuel.

Attendre 5 à 10 minutes. L'HCL doit opacifier le milieu sauf dans les zones où l'ADN a été hydrolysé (**Marchal et al., 1987**).

-Lecture :

Réaction DNase positive : zone transparente autour de la culture, le reste de la boîte étant opaque (observer sur fond noir).



Figure N°18 : Organigramme de l'identification de *Staphylococcus aureus* (Leyral et Joffin, 1998)

3.9.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme) :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose Müller Hinton selon les recommandations du **CLSI (2011)**.

➤ Liste des antibiotiques testés :

La sensibilité des souches isolées a été déterminée essentiellement vis-à-vis de onze antibiotiques : Pénicilline (**10 UI**), Amoxicilline+Acide clavulanique (**20/10 µg**), Céfoxitine (**30 µg**), Erythromycine (**15 µg**), Néomycine (**30 µg**), Gentamicine (**10 µg**), Ciprofloxacine (**5 µg**), Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole (**1,25/23,75 µg**), Tétracyclines (**30 µg**), Bacitracine (**130 µg**), Clindamycine (**2 µg**).

Ces antibiotiques appartiennent à différentes familles représentées dans l'annexe **N°03**.

➤ Technique :

-Milieu pour antibiogramme :

✓ Il doit être coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.

✓ Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

-Préparation de l'inoculum :

✓ A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

✓ Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable (**CLSI, 2011**).

-Ensemencement :

✓ Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.

✓ L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

✓ Répéter l'opération 2 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 Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

-Application des disques d'antibiotiques :

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm. Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.

➤ Tests complémentaires:

-Recherche de la résistance de *Staphylococcus spp* à l'oxacilline:

Pour *S. aureus*, le disque de céfoxitine est comparable à celui de l'oxacilline pour détecter la résistance à l'oxacilline par production de PLP2a (gène *mecA*) ; cependant, le disque de céfoxitine est plus facile à lire et donc c'est la méthode préférée.

On utilise : - de la céfoxitine avec un inoculum à 10^6 UFC/ml (CLSI, 2011).

-Conditions d'incubation :

✓ Incuber les boîtes à 35 °C pendant 18 heures en atmosphère ordinaire.

-Lecture :

✓ Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

✓ Les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée.

✓ Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (**voir annexe N°03**).

✓ Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I (CLSI, 2011).

3.10. Contrôle de qualité de l'antibiogramme :

Une souche de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) a été utilisée pour le contrôle de qualité de l'antibiogramme.

3.11. Conservation des souches :

Afin d'effectuer une caractérisation moléculaire ultérieurement, les souches ont été conservées en double :

✓ À -20°C dans des cryotubes contenant 50% de bouillon cœur-cerveau (BHIB) additionné de 50 % de Glycérol qui est un cryoprotecteur.

✓ À 4°C après avoir ensemencé par piqure centrale et incubé pendant 24 H à 37°C des tubes contenant la gélose de conservation.

3.12. Caractérisation moléculaire des isolats :

Nos isolats ont été caractérisés génotypiquement par PCR classique en ciblant :

- ❖ Le gène ; *nuc* constituant un outil d'identification puissant.
- ❖ Les gènes ; *Tsst1*, *sea*, *luk-M*, *icaA*, *icaD* codant des facteurs de virulence.
- ❖ Le gène *mecA* chez les souches résistantes à la méthicilline.
- ❖ Le gène *blaZ* chez les souches résistantes à la pénicilline.

3.12.1. Principe de la technique :

La réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier in vitro une région bien déterminée de l'ADN bactérien permettant de détecter les gènes de résistance et de virulence ciblés.

3.12.2. Protocole :

3.12.2.1. Extraction de l'ADN bactérien :

L'ADN bactérien a été extrait directement à partir d'une culture bactérienne de 24 h. En effet, un volume de 100 µl de la culture bactérienne a été ajouté à 1 ml du tampon phosphate salin (PBS) dans un tube Eppendorf de 1,5 ml puis vortexer. Cette étape de lavage avec le tampon PBS sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter.

Ensuite, les suspensions ont été centrifugées pendant 5 minutes à 13000 tours/min. Le surnageant a été jeté et le culot a été récupéré dans 100 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 0,2 mM EDTA, pH 8). Ensuite le tube a été déposé sur une plaque chauffante pendant 10 min puis déposé dans la glace pendant 5 min pour assurer un choc thermique ce qui permettra par la suite la lyse des bactéries. Finalement, les tubes ont été centrifugés pendant 5 minutes à 13000 tours/min et le surnageant contenant l'ADN a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation pour les réactions de PCR.

3.12.2.2. Mélange réactionnel :

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl contenant 5 µl d'ADN et 45 µl des composants de PCR (**Tableau N°12**) et doivent comporter un contrôle positif et un contrôle négatif (Mix avec de l'eau).

Tableau N°12: Composition du mix pour la réalisation de PCR.

Composants	Concentration finale par tube de PCR
Tampon 5X (sans MgCl ₂)	1X
MgCl ₂ (25 mM)	3 mM
dNTPs (25 mM)	0,2 mM
Amorce sens (100 µM)	0,5 µM
Amorce anti-sens (100 µM)	0,5 µM
Taq polymérase (BioTaq (5U/µl))	2 U
Eau MilliQ stérile	(quantité suffisante pour 50µl)
ADN	5 µl

3.12.2.3. Identification moléculaire des isolats :

La recherche du gène *nuc* spécifique de l'espèce *S. aureus* a été réalisée selon la méthode décrite par **Poulsen et al., 2003**.

Tableau N°13 : séquence des amorces et taille de l'amplicon utilisé pour l'amplification du gène *nuc*.

Gène	Amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Taille (pb)	Référence
<i>nuc</i>	nuc-1	TCAGCAAATGCATCACAAACAG	255	Poulsen et al., 2003
	nuc-2	CGTAAATGCACTTGCTTCAGG		

pb : paire de base.

Les conditions de la PCR ont été : une dénaturation initiale à 94°C durant 7 min suivie de 30 cycles d'amplification en utilisant les paramètres suivants : dénaturation à 94°C durant 1 min, hybridation à 61°C durant 2 min, élongation à 72°C durant 1 min et élongation finale à 72°C durant 5 min (**Poulsen et al., 2003**).



Figure N° 19 : appareil de la PCR (le thermocycleur).

3.12.2.4. Recherche des gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques :

Les séquences d'amorces utilisées, la taille des amplicons ainsi que les conditions d'amplification pour chaque gène sont portées dans le **Tableau N°14**.

Tableau N°14 : , taille des amplicons, amorces et conditions d'amplification des gènes.

Gène (Taille de l'amplicon (pb))	Amorces (5' → 3')	Conditions d'amplification	Références
<i>mecA</i> (310)	F- GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA R- CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	95°C/3 min ; 30 cycles : 95°C/1 min, 55°C/1min, 72°C/ 1min ; 72°C/ 4min	Frebourg <i>et al.</i> , 2000
<i>blaZ</i> (772)	F- CAGTTCACATGCCAAAGAG R- TACTACTCTTGCGGTTTC	95°C/5 min ; 30 cycles : 95°C/1 min, 60°C/1min, 72°C/ 1min ; 72°C/ 4min	Pérez <i>et al.</i> , 2020
<i>Tsst</i> (326)	F- ACCCCTGTTCCCTTATCATC R- TTTTCAGTATTTGTAACGCC	94 °C / 5 min; 35 cycles: 94 °C/30s, 52.3/ 30s, and 72°C for 1 min; 72 °C/ 7 min.	Mehrotra <i>et al.</i> , 2000 ; Jarraud <i>et al.</i> , 2002 ; Ote <i>et al.</i> , 2011.
<i>sea</i> (560)	F-GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA R- CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC		
<i>Luk-M</i> (780)	F-TGGATGTTACCTATGCAACCTAC R-GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC	96°C/ 5min; 30 cycles: 95°C/1 min, 55°C/ 1 min, 72°C/2 min; 72°C/10 min	Jarraud <i>et al.</i> , 2002
<i>icaA</i> (1315)	F- CCTAACTAACGAAAGGTAG R-AAGATATAGCGATAAGTGC	96°C/5 min; 30 cycles:	Vasudevan <i>et al.</i> , 2003
<i>icaD</i> (381)	F-AAACGTAAGAGAGGTGG R-GGCAATATGATCAAGATA	96°C/45s, 49°C/45s, 72°C/45s; 72°C/5 min	

pb : paire de base.

F : forward.

R : reverse.

Remarque :

Les conditions d'amplification incluent les températures et le temps requises pour chaque étape (dénaturation initiale suivie de cycles (entre 30 et 35) comportants ; une dénaturation, une hybridation, une élongation et une élongation finale).

3.12.2.5. Détection des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose:**✓Principe :**

L'électrophorèse est utilisée à des fins analytiques car elle permet la séparation et la purification des fragments d'ADN en fonction de leur taille et de leur charge électrique.

Elle fait référence à une technique où les molécules sont obligées de traverser une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique. L'énergie motrice de l'électrophorèse est la tension qui est appliquée à des électrodes placées de part et d'autre de la couche du gel.

Les propriétés d'une molécule déterminent la rapidité avec laquelle un champ électrique peut traverser un milieu gélatineux. En fonction de la nature de la charge du réseau, les particules chargées migreront soit vers la cathode, soit vers l'anode. À titre d'exemple, lorsqu'un champ électrique traverse un gel de pH neutre, les groupes de phosphates chargés négativement de l'ADN provoquent la migration de celui-ci vers l'anode (**Westermeier, 1997**).

L'électrophorèse se réalise sur le gel d'agarose. Un tampon de migration est ajouté pour améliorer les conditions de migration des molécules à séparer (**Westermeier, 1997**).

La position de l'ADN dans le gel peut, par ailleurs, être déterminée en teintant celui-ci avec une faible concentration de bromure d'éthidium, un fluorochrome s'intercalant entre les bases de l'ADN (**Westermeier, 1997**).

Les échantillons d'ADN à charger sur le gel d'agarose sont tout d'abord mélangés à un tampon de chargement pour faciliter leur chargement dans les puits pour électrophorèse (**Westermeier, 1997**).

Un ADN marqueur d'une taille connue doit être ajouté. En effet, un marqueur contient généralement un nombre défini de fragments d'ADN connus, ce qui permet de déterminer plus facilement la taille des ADN inconnus (**Westermeier, 1997**).

Dans notre étude, l'électrophorèse a été réalisée sur le gel d'agarose à une concentration de 2%.

✓Protocole :

À l'aide d'une bande adhésive ou d'un autre moyen, scellez les extrémités d'un moule en plastique propre et sec. Positionnez le peigne adéquat de façon à former des puits complets au moment de couler la solution d'agarose.

4 g d'agarose sont dissous par la suite dans 200 ml du tampon de migration ; le TBE 0,5 X (45mM Tris- acide borique et 1mM EDTA [pH 8,0]) puis porté à ébullition jusqu'à dissolution de l'agarose (contrôlez le volume de la solution après l'avoir chauffée). Laissez refroidir le mélange jusqu'à une température de 50-60 °C, puis ajoutez 13,5 µL de bromure d'éthidium (concentration finale 0,5 µg /ml) à l'agarose et mélangez le tout convenablement. Versez la solution sur le moule du gel et laissez le gel se figer. La quantité de gel utilisée devrait correspondre à une épaisseur d'environ 3 à 5 mm.

Lorsque le gel est complètement figé, retirez soigneusement le peigne et la bande adhésive et placez le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 0.5 X.

Les suspensions à analyser ont un volume final de 15 µL composé de 10 µL de produit PCR additionné de 5 µL de tampon de charge (bleu de bromophénol 25 mg +5 ml de glycérol + 5 ml d' H₂O). Pour chaque gel, un marqueur de taille de 100 pb utilisé comme marqueur de taille des fragments de gènes amplifiés a été placé dans le premier puit.

La migration a été effectuée sous un voltage constant de 120 V pendant 1 heure.

✓Lecture :

Le résultat de l'électrophorèse est visualisé sous une lumière UV incorporée à un appareil photo.

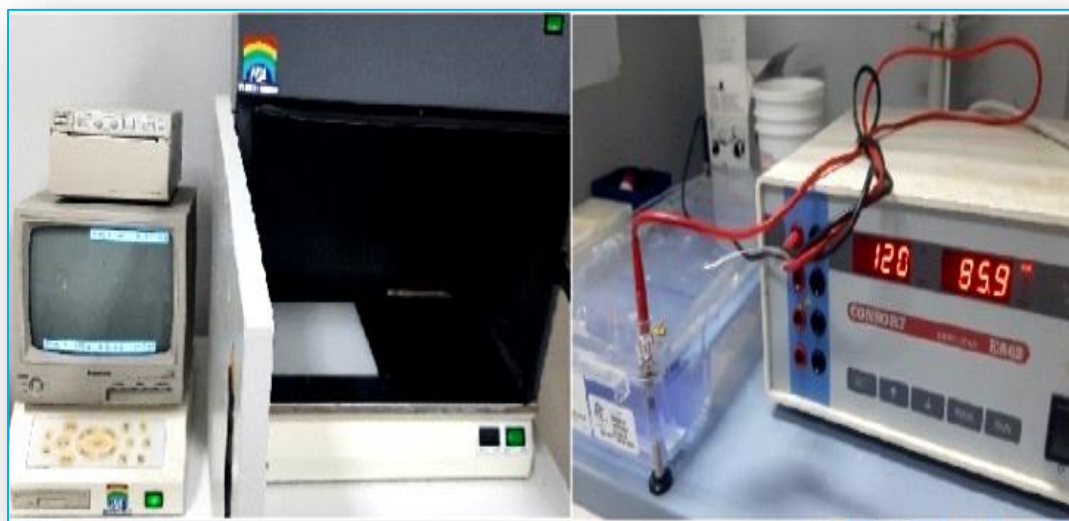


Figure N° 20 : cuve d'électrophorèse (à droite) et appareil UV (à gauche) pour la visualisation et la prise des photos.

4. Analyse statistique :

Nos résultats ont été analysés statistiquement en utilisant le logiciel IBM SPSS V.25. Afin d'étudier l'influence du gène sur l'apparition de la résistance chez les souches étudiées, le test d'analyse de la variance " ANOVA" et le test de différence significative minimale (LSD) ont été appliqués.

Partie III

Résultats et discussion

1-Examen clinique des mamelles :

L'examen des mamelles et des laits des vaches incluses dans notre étude nous n'a permis de déceler aucune modification, ce qui laisse conclure l'absence de mammites cliniques.

2-Diagnostic de la santé mammaire par le test CMT :

Sur les 77 vaches en lactation testées, 60 (77,92 %) ont été positives au CMT avec 129 quartiers positifs sur les 302 quartiers testés soit un taux de 42,71% (**Tableau N°15**).

Tableau N°15 : résultats du California Mastitis Test.

<i>Exploitation</i>	<i>Nb de vaches testées</i>	<i>Nb de vaches positives (fréquence)</i>	<i>Nb de quartiers positifs (fréquence)</i>
E1	07	07(100%)	12(42,85%)
E2	06	05(83,33%)	9(39,13%)
E3	01	01(100%)	02(66,66%)
E4	03	03(100%)	09(75%)
E5	04	03(75%)	08(53,33%)
E6	03	02(66,66%)	02(16,66%)
E7	07	06(85,71%)	14(50%)
E8	01	01(100%)	04(100%)
E9	04	03(75%)	07(43,75%)
E10	05	05(100%)	13(65%)
E11	28	18(64,28%)	34(30,35%)
E12	08	06(75%)	15(51,72%)
Total	77	60(77,92%)	129(42,71%)

Il ressort que le test CMT utilisé depuis longtemps dans plusieurs pays (**Rakotozandrindrainy et al., 2007**), reste la meilleure technique indirecte réalisable chez les vaches laitières, pour détecter les mammites subcliniques (**Ruegg et Reiman, 2002**).

Selon (**Hanzen, 2009 b**), le CMT a surtout, une valeur ponctuelle comme complément de la détermination du taux cellulaire ; lorsqu'il s'agit de décider de la réforme d'un animal ou du traitement spécifique de l'un ou l'autre quartier. Il permet également de vérifier la guérison de l'animal. Réalisé systématiquement lors de la traite, il en allonge la durée et suppose la notation d'un nombre important d'informations. Enfin, il permet de déterminer l'importance des pertes de la production laitière.

Le CMT, lorsqu'il est réalisé régulièrement présente les mêmes indications que le comptage cellulaire individuel. Il a l'avantage, par rapport à ce dernier, d'être moins couteux, de pouvoir être réalisé par tous les éleveurs et de fournir une image plus précise des infections en donnant des résultats quartier par quartier. Il peut également être utilisé pour vérifier, voire sélectionner les animaux à traiter au moment du tarissement (**Hanzen, 2009 b**).

La prévalence de mammites subcliniques enregistrée dans notre étude (77,92%) est supérieure à celle trouvée par : **Saidi et al., 2016** dans la région centre de l'Algérie, **Boufaïda Asnoune et al., 2016** dans le nord-est de l'Algérie, **Belmamoun (2016)** dans la région de Sidi-Bel-Abbés en Algérie, **Mahantesh et al., 2011** dans le district de Dharwad –Karanataka- en Inde et **Mohey Elhaig et Selim (2014)** dans la province d'el Ismaïlia en Egypte avec des taux de 28,57%, 33,7 %, 53,6%, 72%, 71,6% respectivement.

Elle est proche de celle rapportée par **Ndahetuye et al., 2019** dans les zones périurbaines de Kigali au Rwanda avec 76,2%.

Cependant, elle est inférieure à celle enregistrée par **Abrahmsén et al., 2014** dans les fermes laitières des zones urbaines et périurbaines de Kampala, à Ouganda avec 86,2%.

D'après **Gandon (2010)**, les mammites subcliniques ont tendance à passer inaperçues au sein des élevages, où elles sont responsables des pertes économiques les plus importantes.

Selon **Debreil (2008)**, les mammites subcliniques sont beaucoup plus fréquentes que les infections cliniques, ce qui est cohérent avec notre étude où ce type d'infections était décelé chez 77,92 % des vaches en lactation testées.



Réaction
positive

Figure N° 21 : Résultat du test CMT (BOUZIDI ,2018).

3-Résultats de l'enquête épidémiologique :

L'enquête épidémiologique réalisée auprès des éleveurs participant dans notre étude a fait ressortir que ;

- ✓Le traitement systématique au tarissement n'est plus respecté.
- ✓Les conditions d'hygiène de la traite étaient mauvaises dans la majorité des élevages.
- ✓Le mode de traite pratiqué varie entre la traite manuelle et mécanique.

Tbleau N°16 : Fiche de l'enquête épidémiologique.

<i>Exploitation</i>	<i>Localisation</i>	<i>Nb de vaches laitières</i>	<i>Mode de traite</i>	<i>Conditions d'hygiène de la traite</i>	<i>Traitement au tarissement</i>	<i>Nb de vaches positives au test CMT</i>	<i>Nb de quartiers prélevés</i>
<i>E₁</i>	<i>RAHOUIA</i>	<i>25</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Satisfaisantes</i>	<i>Aucun</i>	<i>07</i>	<i>12</i>
<i>E₂</i>	<i>AIN DEHEB</i>	<i>06</i>	<i>Manuelle</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>05</i>	<i>09</i>
<i>E₃</i>	<i>TIARET</i>	<i>04</i>	<i>Manuelle</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>01</i>	<i>02</i>
<i>E₄</i>	<i>OUED LILI</i>	<i>03</i>	<i>Manuelle</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>03</i>	<i>09</i>
<i>E₅</i>	<i>AIN HEDID</i>	<i>04</i>	<i>Manuelle</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>03</i>	<i>08</i>
<i>E₆</i>	<i>NAIMA</i>	<i>07</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>06</i>	<i>14</i>
<i>E₇</i>	<i>NAIMA</i>	<i>06</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>02</i>	<i>02</i>
<i>E₈</i>	<i>GUERTOUFA</i>	<i>03</i>	<i>Manuelle</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>01</i>	<i>04</i>
<i>E₉</i>	<i>NAIMA</i>	<i>04</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>03</i>	<i>07</i>
<i>E₁₀</i>	<i>NAIMA</i>	<i>05</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>05</i>	<i>13</i>
<i>E₁₁</i>	<i>MELLAKOU</i>	<i>28</i>	<i>Mécanique</i>	<i>Satisfaisantes</i>	<i>Aucun</i>	<i>18</i>	<i>34</i>
<i>E₁₂</i>	<i>NAIMA</i>	<i>11</i>	<i>Manuelle</i>	<i>Mauvaises</i>	<i>Aucun</i>	<i>06</i>	<i>15</i>

4-Résultats de la bactériologie :

Sur les 129 échantillons de lait prélevés pour la bactériologie, 65 ont donné lieu à une culture positive sur le milieu de Chapman avec des colonies dorées ,crémeuses , bombées , de 1 à 2 mm de diamètre, lisses , brillantes et entourées d'un halo jaune dû à l'attaque du mannitol .

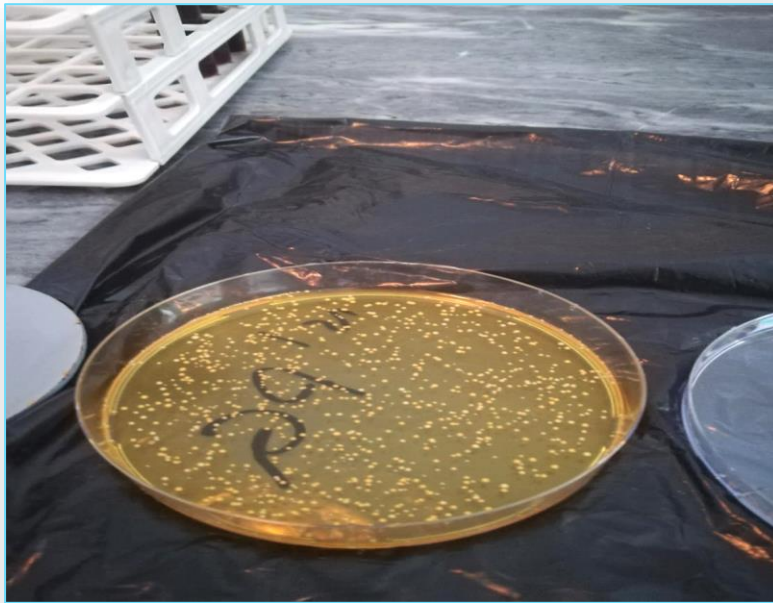
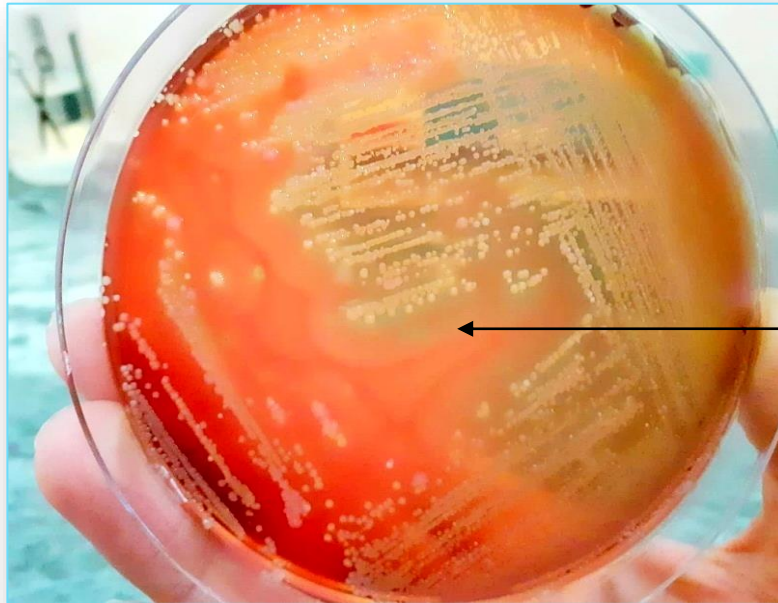


Figure N°22 : Aspect des colonies de *S.aureus* sur le milieu de Chapman (BOUZIDI ,2019).

La purification des isolats nous a permis de choisir 62 souches qui se sont avérées des cocci à Gram positif. Elles sont bêta hémolytiques sur le milieu TSA additionné de 5 % de sang défibriné stérile de mouton. Elles sont catalase positive, Coagulase positive, DNase positive, ce qui a permis de les assigner à l'espèce *Staphylococcus aureus*.



Zone
d'hémolyse
complète (bêta
hémolyse).

Figure N°23 : Aspect des colonies de *S.aureus* sur la gélose au sang frais de mouton (BOUZIDI ,2020).



Figure N°24 : Résultat du test de la catalase (BOUZIDI ,2020).



Figure N°25: Résultat du test de la coagulase libre (BOUZIDI ,2020).

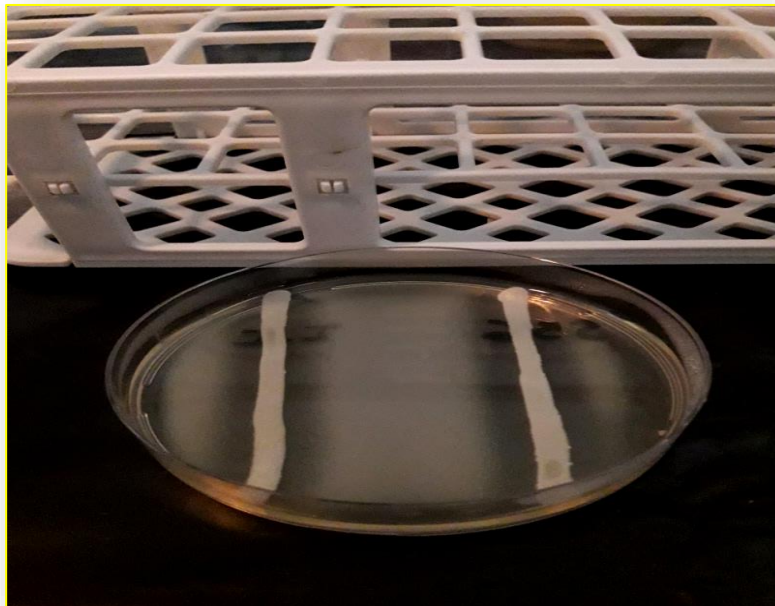


Figure N°26 : Résultat du test de la Dnase (BOUZIDI ,2020).

Compte tenu du nombre d'isolats purs obtenus, *Staphylococcus aureus* est impliqué dans 55% des cas de mammites bovines à caractère subclinique ce qui confirme sa place parmi les pathogènes majeurs.

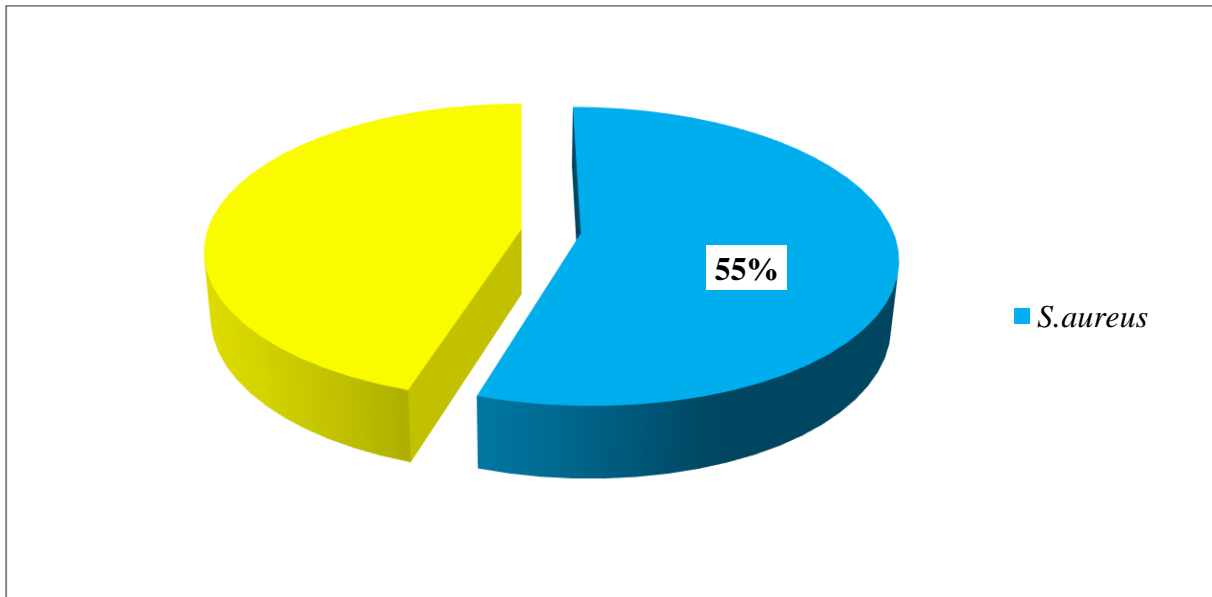


Figure N°27: Taux d'implication des souches de *S.aureus* dans les mammites bovines subcliniques.

Plusieurs études ont également rapporté que *Staphylococcus aureus* est le germe le plus fréquemment isolé lors de mammites bovines subcliniques ; **Seyoum et al., 2018** dans et autour de la ville d'Asella, au sud de l'Éthiopie avec un taux de 47.2% , **Mohey Elhaig et Selim (2014)** à el Ismaïlia en Égypte avec un taux de 39% et **Saidi et al., 2016** dans la région centre de l'Algérie avec un taux de 40%.

S'agissant d'un germe contagieux, *Staphylococcus aureus* est une bactérie dont l'habitat est principalement la mamelle (la peau de la mamelle, celle des trayons ainsi que le tissu glandulaire). Elle est transmise plutôt pendant la traite, une vache infectée contaminant une vache saine par l'intermédiaire des manchons trayeurs ou des mains du trayeur.

Selon **Thieulon (2005)**, la machine à traire, peut en effet infecter 6 vaches qui suivent la traite d'une vache infectée, et enfin l'homme.

En exploitant les constatations relevées à travers l'enquête épidémiologique, la prévalence élevée de *Staphylococcus aureus* est attribuée au fait que la majorité des élevages visités durant notre étude ne pratiquent aucune mesure de prévention des infections mammaires à savoir ; le traitement systématique au tarissement, le trempage des trayons

après la traite, le respect des bonnes conditions d'hygiène au cours de la traite, le respect des bonnes pratiques de traite).

5-Résultats de l'antibiogramme :

À l'aide du test à la céfoxitine, 05 souches sur les 62 isolats de *S. aureus* ont présenté une résistance à la méthicilline soit un taux de 8,06% et 57 souches se sont avérées sensibles à la méthicilline soit un taux de 91,93%.

5-1-Souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM) :

Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline isolées dans notre étude, ont présenté une résistance croisée aux β lactamines qui s'étend à d'autres familles d'antibiotiques (**Tableau N°17**).

Tableau N°17 : résultats de l'antibiogramme des souches SARM.

<i>Antibiotique</i>	<i>R (%)</i>	<i>I (%)</i>	<i>S (%)</i>
<i>Pénicilline</i>	<i>100%</i>	<i>/</i>	<i>00%</i>
<i>Amoxicilline+Acide clavulanique</i>	<i>100%</i>	<i>/</i>	<i>00%</i>
<i>Céfoxitine</i>	<i>100%</i>	<i>/</i>	<i>00%</i>
<i>Erythromycine</i>	<i>60%</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>
<i>Néomycine</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>	<i>60%</i>
<i>Gentamicine</i>	<i>00%</i>	<i>00%</i>	<i>100%</i>
<i>Ciprofloxacine</i>	<i>20%</i>	<i>00%</i>	<i>80%</i>
<i>Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole</i>	<i>20%</i>	<i>00%</i>	<i>80%</i>
<i>Tétracyclines</i>	<i>60%</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>
<i>Bacitracine</i>	<i>00%</i>	<i>/</i>	<i>100%</i>
<i>Clindamycine</i>	<i>60%</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>

Elles se sont avérées résistantes à la pénicilline, à l'association Amoxicilline + acide clavulanique, à l'érythromycine, à la néomycine, à la ciprofloxacine, à l'association Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole, aux tétracyclines, et à la clindamycine.

Par contre la gentamicine, et la bacitracine ont été plus actives sur ces souches exprimant une sensibilité de 100%.

Contrairement à notre étude, **Benhamed (2014)** et **Akkou (2016)** n'ont isolé aucun SARM de mammites bovines en Algérie.

Cependant, **Algammal et al., 2020** ont trouvé que 35,7% des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines subcliniques en Égypte étaient des SARM. Ce résultat est nettement supérieur à celui enregistré dans notre travail.

Turutoglu et al., 2006 ont également rapporté que 17,5 % des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines dans la province de Burdur en Turquie étaient résistantes à la méthicilline. Ces souches ont présenté une résistance de 100% vis-à-vis de la ; Penicillin G, et de 22,2% vis-à-vis de l'Enrofloxacin ce qui s'accorde avec notre étude.

Pour l'association Amoxicilline + acide clavulanique, **Turutoglu et al., 2006** ont trouvé un taux de résistance de 38,9 % qui est nettement inférieur à notre résultat. Pour la Néomycine, le Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole, l'Oxytétracycline, ces derniers ont enregistrés des taux de résistance élevés par rapport à notre étude avec ; 44,4%, 61,1% et 83,3% respectivement.

Contrairement à notre travail, ils ont signalé que 100 % des SARM étaient résistantes à la Gentamicine.

En Finlande, **Gindonis et al., 2013** ont trouvé que 1,5% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mammites bovines étaient des SARM qui sont résistants à la pénicilline (100%), au Triméthoprim (50%) . Ces SARM étaient sensibles à : la tétracycline, l'érythromycine, la clindamycine, et à la ciprofloxacine. Ceci ne s'accorde plus avec notre travail.

Cependant, **Gindonis et al., 2013** ont trouvé que les SARM isolés ont été sensibles à la gentamicine ce qui concorde avec notre étude.

Dans la commune rurale d'Alasora à Madagascar, **Rasolofjoana (2014)** a signalé qu'une souche de *S.aureus* (4%) parmi les souches isolées des cas de mammites bovines était résistante à la méthicilline. Elle était également résistante à la pénicilline G, à l'érythromycine, à la clindamycine, mais avec une sensibilité intermédiaire vis-à-vis de l'association Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole.

Dans une étude réalisée par **Yang et al., 2020** portant sur des souches de *Staphylococcus aureus* isolées des cas de mammites bovines subcliniques en Chine, 14,7% des isolats ont été identifiés comme étant des SARM. Ces SARM étaient résistants à 100% vis-à-vis de la pénicilline et à 98,6% vis-à-vis de la tétracycline.

Contrairement à notre étude, les SARM isolés par ces derniers étaient résistants à 100% vis-à-vis de la gentamicine et sensible à 100% vis-à-vis de l'association Triméthoprim+Sulfaméthoxazole.

Les infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) aggravent le pronostic et compliquent de manière sérieuse la prise en charge des staphylococcies. De ce fait, elles représentent un problème de santé publique majeur (**Gould, 2005**). Ces bactéries sont à l'origine d'infections nosocomiales sévères mais aussi de pathologies communautaires (**Chambers, 2001**).

Cependant, la détection du SARM chez les animaux confirme une fois de plus le risque pour la santé humaine, non seulement pour le consommateur mais aussi pour toutes les personnes qui entrent en contact avec ces animaux (personnel des établissements destinés à l'abattage d'animaux, vétérinaires, éleveurs) (**Maisyama et al., 2014**). En effet, plusieurs études ont rapporté qu'un contact rapproché et répété avec ces animaux est un facteur de risque pour l'acquisition du SARM. Ces individus à risque peuvent alors servir de réservoirs pour le SARM et assurer sa dissémination dans la communauté (**Lekkerkerk et al., 2015**).

Il a été rapporté que les souches SARM associées aux animaux domestiques induisent une endocardite, une pneumonie, des affections des tissus mous et de la peau chez l'homme (**Ekkelenkamp et al., 2006; Witte et al., 2007**).

En matière de sécurité alimentaire, la présence de SARM dans les aliments et notamment dans le lait cru de bovins présente une menace avérée, surtout quand il est consommé cru ou utilisé dans la production fromagère, constituant ainsi une source de contamination pour les produits laitiers transformés (**Crago et al., 2012**).

La résistance d'une souche de *Staphylococcus aureus* à la méticilline s'explique par le fait qu'elle possède le gène *mecA* qui code pour une protéine modifiée la (PLP2a).

La résistance aux antibiotiques des SARM isolés dans notre travail pourrait être expliqué d'une part, par l'accumulation de ces souches de plusieurs mécanismes de résistance (la flexibilité génétique de *Staphylococcus aureus* lui a permis l'acquisition de plusieurs mécanismes) (**Hiramatsu, 2001**), et d'autre part, par une pression de sélection générée par une utilisation irrationnelle des antibiotiques (**Abbanat et al., 2008**).

Les souches SARM sont le plus souvent résistantes à d'autres classes d'antibiotiques (**Speller et al., 1989**), elles sont considérées comme des bactéries multi résistantes, et la résistance à la méticilline est depuis lors utilisée, comme marqueur de multi résistance (**Grohs, 2009**).

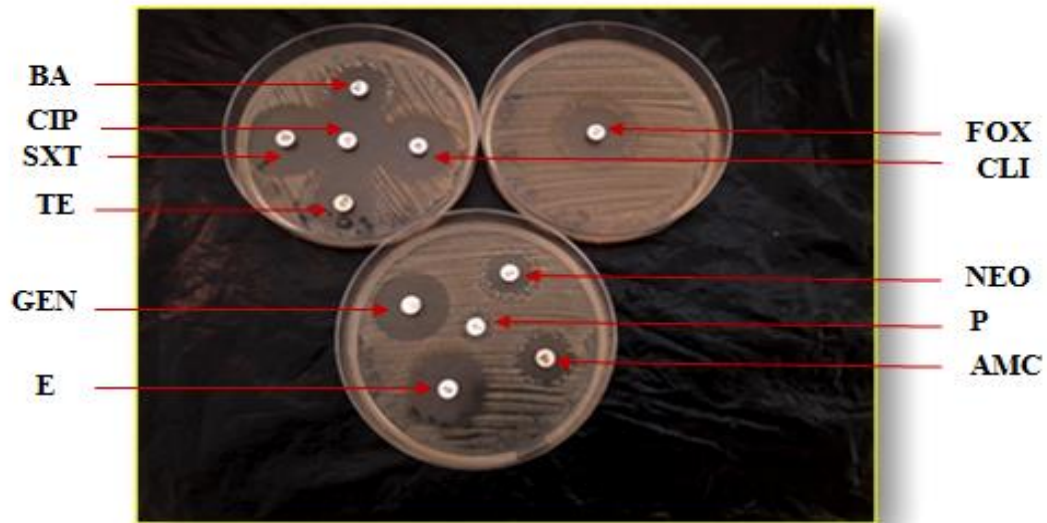


Figure N°28 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SARM (BOUZIDI ,2020).

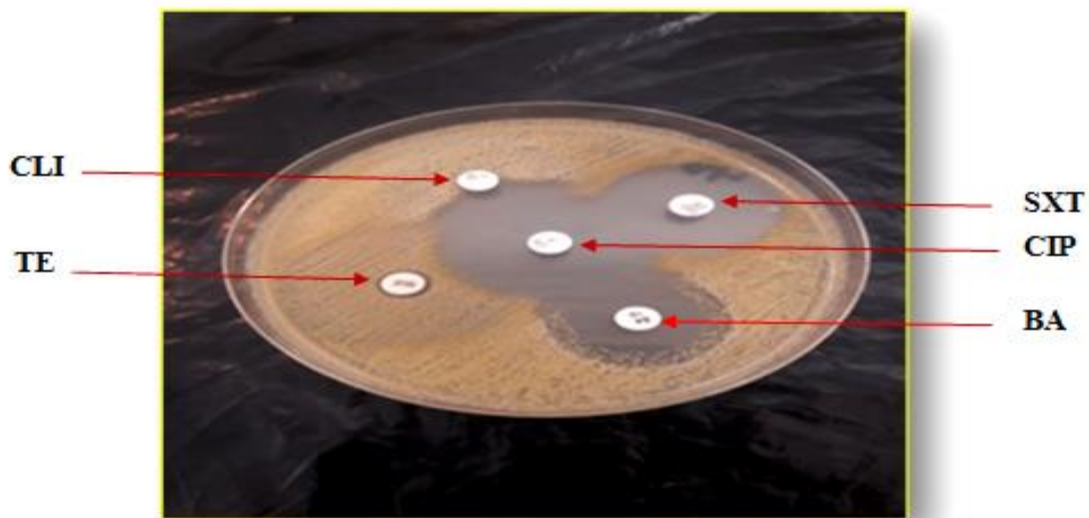


Figure N° 29: Résultat de l'antibiogramme d'une souche SARM (BOUZIDI ,2020).

5-2-Souches de *Staphylococcus aureus* sensibles à la méthicilline (SASM) :

Parmi les souches sensibles à la méthicilline, deux souches (3,50%) sont sensibles à tous les antibiotiques testés, et les souches restantes (96,50%) étaient résistantes à au moins un antibiotique.

Les SASM ont présenté des résistances vis-à-vis de ; la pénicilline (94,73%), l'association amoxicilline+acide clavulanique (42,10%), l'érythromycine (26,31%), la ciprofloxacine (1,75%), l'association Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole (5,26%), les tétracyclines (63,15%), la bacitracine (8,77%) et la clindamycine (14,03%).

Cependant, aucune résistance n'est notée vis-à-vis de la néomycine et de la gentamicine.

Tableau N°18 : résultats de l'antibiogramme des souches SASM.

<i>Antibiotique</i>	<i>R (%)</i>	<i>I (%)</i>	<i>S (%)</i>
<i>Pénicilline</i>	94,73%	/	5,26%
<i>Amoxicilline+Acide clavulanique</i>	42,10%	/	57,89%
<i>Céfoxitine</i>	00%	/	100%
<i>Erythromycine</i>	26,31%	10,52%	63,15%
<i>Néomycine</i>	00%	10,52%	89,47%
<i>Gentamicine</i>	00%	00%	100%
<i>Ciprofloxacine</i>	1,75%	00%	98,24%
<i>Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole</i>	5,26%	00%	94,73%
<i>Tétracyclines</i>	63,15%	00%	36,84%
<i>Bacitracine</i>	8,77%	/	91,22%
<i>Clindamycine</i>	14,03%	15,78%	70,17%

Akkou (2016) a rapporté une résistance des SASM isolées de mammites bovines en Algérie de 86,5% vis-à-vis de la pénicilline, de 4,5% vis-à-vis de l'érythromycine, de 14,9% vis-à-vis des tétracyclines et de 3% vis-à-vis de la clindamycine. Ces résultats sont inférieurs à ceux trouvés dans notre travail.

Pour la gentamicine, le résultat de ce dernier s'accorde avec le notre où aucune résistance n'est notée.

Dans l'étude réalisée en Algérie par **Belmamoun (2016)**, les SASM isolés de vaches atteintes de mammites ont montré une forte résistance vis-à-vis de la pénicilline G et de la tétracycline avec des taux de 80,95 %, 71,43 % respectivement ce qui est cohérent avec les résultats de notre étude où de fortes résistances étaient enregistrées.

Pour la gentamicine, le résultat rapporté par ce dernier est en accord avec notre étude où les isolats étaient sensibles à 100%.

Pour l'association amoxicilline + acide clavulanique, **Belmamoun (2016)** a rapporté un taux de résistance de 14,28% qui est inférieur à notre résultat où la résistance était décelée chez 42,10% des SASM.

Cependant, **Belmamoun (2016)** a rapporté des taux de résistances de l'ordre de ; 4,76%, 14,29%, 28,57% vis-à-vis de ; la ciprofloxacine, la clindamycine et l'érythromycine respectivement. Ce résultat est proche de ce qui est trouvé dans notre travail où les SASM ont présenté des résistances de l'ordre de 1,75%, 14,03% et 26,31% respectivement vis-à-vis des dites antibiotiques.

Pour la néomycine, ce dernier a rapporté une résistance de 14,28% ce qui est discordant avec notre étude où aucune résistance n'est enregistrée.

Pour l'association triméthoprime+ sulfaméthoxazole et la bacitracine, **Belmamoun (2016)** a trouvé que les SASM isolées étaient sensibles à 100%. Ceci est incohérent avec nos résultats où des résistances de l'ordre de ; 5,26%, 8,77% étaient décelées.

El Behiry et al., 2012 ont trouvé que 85,71% des SASM isolées de mammites subcliniques chez les vaches en Allemagne étaient résistantes à la pénicilline G.

Contrairement à notre étude, ces derniers ont rapporté une faible résistance vis-à-vis de la tétracycline (7,14%), une résistance vis-à-vis de la gentamicine (10,71%) et une sensibilité totale vis-à-vis de l'érythromycine.

Sahebkhthiari et al., 2011 ont rapporté que les SASM isolées de mammites subcliniques chez les bovins dans les régions de Mashhad et Tehran en Iran étaient sensibles à la gentamicine. Ce résultat s'accorde avec notre étude.

Cependant, **Sahebkhthiari et al., 2011** ont enregistré que les SASM isolées étaient résistantes à la pénicilline (56%), à la clindamycine (22%), à la tétracycline (22%) et à l'association Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole (2%).

Yadav et al., 2015 ont rapporté à travers leur étude que les SASM isolées de lait mammitieux de bovins étaient sensibles à 100% à la gentamicine et présentant une sensibilité intermédiaire de 12,5% vis-à-vis de la néomycine. Ces résultats s'accordent avec notre travail.

Ces derniers ont également enregistré des résistances de l'ordre de : 6,25%, 18,75%, 31,25%, 18,75%, 37,50% vis-à-vis de ; l'érythromycine, la bacitracine, le triméthoprime, l'oxytétracycline et l'enrofloxacin respectivement.

Dans une étude menée en Inde portant sur des isolats de *S.aureus* causant les mammites bovines, **Mistry et al., 2016** ont mentionné que les souches SASM ont présenté des fortes résistances vis-à-vis de ; l'érythromycine , la clindamycine et la ciprofloxacine avec des taux de l'ordre de 64,10%, 76,92% ,35,89% respectivement.Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux trouvés dans notre travail avec des taux de ;26,31%,14 ,03%, 1,75%.

Pour la tétracycline, ces derniers ont rapporté que les SASM ont présenté un taux de résistance de 41,02%. Ce résultat est inférieur à celui enregistré dans notre étude avec 63,15%.

Cependant, ils ont trouvé que 15,38% des SASM isolés étaient résistantes vis-à-vis de la gentamicine ce qui est incohérent avec notre travail ou aucune résistance n'est notée à l'égard de cet antibiotique.

Étant donné que les antimicrobiens jouent un rôle clé dans les programmes de lutte contre la mammité et que la mammité est la principale cause de l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux laitiers (**Awandkar et al., 2013**), l'utilisation abusive et inappropriée (doses insuffisantes, non-respect de la durée du traitement) de ces molécules a conduit à l'apparition des résistances .

Le taux de résistance élevé vis-à-vis de la pénicilline et de la tétracycline peut être dû à l'administration étendue de ces antimicrobiens dans les fermes laitières (**Jamali et al., 2015**). En plus, il est postulé que la résistance est exacerbée par l'utilisation fréquente des préparations intra-mammaires par les agriculteurs (**Kateete et al., 2013**).

En Algérie, les bêtalactamines, les tétracyclines et les macrolides sont énormément utilisées dans le traitement des mammites ce qui a été déjà constaté par **Boultif (2015)** qui a trouvé à travers l'enquête réalisée à Constantine que les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des mammites par voie intra-mammaire sont : les tétracyclines, les bêtalactamines et les macrolides.

Ben Mahdi et Ouslimani (2009) ont également mentionné que la tétracycline occupe une place prépondérante dans la thérapeutique des élevages laitiers en Algérie.

En menant une enquête auprès des praticiens et des grossistes de médicaments vétérinaires au niveau de la wilaya de Tiaret, **Chaalal (2013)** a trouvé que la tétracycline et l'érythromycine sont utilisées de manière intensive pour le traitement des différentes infections chez les animaux.Ceci est démontré par la résistance enregistrée dans notre étude à l'égard de ces antibiotiques.

Selon **Dumitrescu et al., 2010** , *Staphylococcus aureus* est un pathogène redoutable qui a su développer des résistances à chaque nouvel antibiotique introduit depuis un demi-siècle. La plasticité de son génome lui confère la capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales, et notamment d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulation pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques.

Ainsi, dès 1941 sont apparus les staphylocoques résistants à la pénicilline, grâce à l'acquisition d'une pénicillinase plasmidique, enzyme dégradant la pénicilline. La résistance à la pénicilline, initialement restreinte au milieu hospitalier, a très vite diffusé en milieu communautaire et concerne actuellement plus de 90 % des souches de *S. aureus* (**Dumitrescu et al., 2010**) ce qui peut expliquer en partie la résistance enregistrée dans notre travail vis-à-vis de la pénicilline.

Parmi les SASM isolées, le taux élevé de souches multi résistantes (73,68%) enregistré dans notre étude est inquiétant d'une part par le fait que l'émergence des bactéries multi résistantes confrontera de plus en plus les cliniciens à de réelles impasses thérapeutiques (**Sanders et al., 2011**), et d'autre part par le fait que la transmission de ce type de bactéries de l'animal à l'homme est possible soit par contact direct, soit via la chaîne alimentaire à partir d'aliments et de produits animaux contaminés par ces bactéries (**Petinaki et Spiliopoulou, 2012**).

La sensibilité totale des SASM vis-à-vis de la néomycine et de la gentamicine, peut être justifiée par leur moindre utilisation dans la pratique vétérinaire en Algérie.

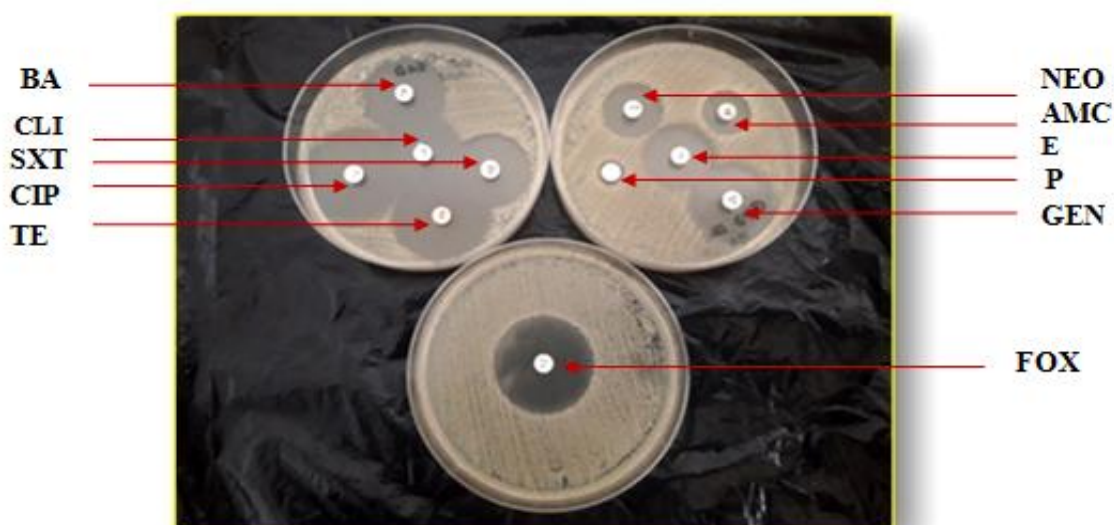


Figure N°30 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SASM (BOUZIDI, 2020).

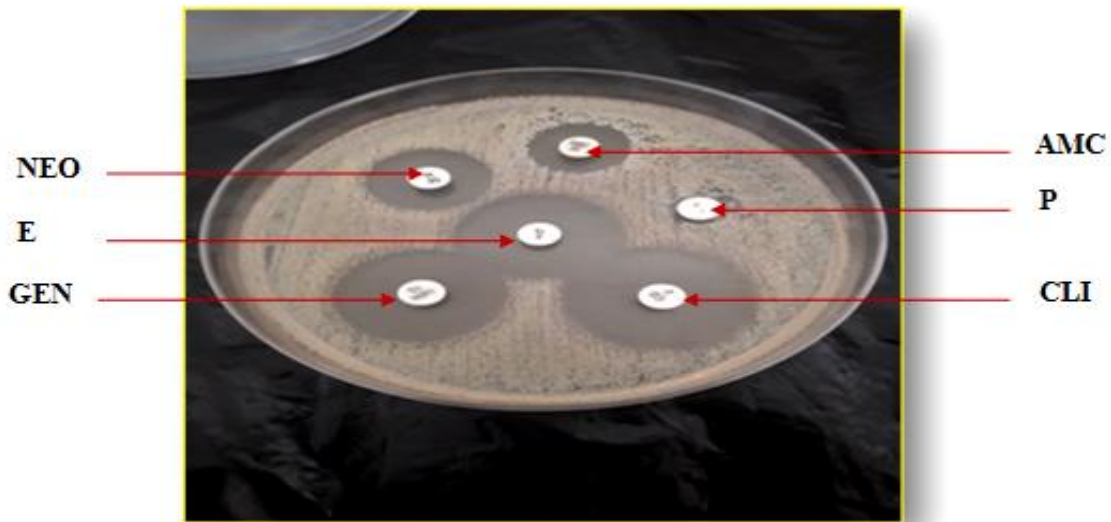


Figure N°31 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SASM (BOUZIDI ,2020).

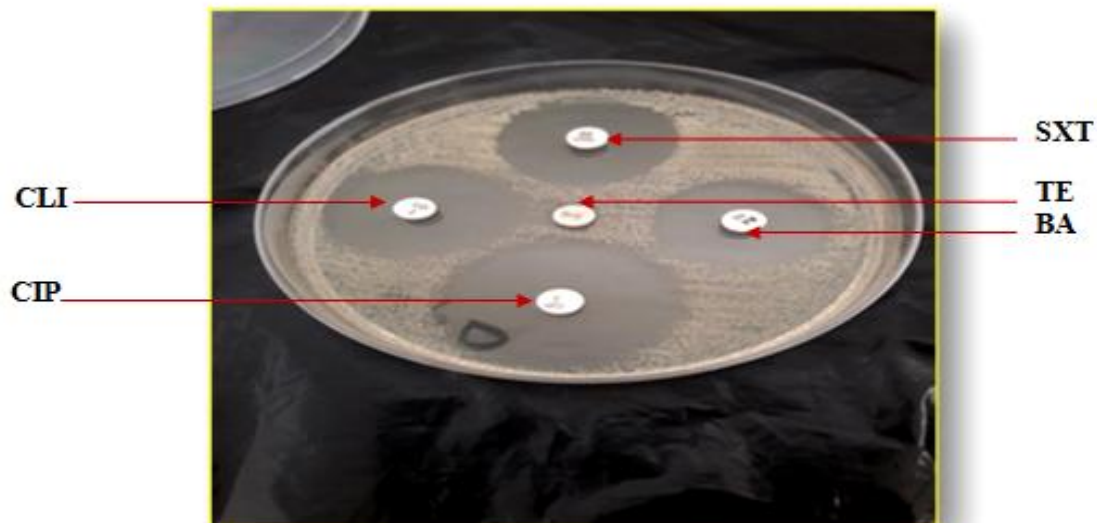


Figure N°32 : Résultat de l'antibiogramme d'une souche SASM (BOUZIDI ,2020).

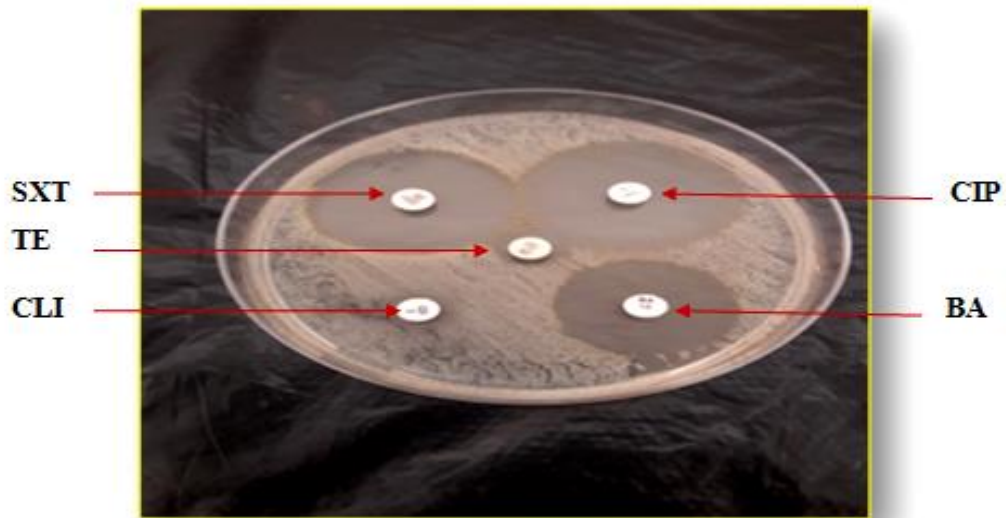


Figure N°33: Résultat de l'antibiogramme d'une souche SARM (BOUZIDI ,2020).

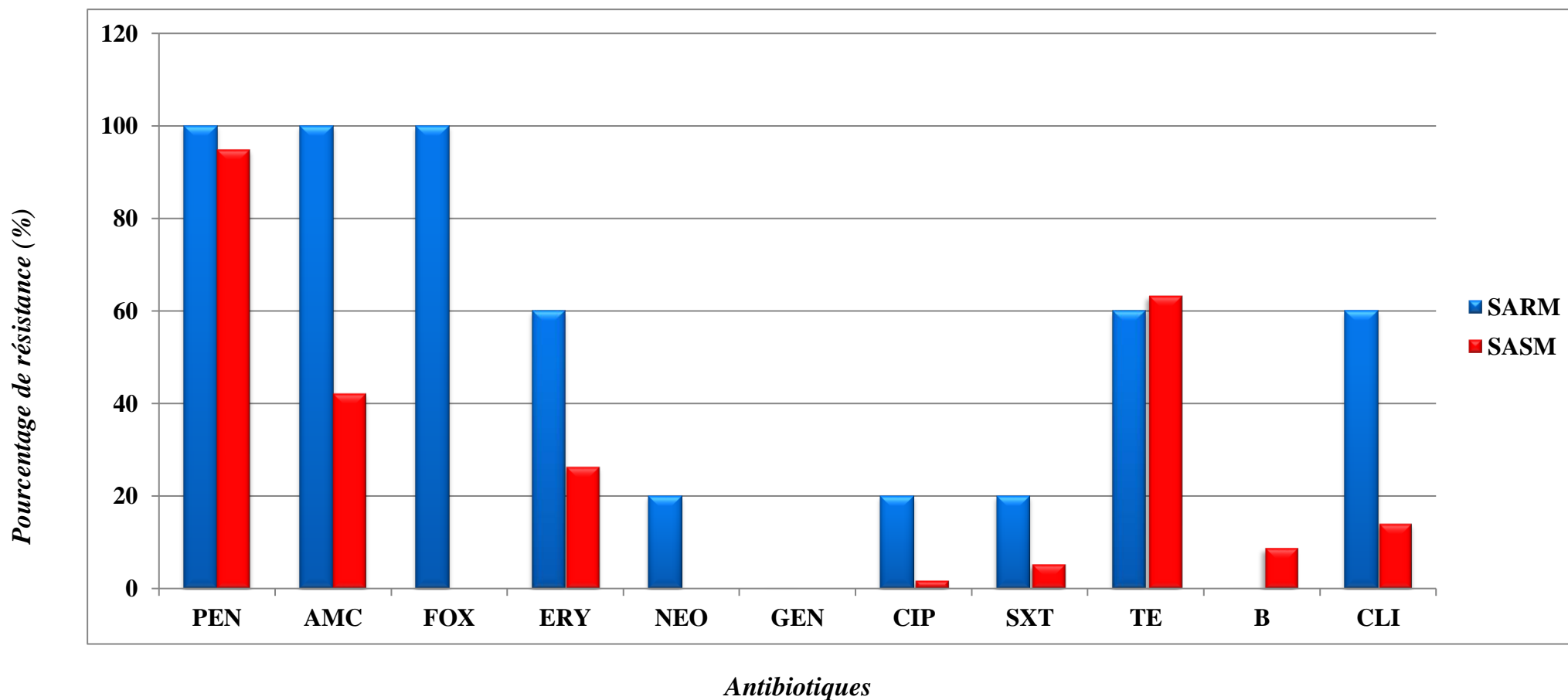


Figure N°34 : Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus*.

PEN : Pénicilline. **AMC**: Amoxicilline+acide clavulanique. **FOX**: Céfoxitine. **ERY**: Erythromycine. **NEO**: Néomycine. **GEN**: Gentamicine. **CIP**: Ciprofloxacine. **SXT**: Triméthoprime +sulfaméthoxazole. **TE**: Tétracycline. **B**: Bacitracine. **CLI**: Clindamycine.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. **SASM** : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline.

6-Résultats de la caractérisation moléculaire des isolats :

Les résultats de la caractérisation moléculaire des isolats sont portés dans le tableau N° 19.

Tableau N° 19 : fréquence des gènes de résistance et de virulence chez les souches de *S.aureus* isolées des mammites bovines subcliniques.

Gène	nuc	mecA (SARM)	blaZ		Tsst1	sea	Luk-M	icaA	icaD
			SARM	SASM					
Fréquence (%)	100	80	20	24,07	00	9.67	00	32.25	29.03

6-1-Résultat de l'amplification du gène "nuc ":

La recherche du gène "nuc" codant la thermo nucléase qui est une DNase restant active après un chauffage de 15 minutes à 100°C a révélé qu'il est présent dans tous les isolats de *S.aureus*.

Notre résultat est similaire à celui annoncé par **Gao et al., 2011** chez des isolats de *S.aureus* originaires de mammites bovines en Chine et à celui rapporté par **Monistero et al.,2018** chez les souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines dans huit pays (l'Argentine, le Brésil, la Colombie, l'Allemagne, l'Italie, l'Etat de New York ,l'Afrique du sud et la Tunisie).

Il est supérieur à celui rapporté par : **Salem-Bekhit et al., 2010** en Égypte avec un taux de 78% chez les souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines et **Belmamoun (2016)** dans la région de Sidi Belabbass en Algérie avec 90,47% chez les souches de *S.aureus* isolées également de mammites bovines.

Le gène "nuc" de *S. aureus* est un bon exemple d'élément génétique utilisé pour identifier cette bactérie (**Bhargava et al., 2011 ; Pu et al., 2009**).

Une fois exprimé, il code un facteur de virulence ; la thermo-nucléase qui provoque la destruction des tissus et la propagation de *S. aureus* (**Sandel et McKillip, 2004 ; Hu et al., 2013**) ce qui favorise la pénétration et l'invasion du tissu mammaire.

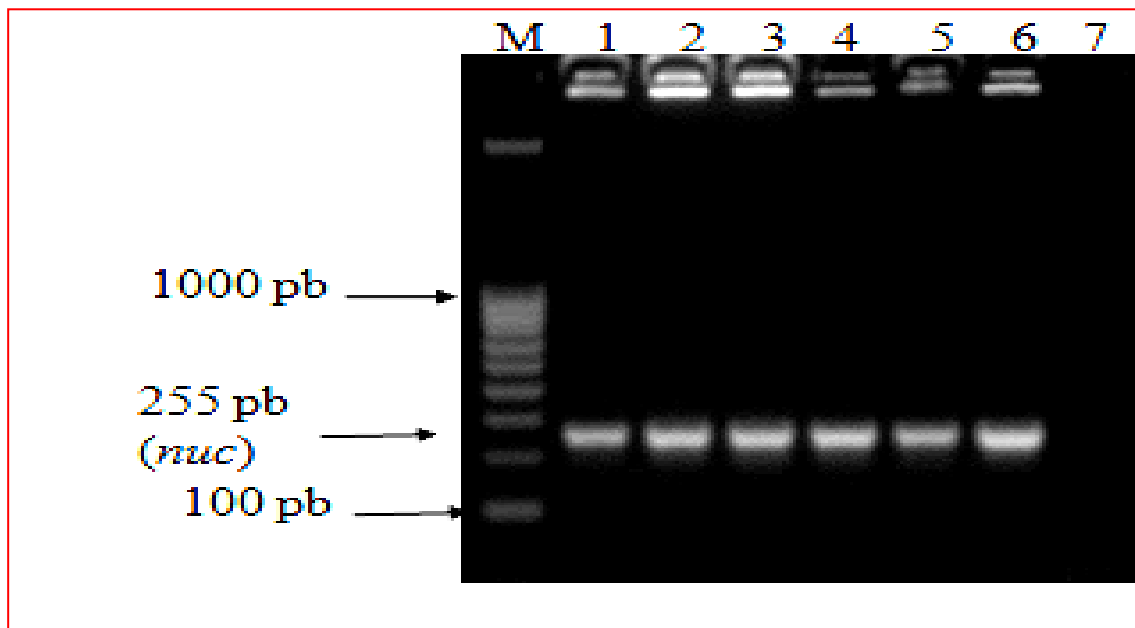


Figure N°35 : Gel représentatif de PCR du gène *nuc* (255 pb) (laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2021).

M: Marqueur de taille 100 pb. **Puit 1:** souche témoin *nuc* positif. **Puits 2 à 6:** souches contenant le gène *nuc* (respectivement: S01, S02, S03, S04, S05). **Puit 7 :** témoin négatif.

6-2-Résultat de l'amplification du gène marqueur de la résistance à la méthicilline "le gène *mec A*":

04 souches (80%) parmi les souches de *S.aureus* détectées phénotypiquement résistantes à la méthicilline dans notre étude hébergent le gène *mec A*.

Ce résultat est inférieur à celui rapporté par d'autres études ; **Saidi et al., 2015** avec un taux de 100% des souches SARM isolées de mammites bovines en Algérie, **Algammal et al., 2020** avec 100% des souches SARM isolées de mammites bovines sub-cliniques en Égypte et **Yang et al., 2020** avec 100 % des souches SARM isolées des cas de mammites bovines sub-cliniques en Chine.

Il est nettement supérieur à celui rapporté par **Hamid et al., 2017** avec 6% des souches SARM isolées de mammites bovines en Inde.

Le gène *mecA* confère la résistance à la méthicilline par production d'une protéine de liaison à la pénicilline modifiée (PBP2a), qui a une faible affinité pour les β -lactamines. Le SARM apparaît lorsqu'une souche de *S.aureus* sensible à la méthicilline acquiert de manière

exogène une cassette chromosomale staphylococcique (SCCmec), transmissible entre espèces staphylococciques en tant qu'élément mobile portant le gène *mecA* (Hanssen et Ericson Solland, 2006).

Tout comme les autres éléments génétiques mobiles, les SCCmec sont des vecteurs de transfert de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds (IWG-SCC, 2009). Ces gènes de résistance peuvent être portés par d'autres éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons) intégrés dans la cassette (IWG-SCC, 2009).

Ceci peut expliquer la multi résistance enregistrée chez les souches SARM isolées dans notre étude.

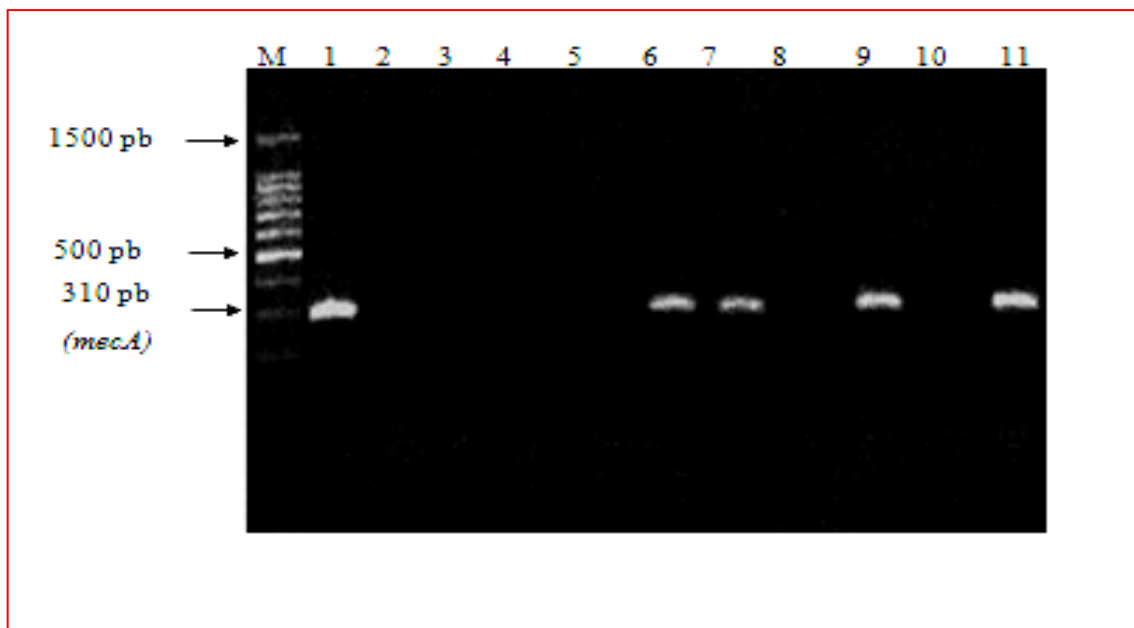


Figure N°36 : Gel représentatif de PCR du gène *mecA* (310 pb) (laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2021).

M: Marqueur de taille 100 pb. **Puit 1:** souche de référence (*mecA* positif). **Puits 2 à 5 et 8:** souches *mecA* négatives. **Puits 6, 7, 9 et 11 :** souches *mecA* positives (respectivement : S09, S46, S53, S57). **Puit 10 :** témoin négatif (tube sans ADN).

6-3-Résultat de l'amplification du gène marqueur de la résistance à la pénicilline "le gène *blaZ* ":

6-3-1-Chez les souches SARM :

Une seule souche (20%) parmi les souches SARM détectées phénotypiquement résistantes à la pénicilline héberge le gène *blaZ*.

Notre résultat est nettement inférieur à celui enregistré dans d'autres études ; **FeBler et al., 2010** avec un taux de 100% des souches SARM isolées de cas de mammites bovines en Allemagne et **Yang et al., 2020** avec 100 % des souches SARM isolées des cas de mammites bovines sub-cliniques en Chine.

6-3-2- Chez les souches SASM :

24,07% des souches SASM détectées phénotypiquement résistantes à la pénicilline hébergent le gène *blaZ*.

Ce résultat est inférieur à celui trouvé par **Delgado et al., 2011** avec un taux de 40% des souches SASM isolées de mammites bovines en Asturies en Espagne.

Il est proche de celui annoncé par **Schmidt et al., 2017** avec un taux de 28,8% des souches SASM isolées de mammites de bovins laitiers sud-africains.

Chez *S.aureus*, le gène *blaZ* code la résistance aux bétalactamines en agissant par inactivation enzymatique (production de bétalactamases qui hydrolysent la liaison peptidique dans le cycle β -lactame). Ce gène réside sur un grand transposon dans un plasmide. En l'absence de pénicilline, la β -lactamase est exprimée à de faibles niveaux (**Lowy, 2003**).

L'absence du gène "*blaZ*" codant les bétalactamases chez 75,92% des souches SASM résistantes phénotypiquement à la pénicilline peut s'expliquer par l'existence probable d'autres mécanismes de résistance.

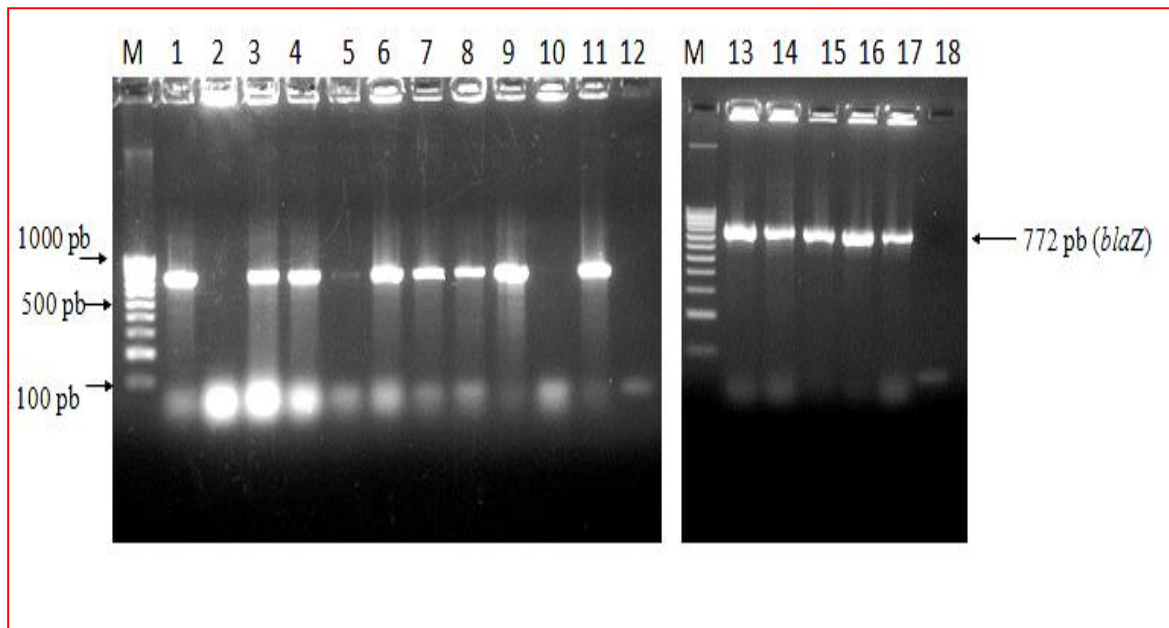


Figure N°37 : Gel représentatif de PCR du gène *blaZ* (772 pb) (laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2021).

M: Marqueur de taille 100 pb. **Puits 1:** souche témoin *blaZ* positif. **Puits 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13 à 17 :** souches contenant le gène *blaZ* (respectivement : S11, S12, S20, S21, S23, S30, S34, S36, S38, S39, S41, S43). **Puits 2, 5, 10, 12:** souches ne contenant pas le gène *blaZ*.

Puit 18 : témoin négatif.

6-4-Résultat de l'amplification du gène "Tsst1" :

Aucun des isolats n'héberge le gène codant la toxine 1 du syndrome du choc toxique.

Ce résultat s'accorde avec celui trouvé dans les études menées par ; **Mello et al., 2016** au Brésil et **Li et al., 2017** en Chine chez des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines.

Cependant, d'autres études ont rapporté la présence dudit gène chez les souches de *S.aureus* impliquées dans les mammites bovines ; **Hoekstra et al., 2020** avec un taux de 8% et **Delgado et al., 2011** avec un taux de 10%.

En effet, la fréquence des souches de *S.aureus* porteuses du gène Tsst-1 provenant de bovins varie considérablement entre pays et troupeaux (**Monistero et al., 2018**).

6-5-Résultat de l'amplification du gène "sea" :

L'amplification du gène codant "l'entérotoxine A" a révélé qu'il est hébergé par 09,67% des souches de *S.aureus* isolées dans notre étude.

Notre résultat est proche de celui annoncé par **Sahebekhtiari et al., 2011** avec un taux de 8% des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines subcliniques en Iran.

Il est inférieur à ceux rapportés par **Reinoso et al., 2008** et **Coelho et al., 2009** avec des taux de ; 53,33%, 71% des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines en Argentine et au Brésil respectivement.

Cependant, d'autres études (**Li et al., 2017**, **Salem-Bekhit et al., 2010**) ont trouvé qu'aucune des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines n'héberge le gène sea.

Le gène codant l'entérotoxine A est porté par un bactériophage (**Le Loir et al., 2003**). Une fois exprimés, Il a été suggéré que les superantigènes, en particulier les entérotoxines, jouent un rôle dans le développement de la mammite, par exemple en créant un environnement attractif pour la colonisation (**Piccinini et al., 2010**) car ils sont plus souvent identifiés chez *S.aureus* isolé de vaches atteintes de mammite que chez des isolats provenant de vaches saines ou de l'environnement (**Piechota et al., 2014**).

L'activité super-antigénique induit une forte activité mitogène des cellules, une libération excessive de cytokines pro inflammatoires, inflammation et dommage tissulaire de la mamelle (**Fang et al., 2019 ; Asao et al., 2003**).

En conséquence, les entérotoxines soutiennent la pathogénèse de *S. aureus*, en compromettant la réponse immunitaire de la glande mammaire et la sensibilité aux antibiotiques, ce qui entraîne l'apparition de nombreuses maladies (**El-Sayed et al., 2006**). D'un point de vue hygiénique, la présence de l'entérotoxine A codé par le gène "sea" pose un problème pour la santé publique . En effet, si des conditions favorables à une multiplication bactérienne importante ainsi qu'à la toxinogénèse se trouvent réunies, l'entérotoxine A s'accumule dans le lait et cause des intoxications alimentaires (**Hennekinne et al., 2010**) . De plus, il est également important de considérer que l'entérotoxine staphylococcique conserve ses activités biologiques et immunologiques même après pasteurisation, transformation des aliments et exposition aux protéases gastro-intestinales (**Asao et al., 2003**).

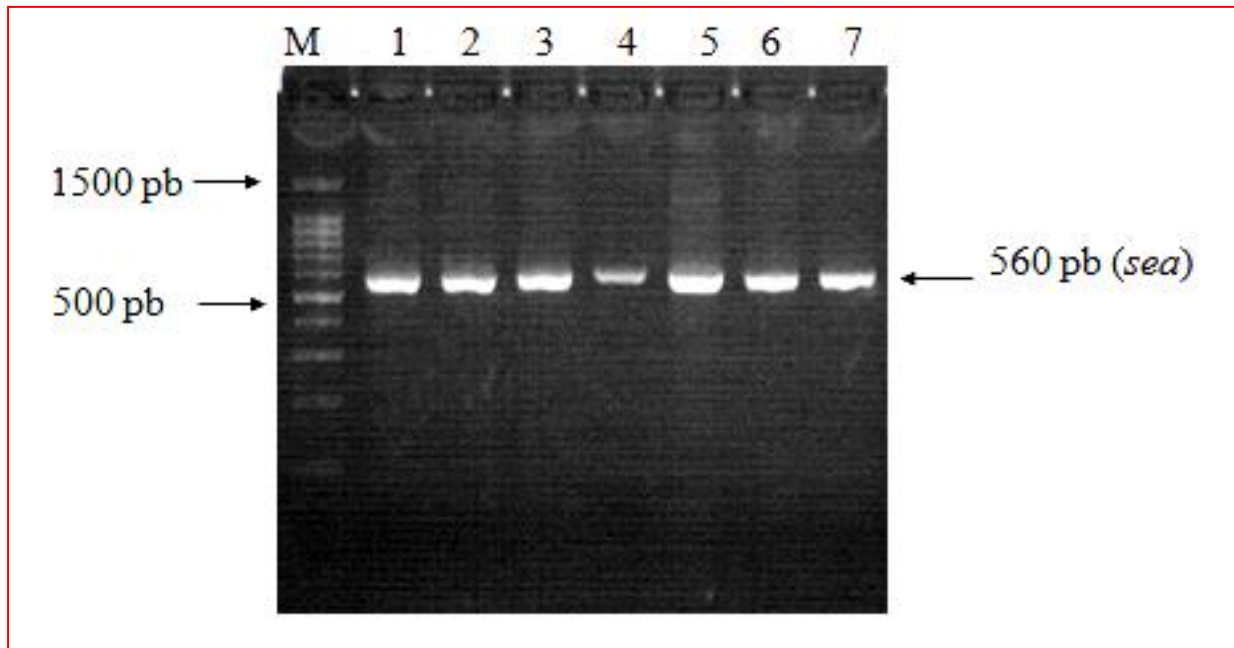


Figure N° 38: Gel représentatif de PCR du gène *sea* (560 pb) (laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2021).

M: Marqueur de taille 100 pb. **Puits 1 à 6:** souches contenant le gène *sea* (respectivement : S13, S14, S24, S26, S46, S48). **Puit 7:** souche de contrôle positif (*sea*+).

6-6-Résultat de l'amplification du gène "luk-M" :

Aucun des isolats de *S.aureus* n'héberge le gène codant la leucocidine M.

Ceci concorde avec l'étude menée en Égypte par **El-Ashker et al., 2020**.

Cependant, d'autres études ont rapporté la présence du gène "luk-M" chez les souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines ; **Delgado et al., 2011**, **Hoekstra et al., 2020** et **Schmidt et al., 2017** avec des fréquences de l'ordre de : 40%, 58%, 56,2% respectivement.

6-7-Résultat de l'amplification des gènes "icaA, icaD" :

6-7-1- le gène "icaA " :

32,25% des souches de *S.aureus* isolées dans notre étude hébergent le gène "icaA ".

Notre résultat est supérieur à celui trouvé par (**Darwish et Asfour, 2013**) avec une fréquence de 15% chez les souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines subcliniques en Égypte.

Il est inférieur à ceux rapportés par ; **Pérez et al., 2020**, **Salina et al., 2020** et **Felipe et al., 2017** avec des taux de ; 98,5 %,82%,100% respectivement.

6-7-2- le gène "icaD " :

Le gène "icaD " a été amplifié chez 29,03% des isolats de *S.aureus* faisant l'objet de notre étude.

Ceci est inférieur aux résultats annoncés par d'autres études ; **Felipe et al., 2017** avec 100% des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines en Argentine, **Pérez et al., 2020** avec 98,5 % des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines au Brésil et (**Darwish et Asfour, 2013**) avec 62,5% des souches de *S.aureus* isolées de mammites bovines subcliniques en Égypte.

Les gènes "icaA ", "icaD " s'ils sont exprimés codent la formation du biofilm protecteur. Le biofilm est composé d'exopolysaccharide, une matrice visqueuse autour de plusieurs couches de cellules. Les mécanismes de formation du biofilm chez *Staphylococcus spp* impliquent la participation de nombreuses classes de protéines et de gènes (**Heilmann ,2011**).

Tout d'abord, les bactéries adhèrent grâce à un antigène capsulaire (le polysaccharide/adhésine). Ensuite, elles se multiplient pour former un biofilm multicouche, qui est associé à la production d'adhésine intercellulaire polysaccharidique (**Cramton et al.,1999 ; Gad et al.,2009**).

La synthèse de l'antigène capsulaire et de l'adhésine intercellulaire polysaccharidique est médiée par l'opéron d'adhésion intercellulaire (ica) formé par les gènes icaA et icaD et un gène régulateur, l'icaR (**Cramton et al.,1999 ; Gad et al.,2009**).

L'expression unique de l'icaA n'induit qu'une faible activité enzymatique, mais la co-expression de l'icaA avec l'icaD conduit à une augmentation significative de l'activité et est liée à l'expression phénotypique du polysaccharide capsulaire (**Gerke et al., 1998**).

La présence des gènes : "icaA ", "icaD " chez 32,25% et 29,03% respectivement des souches de *S. aureus* isolées de mammite bovine subclinique confirme leur rôle potentiel comme facteur de virulence dans la pathogenèse de la mammite subclinique chez les bovins. La formation de biofilm constitue donc une caractéristique particulièrement importante pour faciliter l'adhérence et la colonisation de *S. aureus* à l'épithélium de la glande mammaire, contribuant à l'évasion de défenses immunitaires, la résistance aux antimicrobiens et à des infections récurrentes ou persistantes (**Oliveira et al., 2006**).

De telles caractéristiques expliquent parfaitement la tendance des mammites subcliniques causées par *S.aureus* à devenir chroniques et à persister durant de longues périodes de temps.

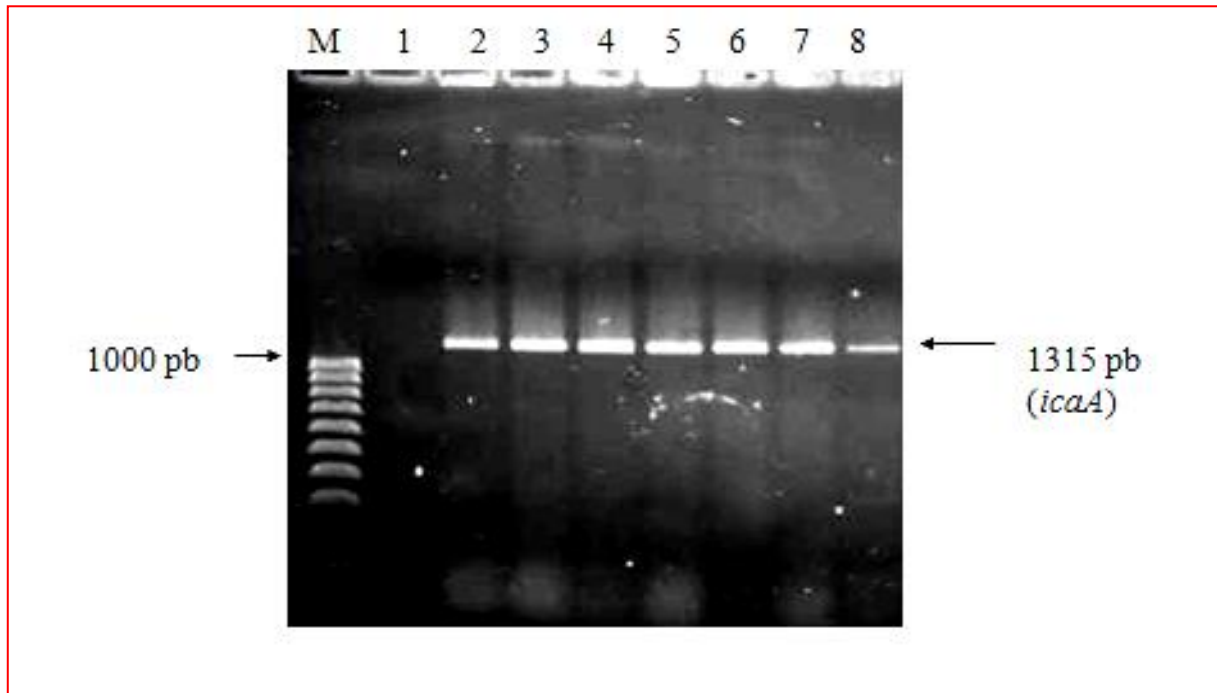


Figure N°39: Gel représentatif de PCR du gène *icaA* (1315 pb) (laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2021).

M: Marqueur de taille 100 pb. **Puit 1:** témoin négatif (tube sans ADN). **Puits 2 à 7:** souches *icaA* positives (respectivement : S01, S02, S03, S04, S05, S15). **Puit 8:** témoin positif.

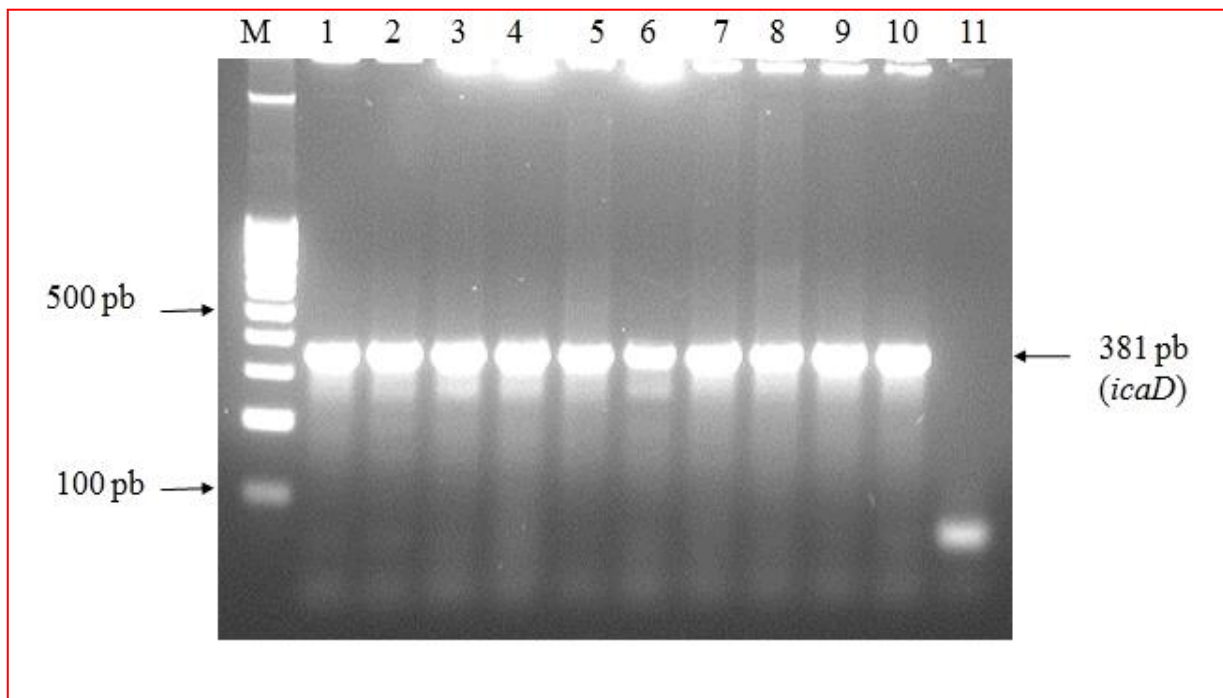


Figure N°40 : Gel représentatif de PCR du gène *icaD* (381 pb) (laboratoire de recherche bactériologique -institut de recherche vétérinaire de Tunis, 2021).

M: Marqueur de taille 100 pb. **Puit 1**: souche témoin *icaD* positif. **Puits de 2 à 10**: souches contenant le gène *icaD* (respectivement : S01, S02, S03, S04, S05, S15, S16, S18, S20). **Puit 11**: témoin négatif.

7-Analyse statistique :

❖ Etude de l'influence du gène sur la résistance de la souche :

Tableau N°20 : Diamètre moyen des résistances pour toutes les souches.

		ERY	PEN	AMC	FOX	ERY	NEO	GEN	CIP	SXT	TE	CLI	BA
Résistante	Moyenne	6,5333	14,5741	16,7083	29,5536	6,5333	/	/	14,0000	6,0000	9,0833	8,50	6,0000
	N	15	54	24	56	15	/	/	1	3	36	8	5
	Ecart type	1,59762	6,17848	1,75646	2,78254	1,59762	/	/		0,00000	2,18272	3,21	0,00000
Sensible	Moyenne	26,3611	/	26,8788	/	26,3611	21,7451	27,0000	32,7857	30,9815	29,0952	26,78	22,7308
	N	36	/	33	/	36	51	57	56	54	21	40	52
	Ecart type	2,45127	/	5,92536	/	2,45127	3,19276	3,51019	3,46785	2,95559	4,99905	3,42	4,36167
Intermédiaire	Moyenne	20,3333	30,3333	/	/	20,3333	16,6667	/	/	/	/	17,56	/
	N	6	3	/	/	6	6	/	/	/	/	9	/
	Ecart type	1,86190	2,30940	/	/	1,86190	0,81650	/	/	/	/	2,07	/
Total	Moyenne	20,5088	15,4035	22,5965	29,5536	20,5088	21,2105	27,0000	32,4561	29,6667	16,4561	22,75	21,2632
	N	57	57	57	56	57	57	57	57	57	57	57	57
	Ecart type	8,89045	6,99454	6,85529	2,78254	8,89045	3,41079	3,51019	4,24294	6,31985	10,33211	7,41	6,33450

L'analyse de la variance a fait ressortir une valeur de p égale à **0,021**. Cette valeur est inférieure au seuil de signification "0,05" ce qui indique un résultat significatif.

❖ **Table d'ANOVA :**

ANOVA

Souche

	Somme des carrés	ddl	Carré moyen	F	Sig.
Intergroupes	3090,098	4	772,525	2,940	0,02103721
Intragroupes	69099,824	263	262,737		
Total	72189,922	267			

Codification

22	nuc
33	mecA
44	luk-M
55	icaD
66	icaA
77	blaZ
88	Tsst1
99	sea

❖ **Table du test LSD :****Comparaisons multiples :**

Variable dépendante:

LSD

(I) gène		Différence moyenne (I-J)	Erreur standard	Sig.	Intervalle de confiance à 95 %	
					Borne inférieure	Borne supérieure
22,00	55,00	-1,533	2,776	0,581	-7,00	3,93
	66,00	-0,829	2,685	0,758	-6,12	4,46
	77,00	-8,881*	2,95873024	0,00294332	-14,7069113	-3,05528382
	99,00	5,458	4,923	0,269	-4,24	15,15
55,00	22,00	1,533	2,776	0,581	-3,93	7,00
	66,00	0,704	3,198	0,826	-5,59	7,00
	77,00	-7,348*	3,431	0,033	-14,10	-0,59
	99,00	6,991	5,221	0,182	-3,29	17,27
66,00	22,00	0,829	2,685	0,758	-4,46	6,12
	55,00	-0,704	3,198	0,826	-7,00	5,59
	77,00	-8,052*	3,358	0,017	-14,66	-1,44
	99,00	6,287	5,173	0,225	-3,90	16,47
77,00	22,00	8,881*	2,95873024	0,00294332	3,05528382	14,7069113
	55,00	7,348*	3,43077219	0,03313055	0,59265817	14,1032104
	66,00	8,052*	3,35763582	0,01717161	1,44112507	14,6636626
	99,00	14,339*	5,32005324	0,00748459	3,8641132	24,8147486
99,00	22,00	-5,458	4,923	0,269	-15,15	4,24
	55,00	-6,991	5,221	0,182	-17,27	3,29
	66,00	-6,287	5,173	0,225	-16,47	3,90
	77,00	-14,339*	5,320	0,007	-24,81	-3,86

*. **La différence moyenne est significative au niveau 0.05.**

Le test (LSD) de comparaisons multiples indique que le gène blaZ a une influence significative sur l'apparition de la résistance chez les souches étudiées.

Conclusion

À la lumière de notre étude, nous avons conclu que la mammite bovine subclinique reste la pathologie la plus fréquente et la plus redoutable qui entraîne des pertes dans nos élevages laitiers.

Parmi les germes impliqués, *Staphylococcus aureus* occupe une place prépondérante de par son pouvoir pathogène ainsi que par son caractère contagieux.

Le contrôle des mammites subcliniques joue un rôle incontournable dans la préservation et l'amélioration de la santé du pis parce que ;

- ❖ Les vaches infectées et sans signes cliniques présentent des réservoirs de bactéries qui peuvent générer de nouvelles infections chez d'autres vaches.
- ❖ La plupart des infections mammaires cliniques débutent de manière subclinique.

Pour en faire, le test CMT reste le moyen le plus facile, le plus rapide et le moins coûteux qui peut donner une image précise sur le statut sanitaire de la mamelle.

L'ignorance des simples gestes de prévention de mammites par les éleveurs constitue les facteurs de risque favorisant l'apparition de la maladie.

La détection des SARM ayant comme support génétique de résistance à la méthicilline le gène *mecA*, chez les vaches atteintes de mammites subcliniques confirme encore une fois le rôle que jouent les animaux de rente dans l'épidémiologie de ces souches.

L'enregistrement de fortes résistances vis-à-vis des antibiotiques usuels ainsi que la fréquence élevée de souches multi résistantes parmi les SARM et les SASM témoignent de l'évolution spectaculaire qu'a connue le phénomène de l'antibiorésistance.

La caractérisation génotypique des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de mammites bovines subcliniques nous a permis de confirmer que ces souches sont dotées de moyens de pathogénicité. Les gènes dominants chez les isolats sont : le gène *nuc* leur permettant de détruire et d'envahir le tissu mammaire et les gènes : *icaA*, *icaD* leur permettant d'éviter le système immunitaire et l'action des antibiotiques, ce qui résulte dans la plupart des temps en des infections persistantes et difficiles à traiter.

Or, la prédominance de ces gènes met en évidence leur rôle dans la pathogénèse de la mammite bovine subclinique.

La détection du gène codant l'entérotoxine A même à faible fréquence, renforce l'inquiétude en matière de santé publique, liée à l'émergence des souches productrices de ladite toxine et à leur capacité de diffusion rapide chez l'homme.

Devant des souches multi résistantes et/ou porteuses du gène codant l'entérotoxine A qui préserve ses propriétés biologiques même après pasteurisation, le consommateur est exposé à un risque potentiel.

La connaissance des caractéristiques des lignées génétiques de *S.aureus* circulantes parmi la population de vaches atteintes de mammite subcliniques permet d'examiner l'épidémiologie de ce micro-organisme qui pourrait aider à formuler des stratégies visant à réduire la propagation de l'infection et pour des traitements ciblés.

Là encore, une bonne connaissance des gènes dominants portés par les souches de *S. aureus* impliquées dans la mammite bovine subclinique accorderait sans doute de bonnes pistes pour trouver les meilleures cibles possibles et par conséquent développer des approches thérapeutiques telles que la vaccination et l'antibiothérapie.

Recommandations :

✚ Il faut instaurer une politique défensive contre les mammites au sein de nos élevages laitiers qui doit passer par ; la vulgarisation de bonnes pratiques d'élevage, surtout liée à la propreté des animaux, de leur environnement immédiat et aussi à la salubrité de la traite (du trayeur et de la machine à traire). Cela suppose un encadrement zootechnique de tous les éleveurs.

✚ Sensibilisation des éleveurs par l'importance de l'utilisation du CMT pour détecter précocement toute infection mammaire ainsi que du traitement pendant le tarissement.

✚ Dans le souci de lutter contre le phénomène de l'antibiorésistance et de préserver durablement l'arsenal thérapeutique existant, Il faut recourir à une utilisation rationnelle des antibiotiques en médecine vétérinaire et ce par une réduction quantitative ainsi qu'une amélioration qualitative dans leur choix. Ceci nécessite un antibiogramme avant tout usage. Aussi pour diminuer l'usage des antibiotiques chez les animaux domestiques, il faut trouver des alternatifs comme ; les produits naturels, les probiotiques et les huiles essentielles.

✚ Ainsi, en raison de la grande importance des entérotoxines en santé animale et publique, il est essentiel d'augmenter la connaissance de leur fréquence, de leur distribution ainsi que le développement d'outils utiles pour la détection de routine de ces toxines dans le lait et les produits qui en découlent.

Références bibliographiques

- 01- **Abbanat D., Macielag M., Bush K (2008)**. New agents in development for the treatment of bacterial Infections. *Current Opin Pharmac*; 8:582–592.
- 02- **Abrahmsén M., Persson Y., Kanyima B M., Båge R (2014)**. Prevalence of subclinical mastitis in dairy farms in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Trop Anim Health Prod* .46:99–105.
- 03- **Accarias. S (2014)**. Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'université de Toulouse en immunologie et maladies infectieuses.212 p.
- 04- **Agnoletti F., Mazzolini E., Bacchin C., Bano L., Berto G., Rigoli R., Muffato G., Coato P (2014)**. First reporting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. *Vet. Microbiol*. 170:172-77.
- 05- **Akkou M., Antri K., Bachtarzi M-A., Bes M., Tristan A., Dauwalder O ., Kaidi R. , Meugnier H ., Tazir M ., Etienne J., Laurent F et Ramdani-Bouguessa N (2016)**. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bovine Mastitis and Nasal Carriage of Workers in Contact to Animals in Algeria. *Pak Vet J*, 36(2): 184-188.
- 06-**Alexandre A (2005)**. Utilisation des comptages cellulaires dans la comparaison de deux préparations hors lactation. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. ENV de Lyon ; 94 p.
- 07- **Algammal A M., Enany M E ., El-Tarabili R M ., Ghobashy M O I and Helmy Y A (2020)**. Prevalence, Antimicrobial Resistance Profiles, Virulence and Enterotoxins-Determinant Genes of MRSA Isolated from Subclinical Bovine Mastitis in Egypt.*Pathogens*, 9, 362; doi: 10.3390/pathogens 9050362.
- 08- **Allain M (2011)**. Etude descriptive de l'identification des bactéries du lait dans un élevage à l'aide de la bactériologie, des comptages cellulaires de tank (CCT) et des comptages cellulaires individuels (CCI). Thèse pour le doctorat vétérinaire. ENV D'Alfort. 122 p.
- 09- **Amellal R (1995)**. La filière lait en Algérie : entre l'objectif de la sécurité alimentaire et réalité de la dépendance. *Options Méditerran.*, Sér. B: N°14.
- 10- **Ananthanarayan R., Paniker C.K (2006)**. Textbook of Microbiology. Edition Seventh, India. 665pages.
- 11-**Anderson J. E., Beelman R.R., Doores S (1996)**.Persistence of serological and biological activities of staphylococcal enterotoxin A in canned mushrooms.*J. Food. Prot.* 59, 1292–1299.

- 12- **Angoujard P. L (2015)**. Enquête sur le diagnostic et le traitement des mammites de la vache laitière par les vétérinaires de terrain en France. Thèse pour le doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort, 113 P.
- 13- **Anonyme 2 (2016)**. Mastitis Control and Management Mastitis Part 4 - Detecting and Treating Clinical Mastitis.NADIS Ltd.
- 14- **Aouati H (2009)**. Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes. Université Mentouri. Constantine.
- 15-**Armand-Lefevre L., Ruimy R., Andremont A (2005)**. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. Emerg Infect Dis. 11: 711–714.
- 16-**Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S (2003)**. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. J. Epidemiol. Infect 130, 33-40.
- 17- **Asperger H., Zangerl P (2011)**. *Staphylococcus aureus* - Dairy, in: *Encyclopedia of dairy sciences 2nd Edition, Four-Volumeset*. Academic Press, Kidlington, United Kingdom. 111-116.
- 18-**Avril J.L., Dabernat H., Denis F and Monteil H (2003)**. Bactériologie clinique. 3^{ème} édition.ellipses, Paris. 8-28.
- 19- **Awandkar S.P., Bhikane A.U and Kulkarni M.B (2013)**. Antibiotic resistance trends in clinical bovine mastitis. Biolife 1:139-143.
- 20- **Baggett H.C., Hennessy T.W., Rudolph K et al (2004)**. Community-onset methicillin resistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton-Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. J Infect Dis. 189:1565-1573.
- 21- **Baillet M (2009)**. Les principales urgences médicales chez les bovins. Thèse pour le doctorat vétérinaire. ENV D'Alfort. 222 p
- 22- **Balaban N., Rasooly A (2000)**. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 61, 1–10.
- 23-**Barone R (1968)**. *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 4, Splanchnologie II*. Vigot Frères, Paris, France .896 p.
- 24-**Batard É., El Kouri D., Potel G (2007)**. Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. EMC - Maladies infectieuses: 1-8.

- 25- **Becker K., Friedrich A.W., Lubritz G., Weilert M., Peters G., Von Eiff C (2003).** Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. J Clin Microbiol. 41(4):1434-1439.
- 26- **Belmamoun A R (2016).** Étude microbiologique, épidémiologique et antibiorésistance du *Staphylococcus aureus* dans le lait de vache atteinte de mammite. Thèse de doctorat en sciences. Université djillali liabes–Algérie-160p.
- 27- **Bendahou A., Abid M., Bouteldoun N., Catelejine D., Lebbadi M (2009).** Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, Iben and jben, in northern Morocco. J. Infect. Developing Countries 3(3), 169-176.
- 28- **Benhamed N (2014).** Evaluation de la qualité microbiologique et sanitaire du lait cru dans la région d’Oran, Algérie : Etude du profil moléculaire virulent des *Staphylococcus aureus* impliquées dans les mammites bovines. Thèse De Doctorat Troisième Cycle (Lmd) en Microbiologie Appliquée Option : Contrôle microbiologique et Hygiène alimentaire- université d’Oran –Algérie-.
- 29- **Benhamou D., Carrié A.S., Lecomte F (2005).** *Staphylococcus aureus*: role and impact in the treatment of nosocomial pneumonia. Rev Mal Respir; 22: 595–603.
- 30- **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. Ann. Méd. vét. 147 : 41-47.
- 31- **Ben Mahdi M.H et Ouslimani S (2009).** Mise en évidence de résidus d’antibiotiques dans le lait de vache produit dans l’algérois. European Journal of Scientific Research vol.36 n°3. p: 357-362.
- 32- **Berche P (2016).** Histoire de la biologie moléculaire. Feuillet de Biologie/N° 333, p 49.
- 33- **Berthelot X., Bergonier D (2001).** La maîtrise des mammites cliniques en prépartum : une nouvelle priorité, épidémiologie descriptive et diagnostic. Le Nouveau Praticien Vétérinaire. 1 ,17-21.
- 34- **Betelli L (2013).** Développement et évaluation d’une méthode fondée sur la PCR en temps réel pour la caractérisation des bioaérosols : application au groupe des actinomycètes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l’Université de Bourgogne Discipline : Sciences Vie. Université De Bourgogne.
- 35- **Bhargava K et al (2011).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in retail meat, Detroit, Michigan, USA. Emerging Infectious Diseases. 17(6): p. 1135-7.

- 36- **Bhatia A., Zahoor S (2007)**. *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 3:188-197.
- 37- **Blowey R.W., Edmondson P (2010)**. *Mastitis control in dairy herds*. Seconde édition. CABI, Wallingford, United Kingdom. 272p.
- 38- **Bosquet G (2004)**. L'analyse lors d'une flambée de mammites cliniques : une étape indispensable- riche d'enseignement. *Journées Nationales G.T.V* : 771-778.
- 39- **Bosquet G., Faroult B., Labbé J-F., Le Page P., Sérieys F (2013)**. *Référentiel Vétérinaire pour le traitement des mammites bovines*. SNGTV, Paris, France. 100 p.
- 40-**Boufaïda Asnoue Z., Butel M.J., Ouzrout R (2012)**. Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au nord-est de l'Algérie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 65 (1-2) : 5-9.
- 41- **Boufaïda Asnoue Z., Asnoue B., Butel M.J., Ouzrout R (2016)**. Etiologie des mammites subcliniques en élevages bovins laitiers du nord-est de l'Algérie. *Renc. Rech. Ruminants*, 23. P 318.
- 42-**Boultif L (2015)**. Détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (HPLC), thèse de Doctorat: Université Mentouri Constantine, Algérie, 156.
- 43- **Bouزيد R., Hocine A., Maïfia F., Rezig F., Ouzrout R et Touati K (2011)**. Prévalence des mammites en élevage bovin laitier dans le Nord-Est algérien. *Livestock Research for Rural Development* 23 (4).
- 44- **Bradley A. J et al (2004)**. The importance of the nonlacting period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention, *Vet. Clin. Food Anim*, 20: p547-568.
- 45- **Brenes J.A., Goswami U., Williams D.N (2012)**.The association of septic thrombophlebitis with septic pulmonary embolism in adults. *OpenRespirMedJ*; 6:14.
- 46- **Bronner S., Monteil H., Prévost G (2004)**. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* .28(2):183-200.
- 47-**Buckingham SC., McDougal LK., Cathey LD et al (2004)**. Emergence of community associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr Infect Dis J*. 23:619-624.
- 48- **Cavé H., Acquaviva C., Bièche I., Brault D., de Fraipont F., Fina F., Loric S., Maisonneuve L., Namour F., Tuffery S (2003)**. La RT-PCR en diagnostic clinique. *Annales de biologie clinique*. Novembre-Décembre ; volume 61, N°6 :635-44.

- 49- **Chaalal .W (2013)**. Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* isolés de produits alimentaires. Mémoire de Magister, Option: Microbiologie Fondamentale et Appliquée. Université d'Oran-Algérie-.
- 50- **Chambers HF (2001)**. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*; 7: 178-82.
- 51- **Chambers HF., DeLeo FR (2009)**. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*; 7:629–641.doi:10.1038/nrmicro2200
- 52- **Chassagne M., Barnouin J., Bazin S., Le Guenic M (2003)**. Pratiques d'hygiène de traite associées aux très bas scores cellulaires du lait au travers du programme national « Objectif Zéro Mammite ». *Renc.Rech.Ruminants*, 10.
- 53- **Cheng AG., McAdow M., Kim HK., Bae T., Missiakas DM., Schneewind O (2010)**. Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. Cheung A, editor. *PLoS Pathog*; 6:e1001036.doi:10.1371/journal.ppat.1001036.
- 54- **Child J., Andrews J., Boswell F et al (1995)**. The in-vitro activity of CP 99,219, a new naphthyridone antimicrobial agent: a comparison with fluoroquinolone agents. *J Antimicrob Chemother* ; 35(6):869–876.
- 55- **Clerentin R (2014)** . La gestion du tarissement de la sécrétion lactée chez la vache laitière. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. VETAGRO SUP Campus vétérinaire de Lyon.151 p.
- 56- **CLSI (2011)**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21. Vol. 31. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 57- **Coelho S.M.O., Reinoso E., Pereira I.A., Soares L. C., Demo M., Bogni C and Souza M.M.S (2009)**. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras*, 29(5):369-374.
- 58- **Collectif (2008)**. Résistance des micro-organismes aux agents antibactériens. *In Le Manuel Vétérinaire Merck*. 3rd Edition d'Après, 2053–2054.
- 59- **Constant (2014)**. *Les mammites : introduction, immunité et germes pathogènes*, Cours magistral. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique de production laitière, 39 p.
- 60- **Couture B (1990)**. Bactériologie médicale «Étude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.
- 61- **Crago B., Ferrato C., Drews S.J., Svenson L.W., Tyrrell G., Louie M (2012)**. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food

samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. *Journal of Food Microbiology* 32, 202-205.

62- **Cramton SE., Gerke C., Schnell NF., Nichols WW., Götz F (1999)**. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* ;67:5427-33.

63- **Crevier-Denoix N (2010)**. *Anatomie de la mamelle des Ruminants*, Cours magistral. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques, 10 p.

64- **Cuny C., Friedrich A., Kozytska S., Layer F., Nübel U., Ohlsen K., Strommenger B., Walther B., Wieler L., Witte W (2010)**. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *Int J Med Microbiol*. 300: 109–117.

65- **Darwish S F and Asfour H .A.E (2013)**. Investigation of Biofilm Forming Ability in Staphylococci Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assay. Hindawi Publishing Corporation. *The Scientific World Journal*. Article ID378492, 9 pages.

66- **Davido B (2010)**. Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré .Thèse de doctorat. Université Denis Diderot (Paris VII). Faculté de médecine. Paris 7.

67- **D'costa Vm., King Ce., Kalan L., Morar M., Sung WWL., Schwarz C et al (2011)**. Antibiotic resistance is ancient .*Nature* 477,457-461.

68- **Debreil E (2008)**. Les analyses bactériologiques du lait des infections mammaires bovines applicables au cabinet vétérinaire en pratique courante et leurs intérêts dans le traitement des mammites. Thèse pour le doctorat vétérinaire. École nationale vétérinaire d'alfort. 103 p.

69- **De Cremoux R (2010)**. Mammites : Détection et traitements. FRGTV Pour le groupe Qualité du lait du Sud-Ouest. Publié le jeudi 25 novembre.

70- **De Cremoux R., David V., Roussel P., Lamoureux B., Mercier P., Vidard T(2013)**. Le CMT ou test au Teepol, institut de l'élevage.

71- **Degueurce C (2004)**. *Anatomie de la mamelle des Ruminants*, Dissection des Ruminants et cours magistral. Polycopié. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques, 4 p.

72- **Delgado S., Garcia P., Fernandez L., Jimenez E., Rodriguez -Banos M., Del Campo R, and Rodriguez J.M (2011)**. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62, 225–235.

- 73- Denis F., poly M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R (2007). Bacteriologie médicale: techniques usuelles. Edition Elsevier Masson. pp 27-251.
- 74- Diarra A.S (2014). Étude comparative de la PCR classique et de la PCR en temps réel dans le diagnostic des méningites dues à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* de type b. Thèse Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'État). Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako-Mali.114 p.
- 75-Di Giannatale E., Vincenza P., Alfreda T., Cristina M., Giacomo M (2011). Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. Veterinaria Italiana, 47(2), 165-173.
- 76-Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Rev. 13, 16–34.
- 77- Dominique R (2010). Les mammites. ISBN 978-2-85557-171-3- Groupe France Agricole .261 p.
- 78- Downer R., Roche F., Park PW., Mecham RP., Foster TJ (2002). The elastin-binding protein of *S.aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. J Biol Chem ; 277 (1) : 243-250.
- 79-Dufour P., Gillet Y., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Floret D., Etienne J., Richet H (2002). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis. 35(7):819-24.
- 80-Dumas P.L., 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, France, 71-75.
- 81- Dumitrescu O., Dauwalder O., Boisset S., Reverdy M-E., Tristan A., Vandenesch F (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* .Les points-clés en 2010.MEDECINE/SCIENCES ; 26 : 943-949.
- 82- Durel L., Faroult B., Lepoutre D., Brouillet P., Lepage Ph (2004). Mammites 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.
- 83- Durel L., Faroult B., Lepoutre D., Brouillet P., Le Page P (2004). Mammites des bovins (cliniques et subcliniques). Démarches diagnostiques et thérapeutiques. *Supplément technique, Dépêche Vétérinaire*, 87, 42 p.

- 84- **Durel L Et Poutrel B (2006)**. Le diagnostic bactériologique des mammites par le vétérinaire praticien, solutions pratiques et limites. Bulletin des GTV, 33, p. 43-53.
- 85-**Durel L., Guyot H., Théron L (2011)**. *Vade-mecum des mammites bovines*. Éditions Med'Com, Paris, France. 270 p.
- 86- **Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schkeufer KH., Stackebrandt E (2006)**. The Prokaryotes: Bacteria:Firmicutes, Cyanobacteria.3^{eme} éd.Springer,New-York,.Vol 4.
- 87- **Eicher R., Sutter-Lutz B., Gerber L (2002)**. Contrôler les mammites à *Staphylococcus aureus*. *Le Point Vétérinaire*, 228, 50-54.
- 88- **Eisenstein B (1990)**. The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *N Engl J Med* 322: 178–183.
- 89- **Ekkelenkamp MB., Sekkat M., Carpaij N., Troelstra A., Bonten MJ (2006)**. Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* originating from pigs. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 150: 2442-2447.
- 90- **El-Anzi O (2014)**. Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *staphylococcus aureus* isolées au centre hospitalier ibn sina de rabat. Thèse de doctorat en médecine. Université mohammed V-suisi – Maroc –
- 91-**El-Ashker M., Gwida M., Monecke S., El-Gohary F., Ehrichtc R., Elsayed M., Akinduti P., El-Fateh M., Maurischat S (2020)**. Antimicrobial resistance pattern and virulence profile of *S. aureus* isolated from household cattle and buffalo with mastitis in Egypt. *Veterinary Microbiology* 240 – 108535.
- 92- **El Behiry A., Schlenker G., Szabo I., Roesler U (2012)**. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *J. Vet. Sci.*, 13(2), 153-161.
- 93- **El-Sayed A., Alber J., Lammler C., Jager S., Woter W., Vázquez H (2006)**. Comparative study on genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical mastitis in Mexico. *Vet. Mex.* 37, 165–179.
- 94- **Erskine R J (2014)**. Mastitis in dairy cows.Last full review/revision October 2014. DVM, PhD.
- 95- **Falugi F., Kim HK., Missiakas DM., Schnee wind O (2013)**. Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus*. *MBio*; 4: e00575–13–e00575–13.doi:10.1128/mBio.00575–13.
- 96- **Fang R., Cui J., Cui T., Guo H., Ono HK., Park C-H et al (2019)**. Staphylococcal Enterotoxin C Is an Important Virulence Factor for Mastitis. *Toxins*; 11:141.

- 97- **Fanny V., Maher S., Prévost G (2008)**. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* Institut de bactériologie. Revue francophone des laboratoires. 407, 61-69.
- 98- **Faroult B., Seryes F (2005)**. Antibiothérapie des mammites bovines. Bulletin des GTV Hors série médicaments, 208-214, pp 64-70.
- 99- **Fauchere J.L and Avril J.L (2002)**. Bactériologie générale et médicale. Ellipses, Paris. 213-217.
- 100- **Feßler A., Scott C., Kadlec K., Ehricht R., Monecke S and Schwarz S (2010)**. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. J Antimicrob Chemother ; 65: 619–625.
- 101- **Felipe V ., Morgante CA ., Somale P S ., Varroni F. , Zingaretti M L., Bachetti R A ., Correa S G ., Porporatto C (2017)**. Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. Microb Pathog : 104:278-286.doi: 10.1016/j.micpath.01.047.
- 102-**Ferrouiller C., Bouchard E., Carrier J (2004)**. Diagnostic indirect des mammites subcliniques. Le Point Vétérinaire, 34(248): 42-46.
- 103- **Fitzgerald JR., Sturdevant DE., Mackie SM., Gill SR., Musser JM (2001)**. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. Proc Natl Acad Sci USA .98:88218826.
- 104- **Flandrois J.P (1997)**. Bactériologie médicale. Presse Universitaire de Lyon. pp 108-109.
- 105- **Francois P., Vaudaux P., foster T.j., PLew D (1997)**. Facteurs d'attachement au fibrinogène Méd. Mal. Infect. 27, 9-143.
- 106-**Frebouurg NB., Lefebvre S., Baert S., Lemeland JF (2000)**. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J Clin Microbiol. Feb;38(2):877-80. doi: 10.1128/JCM.38.2.877-880. PMID: 10655405; PMCID: PMC86232.
- 107- **Freney J., Renaud F., Hansen W et al (2000)**. Précis de bactériologie clinique. Paris, [Lyon]: Eska; A. Lacassagne.
- 108- **Fuda CCS., Fisher JF., Mobashery S (2005)**. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome.Cell Mol Life Sci CMLS; 62:2617–2633. doi: 10.1007/s00018-005-5148-6.

- 109- **Gad GFM., El-Feky MA., El-Rehewy MS., Hassan MA., Abolella H., El-Baky RMA (2009)**. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. JIDC;3:342-51, DOI: <https://dx.doi.org/10.3855/jidc.241>.
- 110- **Gambo H et Agnem Etchike C (2001)**. Dépistage de mammites subcliniques chez des vaches Goudali en lactation au Nord Cameroun. Revue Élev. Méd. vét. Pays trop. 54 (1) : 5-10.
- 111-**Gandon J. B. C. R (2010)**. Comparaison entre la méthode épidémiologique et la méthode bactériologique de diagnostic lors d'une épizootie de mammites en élevage bovin. Thèse pour le doctorat vétérinaire. ENV D'Alfort. 85 p.
- 112- **Gao J ., Ferreri M ., Liu X.Q ., Chen L.B ., Su J.L ., Han B (2011)**. Development of multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and selected antibiotic resistance genes in bovine mastitic milk samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 23(5); 894 –901.
- 113- **Garau J., Bouza E., Chastre J., Gudiol F., Harbarth S (2009)**. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clin Microbiol Infect; 15: 125–136. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02701.x.
- 114- **Garibyan L et Avashia N (2013)**. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). J Invest Dermatol; 133(3): e6. doi:10.1038/jid.1.
- 115-**Garrity GM., Johnson KL., Bell J and Searles DB (2002)**. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, second ed. Springer-verlag, New York. 60.
- 116- **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 Doct. Vét., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Alfort, France, 106 p. theses.vetalfort.fr/telecharger.php?id=772.
- 117- **Gehring R, Smith GW (2006)**. An overview of factors affecting, the disposition of intramammary preparation used to treat bovine mastitis. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy, 29 : 237-241.
- 118-**Gerault M (2014)**. Elaboration d'un guide vétérinaire pour le déroulement d'un audit « qualité du lait » en élevage bovin laitier. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire ; Campus vétérinaire de Lyon, 198 p.
- 119-**Gerke C., Kraft A., Sussmuth R., Schweitzer O and Gotz F (1998)**. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J. Biol. Chem. 273:18586–18593.

- 120-**Gilmore KS., Gilmore MS and Sahn DF (2008)**. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* .291-312. In R. G. Wax, K. Lewis, A. A. Salyers, and H. Taber (ed.), Bacterial Resistance to Antimicrobials, Second ed. CRC Press, Boca Raton.
- 121- **Gindonis V (2013)**. Occurrence and characterization of methicillin resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. Acta Veterinaria Scandinavica .55:61.
- 122-**Gläser R.,Becker K.,vonEiff C.,Meyer–Hoffert U.,Harder J (2014)**. Decreased Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Small–Colony Variants toward Human Antimicrobial Peptides.J Invest Dermatol ;134:2347–2350.doi:10.1038/jid.2014.176.
- 123- **Gordon RJ et Lowy FD (2008)**. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.Infection. Clinical Infectious Diseases; 46:S350-9.
- 124- **Gordon L., Cloeckeaert A., Doublet B., Schwarz S., Bouju-Albert A., Ganiere J.P., Le Bris H., Le Fleche-Mateos A., Giraud E (2008)**. Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid pAB5S9 from fresh water *Aeromonas bestiarum*. J. Antimicrob. Chemother. 62, 65–7.
- 125- **Gould IM (2005)**. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.J Hosp Infect; 61: 277-82.
- 126-**Gras D (2006)**. Etude des interactions entre les cellules épithéliales respiratoires humaines normales et mucoviscidique et *Staphylococcus aureus* thèse de doctorat : Université de REIMS Champagne Ardenne U.F.R. de médecine. 185.
- 127- **Gravet A., Couppié P., Meunier O., Clyti E., Moreau B., Pradinaud R., Monteil H., Prévost G (2001)**. *Staphylococcus aureus* isolated from impetigo produces both epidermolysins A or B and LukE+LukD in 78% of 131 retrospective and prospective cases. J. Clin. Microbiol. 39: 49-56.
- 128- **Green RE., Krause J., Briggs AW., Maricic T., Stenzel U., Kircher M et al (2010)**. A draft sequence of the Neanderthal genome. Science; 328: 710-22.
- 129- **Grohs P (2009)**. Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques : la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance ? Pathologie Biologie ; 57 : 1-8.
- 130-**Guerin-Faubleee V(2010)**. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. In Journées Nationales des GTV, Lille, 26-27-28 juillet 2010, Lille, pp 93-101.
- 131-**Guillemot D., Brisabois A., Brugere H et al (2006)**. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

- 132-**Guiraud J.P., Rosec J.P (2004)**. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Edition AFNOR, Paris. pp 168-178.
- 133-**Hamad A R., Marrack P., Kappler J W (1997)**. Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins. *J. Exp. Med.* 185, 1447-1454.
- 134-**Hamid S., Bhat M.A., Mir I.A., Taku A., Badroo G.A., Nazki S and Malik A (2017)**. Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916.
- 135- **Hanssen A-M., Ericson Sollid JU (2006)**. SCC mec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Mic*; 46:8-20.
- 136-**Hanzen C (a) (2009)**. La pathologie infectieuse de la glande mammaire, étiopathogénie et traitements, approche individuelle et de troupeau. Université de Liège; 57p.
- 137- **Hanzen C (b) (2009)**. Propédeutique de la glande mammaire. Sémiologie et diagnostic individuel et de troupeau. Université de Liège. 28p.
- 138- **Hart ME., Hart MJ., Roop AJ (2009)**. Genotypic and Phenotypic Assessment of Hyaluronidase among Type Strains of a Select Group of Staphylococcal Species. *Int J Microbiol*: 1–8. doi:10.1155/2009/614371.
- 139- **Heilmann C (2011)**. Adhesion mechanisms of *staphylococci*. *Bacterial adhesion*: Springer. p. 105-23.
- 140- **Hennekinne J-A., Ostyn A., Guillier F., Herbin S., Prufer A-L., Dragacci S (2010)**. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins*; 2:2106-16.
- 141- **Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S and Griffith R (1992)**. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* # 10: 413-417.
- 142- **Hiramatsu K (2001)**. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 1: 147-155.
- 143- **Hoekstra J., Zomer A. L ., Rutten V. P. M. G ., Benedictus L., Stegeman A., Spaninks M. P ., Bennedsgaard T. W. , Biggs A., De Vlieghe S., Mateo D. H ., Huber-Schlenstedt R., Katholm J., Kovács P., Krömker V., Lequeux G., Moroni P ., Pinho L ., Smulski S ., Supré K., Swinkels J. M ., Holmes M. A., Lam T. J. G. M., Koop G (2020)**. Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis. *Scientific Reports* | 10:18172.
- 144- **Holeckova B., Kalivacova V., Julius Gondol J., Fotta M., Holoda E., Blickova E (2004)**. Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 48:41-45.

- 145-**Hu C., Xiong N., Zhang Y., Rayner S,Chen S (2012)**. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* . Biochem Biophys Res Commun; 419:617–620.doi:10.1016/j.bbrc.02.057.
- 146-**Hu Y., Meng J., Shi C., Hervin K., Fratamico P.M., Shi X (2013)**. Characterization and comparative analysis of a second thermonuclease from *Staphylococcus aureus*. Microbiological research, 168(3): 174-182.
- 147-**Iandolo JJ., Worrell V., Groicher K H., Qian Y ., Tian R ., Kenton S ., Dorman A ., Ji H ., Lin S., Loh P ., Qi S ., Zhu H ., Roe B A (2002)**. Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325.Gene. 289:109-118.
- 148- **Institut de l'élevage (2008)**. Maladies des bovins. 4ème édition. Editions France Agricole.
- 149-**IWG-SCC (2009)**. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53(12): p. 4961-4967.
- 150- **Jacquinet S A (2009)**. Evaluation du dépistage des mammites par la conductivité électrique du lait. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. ENV de Toulouse, 134 p.
- 151- **Jamali H., Paydar M., Radmehr B., Ismail S et Dadrasnia A (2015)**. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. Food Control, 54: 383-388.
- 152- **Jarraud S., Mougel C., Thioulouse J., Lina G., Meugnier H., Forey F., Nesme X., Etienne J., Vandenesch F (2002)**. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun; 70:631-641.
- 153-**Jin T., Bokarewa M., McIntyre L., Tarkowski A., Corey G.R., Reller L.B., and Fowler V.G (2003)**. Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with staphylokinase deficient *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Medical Microbiology 52, 919– 923.
- 154- **Jin T., Bokarewa M., Foster T., Mitchell J., Higgins J., Tarkowski A (2004)**. *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism.J Immunol ;172:1169–1176.
- 155-**Kahl B., Herrmann M., Everding AS., Koch HG., Becker K., Harms E et al (1998)** . Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients

with cystic fibrosis. *J Infect Dis*; 177:1023–1029.

156- **Kaltenboeck B., Wang C (2005)**. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem*; 40:219–59.

157- **Katayama Y., Baba T., Sekine M., Fukuda M., Hiramatsu K (2013)**. Beta-Hemolysin Promotes Skin Colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*; 195: 1194–1203. doi: 10.1128/JB.01786-12

158- **Kateete D. P., Kabugo U., Baluku H., Nyakarahuka L., Kyobe S., Okee M., Najjuka C.F & Joloba M.L (2013)**. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. *PloS one*, 8(5): e63413.

159- **Ko YP., Kuipers A., Freitag CM., Jongerius I., Medina E., van Rooijen WJ et al (2013)**. Phagocytosis Escape by a *Staphylococcus aureus* Protein That Connects Complement and Coagulation Proteins at the Bacterial Surface. Skaar EP, editor. *PLoS Pathog*; 9:e1003816. doi:10.1371/journal.ppat.1003816.

160- **Koreen L., Ramaswamy SV., Graviss EA., Naidich S., Musser JM., Kreiswirth BN (2004)**. spaTyping Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker to Detect Genetic Micro- and Macrovariation. *J Clin Microbiol*; 42: 792–799. doi:10.1128/JCM.42.2.792–799.2004.

161- **Kotra LP., Mobashery S (1998)**. β -Lactam antibiotics, β -lactamases and bacterial resistance. *Bulletin de l'Institut Pasteur*; 96(3):139–150. Doi: 10.1016/S0020-2452(98)80009-2.

162- **Krziwanek K., Metz-Gercek S., Mittermayer H (2009)**. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from human patients, upper Austria. *Emerg Infect Dis*. 15: 766–769.

163- **Kuang Y., Jia H., Miyanaga K., Tanji Y (2009)**. Effect of milk on antibacterial activity of tetracycline against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84, 135-142.

164- **Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I et al (2001)**. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 357:1225–1240.

165- **Labbé JF (2007)**. Fonctionnement et dysfonctionnement de la machine à traire. Conférence organisée par le laboratoire Elanco pour les vétérinaires praticiens.

166- **Lafont JP., Martel JL., Maillard R., Chalus-Dancla E., Puyt JD., Laval A et al (2002)**. Antibiothérapie bovine. Acquis et consensus. Conférences organisées par le laboratoire Pfizer Santé Animale. Ed. Du Point Vétérinaire: 318 p.

- 167- **Lago A., Godden SM., Bey R., Ruegg PL., Leslie K (2011 a)**. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science*, **94**, 4441-4456.
- 168- **Lago A., Godden SM., Bey R., Ruegg PL., Leslie K (2011 b)**. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. *Journal of Dairy Science*, **94**, 4457-4467.
- 169- **Langlet S., Quentin G., Contant G., Ghnassia C.J (1999)**. Method chromogénique d'identification rapide de *Staphylococcus aureus*. *Annales de Biologie Clinique*; 57 (2): 191-6.
- 170- **Lekkerkerk WSN., van Wamel WJB., Snijders SV., Willems RJ., Van Duijkeren E., Broens EM., Wagenaar JA., Lindsay JA., Vosa MC (2015)**. What Is the Origin of Livestock Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 isolates from humans without livestock contact? An epidemiological and genetic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 53: 1836-1841.
- 171- **Le Loir Y., Baron F., Gautier M (2003)**. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2 : 63-76.
- 172- **Le loir Y et Gautier M (2009)**. *Staphylococcus aureus* .Monographies de microbiologie ; collection dirigée par Jean- Paul Larpent. Éditions tec&doc .Lavoisier. 284p.
- 173-**Le Minor L and Veron M (1990)**. Bactériologie médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*». J. Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773794.
- 174-**Le page P (2003)**. Les moyens de diagnostic des infections mammaires en exploitation. Journées Nationales des G.T.V., Nantes : 319-330.
- 175- **Le Page P., Bosquet G., Théron L., Labbé J-F., Frédérici-Mathieu C., Tisserand S et al (2014)**. Traitement et prévention des mammites bovines: actualités. *Supplément technique, Dépêche Vétérinaire*, 136, 39 p.
- 176- **Le Roux Y (1999)**. Les mammites de la vache laitière. File://A:\mammite. Htm. 10 p.
- 177- **Leyral G et Joffin JN (1998)**. Microbiologie technique: 2 'Documentation technique'. 2^{ème} Edition, Bordeaux: CRDP d'Aquitaine; 299 p.
- 178- **Li T., Lu H., Wang X., Gao Q., Dai Y., Shang J and Li M (2017)**. Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*; Volume 7, Article 127.

- 179- **Lindsay JA, Holden MT (2004)**. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends- Microbiol. 12: 378-385.
- 180- **Lindsay JA (2013)**. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer. IntJ Med Microbiol IJMM;304:103–109.doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.010.
- 181- **Loulergue P., Tourret S (2003)**. Le staphylocoque doré résistant à la méticilline d'origine communautaire. Lyon. Mémoire de DES.
- 182-**Lowy F. D (2003)**. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest ; 111(9).1265-1273.
- 183-**Madec J-Y., Haenni M., Jouy E., Laurent F(2012)**. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : un partage entre l'Homme et l'animal ? Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. 53, 40-42.
- 184- **Mahantesh M K and Basappa BK (2011)**. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria Isolated From Bovine Mastitis. Advances in Applied Science Research, 2 (6):229-235.
- 185- **Mai-siyama IB., Okon KO., Adam NB., Askira UM., Isiaka TM., Adamu SJ., Mohammed A (2014)**. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization rate among ruminant animals slaughtered for human consumption and contact person in Maiduguri, Nigeria. Afr. J. Microbiol. Res. 2643-2649.
- 186- **March R., Prenafeta A., Noguera M., Guix R., Foix A (2010)**. Efficacy evaluation of a new vaccine against bovine mastitis. Field trial results. *NMC 49th Annual Meeting Proceedings*. Albuquerque.
- 187- **Marchal N., Bourdon J.L., Richard CL (1987)**. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. ISBN 2-7040-0541-9 (3^{ème} édition):505 p.
- 188- **Martineau F., Picard FJ., Lansac N., Markenard C., Roy PH., Ouellette M., Bergeron MG (2000)**. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother ;44: 231–238.
- 189- **Mcdougall S., Parker KI., Heuer C., Compton CWR (2009 b)**. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Vet. Microbiol*, 134, 177-185.
- 190- **Mehrotra M., Wang G., Johnson WM (2000)**. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol; 38:1032–1035.

- 191- **Mello P.L ., Riboli D.F. M ., Pinheiro L., Martins L de A., Brito M.A.V.P and Cunha M de L. R de S da (2016)**. Detection of Enterotoxigenic Potential and Determination of Clonal Profile in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Bovine Subclinical Mastitis in Different Brazilian States. *Toxins*, 8, 104; doi: 10.3390.
- 192-**Merino N., Toledo-Arana A., Vergara-Irigaray M., Valle J, Solano C., Calvo E et al (2009)**. ProteinA-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*;191: 832- 843.doi:10.1128/JB.01222-08.
- 193-**Merlet A (2010)**. Implication de la leucocidine de Panton et Valentine dans les infections sévères à *Staphylococcus aureus* en Nouvelle-Calédonie thèse de doctorat : Université Bordeaux 2 des sciences médicales.117.
- 194-**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 deTours.
- 195- **Mezine S M C (2006)**. Analyse descriptive des facteurs de risque liés aux mammites dans les élevages d'une clientèle des Ardennes appliquant la démarche GTV partenaire. Thèse pour le doctorat vétérinaire. ENV d'Alfort. 146 p.
- 196-**Mialot j.p (1983)**. Technique de prélèvement de lait pour examen. *Rec. Méd. Vét* : 1057-1058.
- 197- **Middleton JR., Luby CD., Adams SD (2009)**. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. *Veterinary Microbiology*, 134, 192-198.
- 198-**Mirani ZA., Aziz M., Khan SI (2014)**. Small colony variants have a major role in stability and persistence of *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Antibiot (Tokyo)*; doi:10.1038/ja.115.
- 199-**Mistry H., Sharma P., Mahato S., Saravanan R., Kumar PA., Bhandari V (2016)**.Prevalence and Characterization of Oxacillin Susceptible mecA Positive Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis in India. *PLoS ONE*11 (9): e0162256.doi:10.1371/journal.pone.0162256.
- 200- **Mohey Elhaig M et Selim A (2014)**. Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt. *Trop Anim Health Prod* DOI 10.1007/s11250-014-0715-1.
- 201-**Mölkänen T.,Tyynelä J., Helin J., Kalkkinen N., Kuusela P (2002)**. Enhanced activation of bound plasminogenon<i>Staphylococcus aureus</i>by staphylokinase.*FEBS Lett* ;517:72-78.

- 202- **Monistero V ., Graber HU ., Pollera C ., Cremonesi P ., Castiglioni B ., Bottini E ., Ceballos-Marquez A ., Lasso-Rojas L ., Kroemker V ., Wentz N ., Petzer I-M., Santisteban C ., Runyan J ., dos Santos M .V ., Alves B.G ., Piccinini R, Bronzo V ., Abbassi M.S ., Ben Said M and Moroni P (2018).** *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Eight Countries: Genotypes, Detection of Genes Encoding Different Toxins and Other Virulence Genes. [Toxins \(Basel\)](#), 10(6): 247; doi: 10.3390.
- 203- **Morikawa K., Takemura A.J., Inose Y., Tsai M., Nguyen ThiL T., Ohta T et al (2012).** Expression of a Cryptic Secondary Sigma Factor Gene Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* ;8: e1003003. doi:10.1371/journal.ppat.1003003.
- 204- **M'sadak Y., Mighri L., Kraiem K (2011).** Etude de la situation sanitaire mammaire à partir des taux cellulaires de troupeau et estimation des pertes laitières engendrées chez des ateliers bovins hors sol en Tunisie. Revue « Nature et Technologie ». N° 04/Janvier.
- 205- **M'sadak Y., Hadj Mbarek R., Hamed I (2014).** Evaluations des conditions de traite des vaches dans le berceau laitier de Sousse (Tunisie). *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.* 2 (1): 29-36.
- 206- **Mullis KB (1987).** Process for amplifying nucleic acid sequences, United States Patent 4683202.
- 207- **Nagase N., Shimizu A., Kawano J., Yamashita K., Yoshimura H., Ishimaru M., Kojima A (2002).** Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64(12): 1169–1172.
- 208- **Nannini E., Murray BE ., Arias CA (2010).** Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Pharmacol*; 10: 516–521. doi:10.1016/j.coph.06.006.
- 209- **Ndahetuye J B., Persson Y ., Nyman A-K ., Tukei M ., Ongol M-P ., and Bage R (2019).** aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-urban areas of Kigali in Rwanda. *Tropical Animal Health and Production*; 51 (7): 2037–2044.
- 210- **Nehal M., Zuel-Fakkar M.D., Mona H., El-Shokry M.D (2010).** Study of Erythroderma and Psoriasis Exacerbation by Staphylococcal Superantigens. *J. Egypt Women Dermatol. Soc.* 7,113-117.
- 211- **Noireterre P (2006).** suivis de comptages cellulaires et d'examens bactériologiques lors de mammites cliniques chez la vache laitière. Étude expérimentale au centre d'élevage Lucien bizet de poisy. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I, 94 P.

- 212- **Oliveira M., Bexiga R., Nunes S., Carneiro C., Cavaco L., Bernardo F et al (2006).** Biofilm forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* ; 118:133-40.
- 213- **O’riordan K, Lee J.C (2004).** *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin.Microbiol.Rev.* 17, 218-34.
- 214- **Ote I., Taminiau B., Duprez J-N., Dizier I., Mainil JG (2011).** Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet Microbiol* ;153:285-92.
- 215- **Peacock S.J (2006).** *Staphylococcus aureus* in: Principales and practice of clinical bacteriology. 2nd edition. England: John Wiley & Sons Ltd; p 76.
- 216- **Pérez V. K. C ., Custódio D. A. C ., Silva E. M. M ., de Oliveira J ., Guimarães A.S ., Brito M. A. V. P ., Souza-Filho A. F ., Heinemann M.B ., Lage A. P ., Dorneles E. M. S (2020).** Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* .ISSN 1517-8382 .DOI 10.1007/s42770-020-00363-5.
- 217- **Petinaki E, Spiliopoulou I (2012).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts *Clin. Microbiol. Infect.* 18: 626-634.
- 218- **Petrovski K., Trajcev M., Buneski M (2006).** A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *J. S. Afr. Vet. Assoc,* 77, 52-60.
- 219- **Philippon A., Arlet G (2006).** [Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork!]. *Ann Biol Clin (Paris);* 64: 37-51.
- 220- **Piccinini R., Borromeo V., Zecconi A (2010).** Relationship between *Staphylococcus aureus* gene pattern and dairy herd mastitis. *Vet. Microbiol,* 145, 100–105.
- 221- **Piechota M., Kot B., Zdunek E., Mitrus J., Wicha J., Wolska M.K., Sachanowicz K (2014).** Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with and without mastitis and the cowshed environment. *Pol. J. Vet. Sci.* 17, 407–411.
- 222- **Poole K (2004).** Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci;* 61(17). 2200-2223.
- 223- **Poulsen AB., Skov R et Pallesen LV (2003).** Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 51:419–421).

- 224-**Poutrel B (2014)** . Prévention vaccinale des mammites à coliformes et staphylocoques. *Supplément technique, Dépêche Vétérinaire*, 136, 31-32.
- 225- **Prescott JF., Boggot JD and Walker RD (2000)**. Antimicrobial Therapy, Third ed. Iowa State University Press / Ames, Danvers.
- 226- **Prescott JF (2006)**. Beta-lactam antibiotics: penam penicillins. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th ed., Ames, Blackwell publishing, 121-137.
- 227-**Prescott LM., Harley JP., Klein D (2010)**. Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université.
- 228-**Proctor RA., Kriegeskorte A., Kahl BC., Becker K ., Löffler B., Peters G (2014)** . *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs):a road map for the metabolic path ways involved in persistent infections.Front Cell Infect Microbiol ;4.doi:10.3389/fcimb.2014.00099.
- 229- **Pu S., Han F., Ge B (2009)**. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from Louisiana retail meats. *Appl Environ Microbiol* ; 75(1):265–7. 10.1128/AEM.01110-08.
- 230-**Rainard P., Riollet C (2006)**. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res*, 37, 369400.
- 231- **Rakotozandrindrainy R., Razafindrajaona J.M., Foucras G (2007)**. Diagnostic rapide à la ferme des mammites subcliniques des vaches laitières du triangle laitier des hautes terres de Madagascar. *Revue Méd. Vét.*, 158,100-105.
- 232-**Ramirez MS., Tolmasky ME (2010)**. Aminoglycoside modifying enzymes.*Drug Resist Updat*; 13(6):151–171. doi:10.1016/j.drug.08.003.
- 233-**Rasolofojaona R (2014)**. Mammite à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM): commune rurale d’Alasora.Mémoire de fin d’étude pour l’obtention du diplôme d’ingénieur Agronome, option Elevage.Université d’Antananarivo –Madagascar- école supérieure des sciences agronomiques -département élevage- ;80 p.
- 234- **RCRMB (2009)**. La recherche sur la mammite : quoi de neuf ? Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine.
- 235- **Reich D., Green RE., Kircher M., Krause J., Patterson N., Durand EY et al (2010)**. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*; 468: 1053-60.
- 236-**Reinoso E.B., El-Sayed A., Lammler C., Bogni C., Zschock M (2008)**. genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. Elsevier. *Microbiological research*; 163 - 314-322.

- 237- **Remy D (2007)**. Les mammites, cours de DCEV 3 de l'ENVA.
- 238- **Remy D (2010)**. Les mammites : hygiène, prévention, environnement, 1re éd. Paris, France, La France agricole, 260 p.
- 239- **Risco C, Melendez P (2011)**. *Dairy Production Medicine*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. 791 p.
- 240- **Roberson JR., Warnick LD., Moore G (2004)**. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. *J. Dairy Sci.* 87, 583-592.
- 241- **Roussel P., Seegers H., Serieys F (2011)**. Guide d'intervention pour la maîtrise des mammites dans les troupeaux laitiers. P ; 1-134. (UMT Maîtrise de la santé des troupeaux bovins).
- 242- **Ruegg P.L., Reiman D.J (2002)**. Milk quality and mastitis tests. *Bovine Pract*, 36, 41-54.
- 243- **Sahebkhitiari N., Nochi Z., Eslampour M A., Dabiri H., Bolfion M., Taherikalani M., Khoramian B., Zali M R., Emaneini M (2011)**. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58 (2), pp. 113–121.
- 244- **Saidi R., Cantekin Z., Khelef D., Ergün Y., Solmaz H., Kaidi R (2015)**. Antibiotic Susceptibility and Molecular Identification of Antibiotic Resistance Genes of Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Algeria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg Journal Home-Page* 21 (4): 513-520.
- 245- **Saidi R., Khelef D., Kaidi R (2016)**. Mammites subcliniques dans les troupeaux bovins laitiers de la région centre de l'Algérie : incidence et étiologie. *Renc. Rech. Ruminants*, 23.
- 246- **Salat O., Lhermie G., Bastien J (2007)**. Démarches pratiques de traitement des infections mammaires à *Staphylococcus aureus*. *Journées Nationales des G.T.V., Nantes*, 783-794.
- 247- **Salat O (2008)**. Gestion des mammites à *S. aureus* en élevage. *Le Point Vétérinaire*, 282, 43-50.
- 248- **Salem-Bekhit M. M., Muharram M.M., Alhosiny I. M., Hashim M. E. S.Y (2010)**. Molecular Detection of Genes Encoding Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(2): 121-128.
- 249- **Salina A., Guimarães F.F., Richini Pereira V B., Menozzi B D., Rall V L M., Langoni H (2020)**. Detection of *icaA*, *icaD*, and *bap* genes and biofilm production in

Staphylococcus aureus and non-*aureus* staphylococci isolated from subclinical and clinical bovine mastitis. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.72, n.3, p.1034-1038.

250-**Sandel M.K., McKillip J.L (2004)**. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. Food Control, 15(1): 5-10.

251- **Sanders P., Bousquet-Melou A., Chauvin C., Toutain PL (2011)**. Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique.

252-**Savage VJ., Chopra I., O'Neill AJ (2013)**. Population Diversification in *Staphylococcus aureus* Biofilms May Promote Dissemination and Persistence. Forestier C, editor. PLoS ONE;8: e62513. doi:10.1371/journal.pone.0062513.

253- **Scharn CR., Tenover FC., Goering RV (2013)**. Transduction of staphylococcal cassette chromosome mec elements between strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother; 57:5233–5238. doi:10.1128/AAC.01058–13.

254- **Schlievert PM., Case LC (2007)**. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. Methods Mol Biol; 391:113-26.

255-**Schlievert P.M., Strandberg Kristi L., Ying-Chi Lin., Marnie L., Peterson., Pharm D., Donald Y.M., Leung M.D (2010)**. Secreted virulence factor comparison between methicillin resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis J. Allergy Clin. Immunol. 125, 9-49.

256- **Schmidt T., Kock M.M., and Ehlers M.M (2017)**. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis and Close Human Contacts in South African Dairy Herds: Genetic Diversity and Inter-Species Host Transmission. Frontiers in Microbiology. Doi; 10-3389.

257- **Schmitt-Van De Leemput E., Callery B., Genest M et al (2012)**. Compte rendu d'essais multifocaux de mise en place du vaccin « Starvac » selon un nouveau protocole. Journées Nationales des G.T.V., Nantes, 749-754.

258- **Schmitt-Van De Leemput E., Samson O., Gaudout N., Alliot M (2013a)**. Recours à la PCR multiplex en clientèle et comparaison à la culture bactérienne sur le lait. *Le Point Vétérinaire*, 334, 56- 61.

259-**Schmitt-Van De Leemput E., Gaudout N., Samson O., Lhuillier D., Lhermie G (2013b)**. Comparaison de deux méthodes d'identification bactérienne en clientèle. *Le Point Vétérinaire*, 335, 58-61.

260-**Schmitz F-J., Veldkamp K-E., VanKessel KP., Verhoe fJ., Van Strijp JA (1997)**. Delta-toxin from *Staphylococcus aureus* as a co stimulator of human neutrophil

oxidative burst. *J Infect Dis*; 176:1531–1537.

261- **Schröder A., Kland R., Peschel A., von Eiff C., Aepfelbacher M (2006)**. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*; 195: 185–194. doi:10.1007/s00430–006–0015–0.

262- **Schukken YH., Bronzo V., Locatelli C., Pollera C., Rota N., Casula A et al (2014)**. efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal of Dairy Science*, **97**, 5250-5264.

263- **Scott G (2009)**. Antibiotic resistance. *Medicine (Baltimore)* **37**, 551–556.

264- **Sears P, Mccarthy K (2003)**. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract*, 19, 171-185.

265- **Seegers H., Fourichon C., Beaudeau F (2003)**. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res*, 34, 475-491.

266- **Sendi P., Rohrbach M., Graber P., Frei R., Ochsner PE., Zimmerli W (2006)**. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis Off Pub J Infect Dis Soc Am*; 43:961–967. doi: 10.1086/507633.

267- **Sérieys F (2004)**. Le traitement ciblé des mammites: Enjeux et faisabilité. *Le Point Vétérinaire*, 35(246), 5459.

268- **Sérieys F (2011)**. Suivi de l'utilisation en élevage d'un vaccin contre les mammites (Starvac, Hippra). *Bulletin des GTV*, **59**, 89-100.

269- **Seyouma B., Kefyalewa H., Aberab B., Abdela N (2018)**. Prevalence, risk factors and antimicrobial susceptibility test of *Staphylococcus aureus* in Bovine cross breed mastitic milk in and around Asella town, Oromia regional state, southern Ethiopia. *Acta Tropica*; 177, 32–36.

270- **Shim E., Shanks R., Morin D (2004)**. Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci*, 87, 2702-2708.

271- **Smith BP (2008)**. Mammary gland health and disorders. *Large animal internal medicine*, 2008, fourth edition: 1112-1119.

272- **Somerville G.A (2016)**. *Staphylococcus -Genetics and physiology-* Caister Academic Press, 390 pages.

273- **Song L., Hobough MR., Shustak C., Cheley S., Bayley H., Gouaux JE (1996)**. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* ;274: 1859–1866.

- 274- **Speller DC., Johnson AP., James D., Marples RR., Charlett A., George RC (1989).** Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid. England and Wales. Lancet; 350:323-5.
- 275- **Stephen H.G., Hawkey M.P (2006).** Principles and practice of clinical bacteriology 2^{ème} édition. Birmingham, John Wiley and Sons. pp 73-86.
- 276- **Sutra L., Poutrel B (1994).** Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol, 40, 79-89.
- 277- **Tally P.F (1999).** Les staphylocoques, abcès et autres maladies. In : Microbiologie et pathologie infectieuse, 2^{ème} édition. De Boeck; pp 192-193.
- 278- **Taponen S., Koort J., Björkroth J., Saloniemi H., Pyörälä S (2006).** Bovine intramammary 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.
- 279- **Tavares A., Nielsen JB., Boye K., Rohde S., Paulo AC., Westh H et al (2014).** Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) Evolution and Expression among *Staphylococcus aureus* Clones with Hospital and Community Origin. Fitzgerald JR, editor. PLoS ONE; 9:e98634. doi:10.1371/journal.pone.0098634.
- 280- **Teuber M (2001).** Veterinary use and antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol ; 4(5).493-499.
- 281- **Thieulon M (2005).** Lait pathogènes staphylocoques. Revue de la chambre d'agriculture du Cantal, pp. 21-28.
- 282- **Thomas D., Chou S., Dauwalder O., Lina G (2007).** Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Chem. Immunol. Allergy 93, 24-41.
- 283- **Thomelin R., Baudet H., Bossuet I., Coulon R., Fulbert L., Huneau T., Lefevre T., Leiseing E., Pelletier E., Roussel P., Thomas B., Tocze C (2009).** Mammites, cellules. Tous les conseils pour lutter efficacement. GIE élevage des pays de la Loire. 57 p.
- 284- **Touaitia R (2016).** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : Emergence et mécanismes de résistance. THESE Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en microbiologie. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA-Algérie .125 p.
- 285- **Tremblay C (2008).** Mise à jour du traitement des infections à *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Pharm actuel; 41.
- 286- **Turutoglu H., Ercelik S AND Ozturk D (2006).** Antibiotic resistance of *staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. Bull vet inst pulawy 50, 41-45.

- 287- **Uhel F., Zafrani L et commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française (2019)**. Nouvelles techniques de biologie moléculaire. Méd. Intensive Réa DOI 10.3166/réa-0119.
- 288- **Van De Leemput E (2007)**. Analyse bactériologique du lait. Conférence organisée par le laboratoire Pfizer pour les vétérinaires en exercice, Nantes, 54p.
- 289- **Vangroenweghe F., Duchateau L., Boutet P., Lekeux P., Rainard P., Paape MJ et al (2005)**. Effect of carprofen treatment following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *Journal of Dairy Science*, **88**, 2361-2376.
- 290- **Van Oostveldt K., Vangroenweghe F., Dosogne H., Burvenich C (2001)**. Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. *Vet. Res*, **32**, 617-622.
- 291- **Vasudevan P., Nair MK., Annamalai T., Venkitanarayanan KS (2003)**. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol* ; **92**(1-2):179-185.
- 292- **Vincenot F., Saleh M., Prévost G (2008)**. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev FrancophLab*:61–69.
- 293- **Werckenthin C., Cardoso M., Martel JL, Schwarz S (2001)**. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus* and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res*; **32**(3-4), 341-362.
- 294- **Westermeier R (1997)**. Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and applications of DNA and Protein Separation, VCH, Weinheim.
- 295- **Wilke GA., Bubeck Wardenburg J (2010)**. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA*; **107**: 13473–13478. doi:10.1073/pnas.1001815107.
- 296- **Wilson DJ., Grohn YT., Bennet J., Gonzalez RN., Schukken YH., Spatz J (2007)**. Comparison of J5 vaccines and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity, and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, **90**, 4282–4288.
- 297- **Witte W., Strommenger B., Stanek C., Cuny C (2007)**. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 255-258.
- 298- **Yadav R., Kumar Sharma S., Yadav J., Choudhary S and Kataria AK (2015)**. Profiling of Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Obtained from Mastitic Milk of

Cattle and Buffalo. JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY, Vol. 9(2), p. 1539-1544.

299- **Yang F., Zhang S., Shang X., Li H., Zhang H., Cui D., Wang X., Wang L., Yan Z., and Sun Y (2020)**. Short communication: Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. J. Dairy Sci. 103:840–845.

300- **Yao D., Yu F., Qin Z., Chen C., He S., Chen Z., Zhang X., Wang L (2010)**. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs). BMC Infect Dis; 10:133. Doi: 10.1186/1471-2334-10-133.

301-**Zhang S., Iandolo J.J., Stewart G.C (1998)**. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encod second enterotoxin determinant (sej).FEMS Microbiol.Lett.168, 227-233.

Sites internet :

01-**Afssa (2006)**. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Rapport du groupe de travail "Antibiorésistance". Maisons Alfort : AFSSA, 214 pages. Disponible en ligne sur : [http://www.afssa.fr/Documents/SANT-RaABR.pdf]. Consulté en date du ; 10/01/2019.

02- **Anonyme 1 (2016)**. Symptoms of Mastitis. Disponible en ligne sur: [www.ahdb.org.uk]. Consulté en date du ; 13/02/2018.

03- **Descoteaux L (2004)** . La mammite clinique : stratégies d'intervention. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ, 21 Octobre. Disponible en ligne sur : [http://biosol.free.fr/liens/mammi_2004/accueil.htm]. Consulté en date du ; 25/09/2018.

04- **Encyclopedia Britannica (2009)**. Exemples des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Disponible en ligne sur : [https://www.britannica.com/science/antibioticresistance/media/1027479/129670]. Consulté en date du ; 13/04/2019.

05- **Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine (2010 b)**. Bactéries de la mammite [Internet]. Disponible en ligne sur : [<http://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/fr/page.php?p=5&tm=h>]. Consulté en date du; 10/05/2018.

06- **Todar K (2005)**. *Staphylococcus aureus*. Editor. Todar's online textbook of bacteriology. Disponible en ligne sur: [<http://www.textbookofbacteriology.net>]. Consulté en date du; 04/12/2018.

Annexes

Annexe N°01 : Fiche du test CMT :

Exploitation	Vache N°	Résultat du CMT en fonction du quartier				Observations complémentaires	Score CMT					
		AG	AD	PG	PD		0(-)	1(+/-)	2(+)	3(++)	4(+++)	
01	01	01	-	01	-	RAS	02	00	00	02	00	
	02	01	-	01	-	RAS	02	00	00	02	00	
	03	01	-	01	-	RAS	02	00	00	02	00	
	04	01	-	01	-	RAS	02	00	00	02	00	
	05	-	01	-	01	-	RAS	02	00	00	02	00
	06	-	-	-	01	-	RAS	03	00	00	01	00
	07	-	-	-	01	-	RAS	03	00	00	01	00
02	14/06/1620	-	Nf	01	01	RAS	01	00	00	02	00	
	0196	-	-	-	01	RAS	03	00	01	00	00	
	0193	01	01	-	-	RAS	02	00	02	00	00	
	02/HN	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00	
	0185	-	01	-	-	RAS	03	00	01	00	00	
	0184	01	01	01	-	RAS	01	00	03	00	00	
03	01/T	01	01	Nf	-	RAS	01	00	02	00	00	
04	01/OL	01	01	-	-	RAS	02	00	02	00	00	
	02/OL	01	01	01	01	RAS	00	00	04	00	00	
	03/OL	-	01	01	01	RAS	01	00	03	00	00	
05	481	Nf	01	01	01	RAS	00	00	03	00	00	
	01/AH	01	01	-	01	RAS	01	00	00	03	00	
	02/AH	-	01	-	01	RAS	02	00	02	00	00	
	03/AH	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00	
06	60422	-	-	-	01	RAS	03	00	01	00	00	
	15952	-	-	-	01	RAS	03	00	01	00	00	
	01/CA	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00	
	01/CH	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00	
	02/CH	01	01	01	01	RAS	00	00	02	02	00	
	03/CH	00	00	00	01	RAS	03	00	00	01	00	
	15949	01	00	00	00	RAS	03	00	01	00	00	

07	15903	01	01	00	01	RAS	01	00	00	03	00
	15948	01	00	01	01	RAS	01	00	02	01	00
	15947	00	00	01	01	RAS	02	00	00	02	00
08	01/GU	01	01	01	01	RAS	00	00	01	03	00
09	01/CK	-	-	-	01	RAS	03	00	01	00	00
	02/CK	01	-	-	01	RAS	02	00	02	00	00
	03/CK	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	04/CK	01	01	01	01	RAS	00	00	04	00	00
10	01/CN	01	-	01	01	RAS	01	00	00	03	00
	02/CN	01	01	-	-	RAS	02	00	00	02	00
	03/CN	01	01	01	01	RAS	00	00	00	04	00
	04/CN	-	01	-	01	RAS	02	00	00	02	00
	05/CN	-	01	01	-	RAS	02	00	00	02	00
11	3499	-	-	-	01	RAS	03	00	00	01	00
	7008	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	1914	-	-	01	01	RAS	02	00	02	00	00
	3745	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	5980	-	01	01	-	RAS	02	00	00	02	00
	0294	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	0811	01	-	-	-	RAS	03	00	00	01	00
	7083	-	-	-	01	RAS	03	00	00	01	00
	1639	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	3621	01	01	01	01	RAS	00	00	00	04	00
	0479	-	01	-	01	RAS	02	00	02	00	00
	3012	-	01	-	-	RAS	03	00	01	00	00
	2574	01	-	-	01	RAS	02	00	00	02	00
	0284	-	01	-	-	RAS	03	00	00	01	00
	5190	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	3046	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
7248	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00	
8506	01	01	01	01	RAS	00	00	00	04	00	

	8611	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	7301	-	-	-	01	RAS	03	00	01	00	00
	1890	01	01	-	-	RAS	02	00	00	02	00
	7590	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	4853	-	-	01	01	RAS	02	00	02	00	00
	7835	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	7358	01	-	-	01	RAS	02	00	02	00	00
	0755	01	-	-	-	RAS	03	00	00	01	00
	8437	-	01	01	01	RAS	01	00	00	03	00
	3506	01	-	-	01	RAS	02	00	00	02	00
12	01/MK	01	NF	01	-	RAS	01	00	02	00	00
	02/MK	01	-	01	01	RAS	01	00	03	00	00
	03/MK	-	01	01	-	RAS	02	00	02	00	00
	04/MK	01	01	01	01	RAS	00	00	04	00	00
	05/MK	-	01	NF	01	RAS	01	00	02	00	00
	06/MK	01	-	NF	01	RAS	01	00	02	00	00
	07/MK	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00
	08/MK	-	-	-	-	RAS	04	00	00	00	00

AG: antérieur gauche.

AD: antérieur droit.

PG: postérieur gauche.

PD: postérieur droit.

NF: non fonctionnel.

Annexe N°02: Table de lecture : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus* spp. (En médecine vétérinaire)(CLSI, 2008).

Antibiotiques testés	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques ($\mu\text{g/ml}$)			Commentaries
		R	I	S	R	I	S	
Pénicilline	10UI	≤ 28	-	≥ 29	$\geq 0,25$	-	$\leq 0,12$	
Pénicilline+Novobiocine	10UI/30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	$\geq 4/8$	2/4	$\leq 1/2$	Traitement des mammites pendant la lactation
Amoxicilline+Acide clavulanique*	20/10 μg	≤ 19	-	≥ 20	$\geq 8/4$	-	$\leq 4/2$	
Oxacilline								Tester le disque de céfoxitine à 30 μg pour détecter la résistance à la meticilline des <i>S.aureus</i> et S.C.N La résistance à la céfoxitine (et à l'oxacilline) signifie la résistance à toutes les β -lactamines N/B : **** recommandation pour la mise en évidence de la résistance à la meticilline
<i>S.aureus</i> S.C.N	1 μg 1 μg	≤ 10 ≤ 17	11-12 -	≥ 13 ≥ 18	≥ 4 $\geq 0,5$	- -	≤ 2 $\leq 0,25$	
Céfoxitine*** <i>S.aureus</i> <i>S. lugdunensis</i>	30 μg	≤ 21	-	≥ 22	≥ 8	-	≤ 4	
Erythromycine	15 μg	≤ 13	14-22	≥ 23	≥ 8	1-4	$\leq 0,5$	
Néomycine/ Kanamycine	30 μg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 64	32	≤ 16	La réponse pour la néomycine est valable pour la kanamycine
Gentamicine**	10 μg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Enrofloxacin	5 μg	≤ 16	17-22	≥ 23	≥ 4	1-2	$\leq 0,5$	
Sulfisoxazole	250 ou 300 μg	≤ 12	13-16	≥ 17	≥ 512	-	≤ 256	La réponse pour le sulfisoxazole est valable pour les sulfonamides
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1,25/23,75 μg	≤ 10	11-15	≥ 16	$\geq 4/76$	-	$\leq 2/38$	-Valable pour Triméthoprim/ Sulfadiazine -La valeur $\leq 2/38$ peut être utilisée pour les isolats des infections du tractus urinaire.
Tétracyclines	30 μg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	8	≤ 4	Valables pour chlortétracyclines, oxytétracyclines et doxycyclines.
Vancomycine**	30 μg	-	-	≥ 15	≥ 16	4 - 8	≤ 2	La détection de la résistance à la vancomycine exige une incubation de 24h.
Bacitracine	130 μg	< 15	-	≥ 15	≥ 2	-	< 2	
Clindamycine	2 μg	< 14	15-20	≥ 21	≥ 4	1-2	$\leq 0,5$	La réponse pour la Clindamycine est valable pour la lincomycine. La clindamycine est plus active sur la plupart des souches de Staphylococcus

Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved standard –Third Edition M31-A3 .Vol.28 N°8.. February 2008.

Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement, NCCLS document M31-S1. Vol.24 N°17.May 2004.

Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition, NCCLS document M31-A2 .Vol.22 N°06 .May 2002.

*Antibiotique testé seulement pour la recherche des β -lactamases

** Antibiotique testé uniquement dans le cadre de l'épidémiologie

*** Antibiotique testé seulement pour la recherche de la meticilline

****Pour la mettre en évidence de la résistance à la meticilline, le CLSI recommande dans son communiqué de février 2008 de dépister cette résistance à l'aide d'un disque de céfoxitine 30 μg (FOX)

Table de lecture: Valeurs critiques de la céfoxitine pour la détection de souches de *Staphylococcus spp.* et *aureus* **meticillinorésistantes^a** (En médecine vétérinaire) (CLSI, 2008).

Antibiotiques testés	Organismes	Diamètres critiques (mm)		Commentaires
		R	S	
Cefoxitine (30µg)	<i>S.aureus</i> and <i>S.lugdunensis</i>	≤21	≥22	<ul style="list-style-type: none"> - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 21 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥22 mm, la souche de <i>S.aureus</i> est sensible à l'oxacilline
	S.C.N sauf <i>S.lugdunensis</i>	≤24	≥25	<ul style="list-style-type: none"> - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≤24mm, la souche de S.C.N est résistante à l'oxacilline - Si le diamètre de la zone d'inhibition est ≥25mm, la souche de S.C.N est sensible à l'oxacilline

^a: L'incubation se fait pendant 18h pour le *S.aureus* et 24h pour le S.C.N.

Pour les S.C.N, dont le diamètre est ≤24, la lecture doit se faire après 18 h d'incubation.

Familles d'antibiotiques utilisés :

Famille	Antibiotique	Abréviation
β-Lactamines.	Pénicilline.	PEN.
	Amoxicilline+Acide clavulanique.	AMC.
	Céfoxitine.	FOX.
Aminosides.	Gentamicine.	GEN.
	Néomycine.	NEO.
Macrolides.	Erythromycine.	ERY.
Lincosamides.	Clindamycine.	CLI.
Cyclines.	Tétracycline.	TCY.
Sulfamides et associés.	Triméthoprime+Sulfaméthoxazole.	SXT.
Quinolones.	Ciprofloxacine.	CIP.
Polypeptides.	Bacitracine.	B.

Annexe N°03 : résultats des antibiogrammes :**01-Les souches SARM :**

Souche	PEN	AMC	FOX	ERY	NEO	GEN	CIP	SXT	TE	BA	CLI
S09	06(R)	08(R)	17(R)	06(R)	12(R)	20(S)	26(S)	27(S)	06(R)	19(S)	16(I)
S46	06(R)	17(R)	21(R)	06(R)	20(S)	28(S)	35(S)	29(S)	06(R)	18(S)	06(R)
S53	06(R)	16(R)	21(R)	25(S)	15(I)	24(S)	25(S)	30(S)	20(S)	20(S)	25(S)
S57	06(R)	13(R)	21(R)	06(R)	25(S)	28(S)	09(R)	08(R)	08(R)	24(S)	06(R)
S61	06(R)	13(R)	20(R)	17(I)	25(S)	30(S)	30(S)	31(S)	17(I)	18(S)	06(R)

02-Les souches SASM :

Souche	PEN	AMC	FOX	ERY	NEO	GEN	CIP	SXT	TE	BA	CLI
S01	11(R)	16(R)	27(S)	22(I)	17(I)	28(S)	31(S)	06(R)	09(R)	22(S)	22(S)
S02	11(R)	17(R)	26(S)	24(S)	18(S)	22(S)	31(S)	28(S)	08(R)	18(S)	15(I)
S03	09(R)	22(S)	26(S)	25(S)	18(S)	26(S)	34(S)	27(S)	11(R)	18(S)	18(I)
S04	25(R)	32(S)	29(S)	06(R)	20(S)	26(S)	27(S)	26(S)	11(R)	23(S)	15(I)
S05	11(R)	20(S)	26(S)	27(S)	20(S)	27(S)	30(S)	31(S)	08(R)	16(S)	23(S)
S06	33(S)	42(S)	36(S)	34(S)	22(S)	29(S)	40(S)	34(S)	36(S)	19(S)	30(S)
S07	21(R)	27(S)	27(S)	08(R)	17(I)	22(S)	24(S)	24(S)	08(R)	17(S)	18(I)
S08	15(R)	21(S)	27(S)	29(S)	20(S)	27(S)	36(S)	33(S)	10(R)	20(S)	20(I)
S10	11(R)	19(R)	27(S)	28(S)	18(S)	25(S)	35(S)	33(S)	08(R)	21(S)	28(S)
S11	10(R)	15(R)	30(S)	26(S)	18(S)	22(S)	34(S)	32(S)	09(R)	27(S)	27(S)
S12	11(R)	18(R)	32(S)	27(S)	20(S)	26(S)	35(S)	27(S)	08(R)	18(S)	25(S)
S13	11(R)	18(R)	29(S)	25(S)	20(S)	26(S)	33(S)	33(S)	10(R)	20(S)	29(S)
S14	17(R)	25(S)	32(S)	06(R)	18(S)	22(S)	38(S)	37(S)	14(R)	06(R)	22(S)
S15	10(R)	16(R)	31(S)	24(S)	17(I)	21(S)	32(S)	30(S)	09(R)	23(S)	23(S)
S16	25(R)	29(S)	33(S)	26(S)	19(S)	29(S)	35(S)	33(S)	31(S)	06(R)	15(I)
S17	11(R)	15(R)	30(S)	27(S)	15(I)	22(S)	33(S)	32(S)	08(R)	21(S)	25(S)
S18	12(R)	19(R)	27(S)	26(S)	18(S)	18(S)	25(S)	27(S)	09(R)	18(S)	23(S)
S19	12(R)	20(S)	28(S)	22(I)	18(S)	26(S)	32(S)	33(S)	11(R)	22(S)	25(S)
S20	12(R)	20(S)	29(S)	25(S)	20(S)	25(S)	32(S)	33(S)	08(R)	20(S)	26(S)
S21	12(R)	17(R)	29(S)	28(S)	17(I)	27(S)	31(S)	34(S)	08(R)	22(S)	26(S)
S22	18(R)	30(S)	27(S)	06(R)	23(S)	30(S)	32(S)	31(S)	09(R)	21(S)	25(S)

S23	13(R)	23(S)	30(S)	06(R)	20(S)	27(S)	14(R)	06(R)	09(R)	20(S)	13(R)
S24	09(R)	17(R)	32(S)	23(S)	20(S)	27(S)	34(S)	27(S)	31(S)	28(S)	24(S)
S25	28(R)	34(S)	33(S)	28(S)	21(S)	29(S)	32(S)	28(S)	32(S)	25(S)	26(S)
S26	12(R)	19(R)	29(S)	27(S)	22(S)	29(S)	30(S)	27(S)	06(R)	24(S)	26(S)
S27	10(R)	17(R)	29(S)	24(S)	20(S)	27(S)	35(S)	29(S)	06(R)	27(S)	31(S)
S28	26(R)	32(S)	30(S)	32(S)	22(S)	30(S)	35(S)	34(S)	24(S)	18(S)	29(S)
S29	10(R)	13(R)	29(S)	27(S)	22(S)	27(S)	33(S)	29(S)	21(S)	27(S)	30(S)
S30	08(R)	15(R)	27(S)	23(S)	18(S)	24(S)	36(S)	32(S)	32(S)	22(S)	24(S)
S31	10(R)	16(R)	30(S)	24(S)	21(S)	28(S)	32(S)	29(S)	33(S)	29(S)	27(S)
S32	19(R)	28(S)	28(S)	28(S)	22(S)	27(S)	34(S)	32(S)	06(R)	24(S)	29(S)
S33	10(R)	16(R)	31(S)	06(R)	20(S)	26(S)	33(S)	28(S)	06(R)	29(S)	28(S)
S34	26(R)	37(S)	33(S)	24(S)	24(S)	29(S)	32(S)	30(S)	34(S)	26(S)	34(S)
S35	20(R)	27(S)	27(S)	25(S)	22(S)	28(S)	32(S)	32(S)	31(S)	22(S)	25(S)
S36	06(R)	14(R)	29(S)	25(S)	17(I)	22(S)	32(S)	30(S)	29(S)	20(S)	25(S)
S37	29(S)	35(S)	31(S)	29(S)	22(S)	28(S)	33(S)	28(S)	35(S)	31(S)	29(S)
S38	19(R)	25(S)	30(S)	06(R)	22(S)	26(S)	30(S)	30(S)	09(R)	19(S)	20(I)
S39	12(R)	20(S)	33(S)	06(R)	21(S)	28(S)	32(S)	32(S)	14(R)	28(S)	07(R)
S40	12(R)	20(S)	25(S)	20(I)	27(S)	26(S)	30(S)	31(S)	10(R)	25(S)	12(R)
S41	13(R)	20(S)	26(S)	26(S)	27(S)	31(S)	35(S)	35(S)	08(R)	19(S)	30(S)
S42	24(R)	25(S)	28(S)	29(S)	20(S)	28(S)	34(S)	28(S)	32(S)	29(S)	25(S)
S43	10(R)	17(R)	25(S)	06(R)	21(S)	30(S)	33(S)	06(R)	06(R)	18(S)	06(R)
S44	29(S)	25(S)	31(S)	25(S)	35(S)	38(S)	34(S)	35(S)	13(R)	28(S)	38(S)
S45	11(R)	19(R)	28(S)	06(R)	25(S)	34(S)	33(S)	34(S)	06(R)	21(S)	12(R)
S47	11(R)	20(S)	25(S)	06(R)	26(S)	32(S)	32(S)	27(S)	08(R)	18(S)	06(R)
S48	23(R)	32(S)	29(S)	24(S)	25(S)	25(S)	31(S)	30(S)	31(S)	20(S)	27(S)
S49	25(R)	34(S)	32(S)	25(S)	20(S)	25(S)	25(S)	27(S)	10(R)	16(S)	25(S)
S50	28(R)	34(S)	38(S)	17(I)	27(S)	34(S)	45(S)	32(S)	10(R)	32(S)	27(S)
S51	10(R)	20(S)	33(S)	06(R)	22(S)	31(S)	36(S)	33(S)	13(R)	32(S)	30(S)
S52	20(R)	29(S)	31(S)	30(S)	25(S)	30(S)	33(S)	34(S)	31(S)	20(S)	29(S)
S54	13(R)	24(S)	29(S)	21(I)	22(S)	24(S)	36(S)	35(S)	34(S)	19(S)	21(S)
S55	19(R)	28(S)	31(S)	25(S)	24(S)	26(S)	34(S)	33(S)	22(S)	06(R)	18(I)
S56	22(R)	27(S)	32(S)	20(I)	23(S)	27(S)	35(S)	37(S)	22(S)	06(R)	19(I)
S58	06(R)	18(R)	32(S)	06(R)	21(S)	30(S)	36(S)	34(S)	24(S)	06(R)	06(R)

S59	10(R)	19(R)	34(S)	12(R)	27(S)	31(S)	33(S)	31(S)	20(S)	27(S)	30(S)
S60	08(R)	14(R)	27(S)	06(R)	22(S)	26(S)	30(S)	32(S)	11(R)	26(S)	06(R)
S62	09(R)	17(R)	27(S)	25(S)	21(S)	23(S)	26(S)	30(S)	26(S)	27(S)	23(S)

Annexe N°04 : Résultats de la caractérisation moléculaire des isolats :

Isolats	Gènes recherchés par PCR							
	<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>	<i>nuc</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>sea</i>	<i>Luk-M</i>	<i>TsstI</i>
S01	-	-	+	+	+	-	-	-
S02	-	-	+	+	+	-	-	-
S03	-	-	+	+	+	-	-	-
S04	-	-	+	+	+	-	-	-
S05	-	-	+	+	+	-	-	-
S06	-	-	+	-	-	-	-	-
S07	-	-	+	-	-	-	-	-
S08	-	-	+	-	-	-	-	-
S09	-	+	+	-	-	-	-	-
S10	-	-	+	-	-	-	-	-
S11	+	-	+	-	-	-	-	-
S12	+	-	+	-	-	-	-	-
S13	-	-	+	-	-	+	-	-
S14	-	-	+	-	-	+	-	-
S15	-	-	+	+	+	-	-	-
S16	-	-	+	+	+	-	-	-

S17	-	-	+	+	-	-	-	-
S18	-	-	+	+	+	-	-	-
S19	-	-	+	+	-	-	-	-
S20	+	-	+	+	+	-	-	-
S21	+	-	+	-	-	-	-	-
S22	-	-	+	-	-	-	-	-
S23	+	-	+	-	-	-	--	-
S24	-	-	+	-	-	+	-	-
S25	-	-	+	+	+	-	-	-
S26	-	-	+	-	-	+	-	-
S27	-	-	+	+	+	-	-	-
S28	-	-	+	+	+	-	-	-
S29	-	-	+	-	-	-	-	-
S30	+	-	+	-	-	-	-	-
S31	-	-	+	-	-	-	-	-
S32	-	-	+	-	-	-	-	-
S33	-	-	+	-	-	-	-	-
S34	+	-	+	-	-	-	-	-
S35	-	-	+	+	+	-	-	-
S36	+	-	+	+	+	-	-	-
S37	-	-	+	-	-	-	-	-

S38	+	-	+	+	+	-	-	-
S39	+	-	+	+	+	-	-	-
S40	-	-	+	-	-	-	-	-
S41	+	-	+	-	-	-	-	-
S42	-	-	+	-	-	-	-	-
S43	+	-	+	-	-	-	-	-
S44	-	-	+	-	-	-	-	-
S45	-	-	+	+	+	-	-	-
S46	-	+	+	-	-	+	-	-
S47	-	-	+	-	-	-	-	-
S48	-	-	+	-	-	+	-	-
S49	-	-	+	-	-	-	-	-
S50	-	-	+	-	-	-	-	-
S51	-	-	+	-	-	-	-	-
S52	-	-	+	-	-	-	-	-
S53	+	+	+	-	-	-	-	-
S54	-	-	+	-	-	-	-	-
S55	-	-	+	-	-	-	-	-
S56	-	-	+	-	-	-	-	-
S57	-	+	+	-	-	-	-	-
S58	-	-	+	-	-	-	-	-

S59	-	-	+	-	-	-	-	-
S60	+	-	+	+	+	-	-	-
S61	-	-	+	-	-	-	-	-
S62	-	-	+	-	-	-	-	-

Annexe N°05 : Composition des milieux de culture :**Gélose chapman :**

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

Composition :

Composition pour la préparation d'un litre de milieu.

- Peptone10,0 g
- Extrait de viande de bœuf.....1,0 g
- Chlorure de sodium.....75,0 g
- Mannitol10,0 g
- Rougedéphénol0,025 g
- Agar-Agar.....15,0 g
- Eau distillée.....qsp 1Litre

pH = 7,4

Gélose TSA :

La gélose Tryptone-Soja (TSA) est un milieu d'utilisation générale, permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de microorganismes. Il peut être additionné de 5 à 7% de sang pour déterminer les réactions hémolytiques.

Composition :

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales. Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 15,0 g
- Peptone papainique de soja 5,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Agar agar bactériologique 15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,3 ± 0,2.

Bouillon cœur-cervelle :

Le bouillon cœur-cervelle, milieu nutritif tamponné, est utilisé pour la culture d'une très grande variété de microorganismes aérobies ou anaérobies, incluant levures et moisissures. Il convient aussi pour la mise en évidence de la staphylocoagulase et de la thermonucléase des Staphylocoques.

Sa richesse en éléments nutritifs permet aux bactéries exigeantes d'atteindre rapidement la phase stationnaire de croissance.

Composition :

- Infusion de cervelle de veau.....12.5 g
- Infusion de cœur de bœuf.....5.0 g
- Peptone.....10.0 g
- Glucose.....2.0 g
- Chlorure de sodium.....5.0 g
- Phosphatase di sodique.....2.5 g

pH= 7.4

Gélose a ADN :

La Gélose à l'acide désoxyribonucléique permet la recherche de la désoxyribonucléase des bactéries, particulièrement des staphylocoques pathogènes ainsi que l'isolement et la différenciation de *Serratia marcescens*.

Composition :

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Tryptose.....20,00 g.
- Acide désoxyribonucléique.....2,00 g.
- Chlorure de sodium.....5,00 g.
- Agar.....15,00 g.

pH final à 25°C : 7,3 ±0,2

Gélose Mueller Hinton :

La gélose Mueller–Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries peu exigeantes aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de dilution en gélose.

Composition :

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Peptone.....17,50 g.
- Extrait de viande.....2,00 g.
- Amidon.....1,50 g.
- Agar.....17,00 g.

pH final à 25°C : 7,3 ±0,1 .

Gélose de conservation:

Le milieu pour la conservation des souches est recommandé pour la conservation des micro-organismes peu exigeants comme les *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Staphylococci* et *Vibrionaceae*.

Composition :

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Peptone.....10,00 g.
- Extrait de viande.....5,00 g.
- Chlorure de sodium.....5,00 g.
- Agar.....10,00 g.

pH final à 25°C: 7,3 ± 0,2.

Gélose nutritive:

En biologie, la gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire est un milieu d'isolement non sélectif.

Composition

- Extrait de viande.....1,0 g.
- Extrait de levure.....2,5 g.
- Peptone..... 5,0 g.
- Chlorure de sodium..... 5,0 g.
- Agar-agar.....15,0 g .

pH = 7,0.

***Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS**

Bouzidi Said¹, Ghazi Kheira¹, Meliani Samia^{2*}, Boulbair Ismail¹, Chaouch Rouba¹

¹The Veterinary Sciences Institut, University of Tiaret, 14000, Algeria;

²Nature and life sciences faculty, University of Tiaret, 14000, Algeria;

*Corresponding Author Meliani Samia, e-mail: meianisamia@hotmail.com;

Received July 2020; Accepted August 2020; Published September 2020;

DOI: <https://doi.org/10.31407/ijeess10.406>

ABSTRACT

The aim of this work was to study the sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis to antibiotics. A total of 22 pure strains of *S. aureus* were collected from 58 quarter milk samples from 29 (69,04%) dairy cows detected with subclinical mastitis by California mastitis test (CMT). The isolates were subjected to an antibiogram. The tests showed that one strain among the isolates tested is MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). This MRSA exhibited cross-resistance to all betalactamines which extends to other families of antibiotics. SASM strains also showed strong resistance vis-à-vis penicillin (95,23%) and tetracycline's (90,47%) Resistance was also recorded vis-à-vis; the combination amoxicillin + clavulanic acid (47,61%), erythromycin (19,04%), the combination trimethoprim + sulfamethoxazole (4,76%) and bacitracin (9.52%). neomycin, gentamicin, ciprofloxacin and clindamycin were active on MRSA's. The high prevalence of subclinical mastitis and multi-resistant *S. aureus* strains testifies to the need for an effective control strategy based essentially on the early detection of subclinical mastitis, the identification of the causative agent and the study of its sensitivity to common antibiotics.

Keywords: Mastitis, SARM, Antibiogram, SASM, *S. aureus*.

INTRODUCTION

Mastitis is considered to be one of the most important, frequent and costly pathologies affecting dairy cows (Boutet *et al.*, 2005, Bradley, 2002). It is the most penalizing for dairy farming (Rémy, 2010). Mastitis in cow continues to be the main cause, far ahead of reproduction, of economic losses, for health reasons: milk not produced, not marketed, lower payment for milk for insufficient cell quality, culling of cows that cannot be treated, treatment costs and time spent performing them (Dumas *et al.*, 2004). It is also the main source of antibiotic consumption with two treatments per cow and per year on average, and the first source of milk pollution by antibacterials agents (Durel *et al.*, 2004; Sérieys, 2004).

Mastitis is none other than inflammation of one or more quarters of the udder, usually caused by a bacterial infection. Depending on whether or not it is associated with clinical signs, a common distinction is made between clinical mastitis associated with inflammatory symptoms and subclinical infections (Gedilaghine, 2005). The latter are much more frequent than clinical infections, more insidious because they are hardly detectable (Debreil, 2008).

They are responsible for about 80% of the whole economic losses associated with mastitis (Seegers *et al.*, 2003; Shim *et al.*, 2004; Petrovski *et al.*, 2006). The clinical character or not of mastitis is mostly influenced by the genus and species of the pathogenic bacteria (Rainard and Riollet, 2006). *Staphylococcus aureus* is one of the most important contagious pathogens in cattle. Because of its zoonotic potential, the control of *Staphylococcus aureus* is not only of great economic importance in the dairy industry, but also a public health problem and of important health safety. It is a germ resistant to many antibiotics. Relapses are therefore frequent, especially if hygiene measures are not applied. *Staphylococcus aureus*, although can induce clinical mastitis, most frequently causes subclinical mastitis (Sutra and Poutrel, 1994; Sears and Mccarthy, 2003). This subclinical mastitis caused by *S. aureus* also tend to become chronic and persist for long periods of time (Sears and Mccarthy, 2003). The CMT, developed by Schalm and Noorlander in (1957), was particularly aimed at the detection of subclinical mastitis directly in the stable. The principle is based on the use of a surfactant (Teepol) which is a detergent to which is associated a colored pH indicator. It bursts cells and reacts with their deoxyribonucleic acid (DNA) by forming a gel whose viscosity increases as the cell content increases (M'sadak *et al.*, 2014). This test is easily performed. It consists of taking a little milk from each quarter in the corresponding cup on a tray. About 2 ml of milk are kept per cup, then an equal quantity of surfactant is added and mixing is ensured by a slight circular motion. Reading should be immediate.

The CMT score ranges from 0 to 4 depending on the appearance of the mixture (Faroult *et al.*, 2003). This test is considered positive from a score of 2. If at least one quarter is positive, the cow is declared positive and if all the quarters are negative, the cow is declared healthy.

Antimicrobial resistance profiles are part of the epidemiological knowledge that constitutes the key informations for decisions on therapeutic strategies. Although low incidences of resistance in *S. aureus* isolated from bovine mastitis have generally been reported (Bengtsson *et al.*, 2009; Botrel *et al.*, 2010; Monecke *et al.*, 2007), multi resistant phenotypes and methicillin resistant strains (MRSA) have been increasingly described recently (Fessler *et al.*, 2010; Vanderhaeghen, *et al.*, 2010). Our work aims to study the antibio sensitivity of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in order to guide therapeutic management and therefore contribute to the improvement of fight plans against this pathology.

MATERIALS AND METHOD

This study was conducted over a six-month period (May - October 2019) on four farms located in the district of Tiaret in Algeria. The criteria for choosing farms were ease of access and availability of breeders. The Herds size was variable, with one (01) to twenty-eight (28) cow per farm. A total of 167 quarter milk samples were taken from 42 lactating cows (01 quarter was found to be non-functional).

The bacteriological unit is the quarter. Also, samples must be taken quarter by quarter and bacteriological examinations cannot be carried out on the milk mixture of 04 quarters. Milk samples were taken directly from the udder, before the evening milking. Two samples were taken from each quarter: the first was used to detect subclinical mastitis at the foot of the cow with the California mastitis test (CMT). The second was intended for bacteriological analysis and concerned only the milk samples detected positive by the CMT. The volume taken is approximately 20 milliliters. During clinical mastitis: all the quarters showing clinical signs of mastitis including at least an apparent modification of the milk observed on the bowl with a black background (lumps) and / or a modification of the quarter are then taken.

Milk samples were collected in sterile vials after washing and drying the teats, disinfection of the end of the teat using cotton soaked in 70° alcohol and elimination of the first jets. Our samples were shaken carefully to ensure as even a distribution of the microorganisms as possible.

Bacteriological isolation was performed on Chapman's medium. Purification of isolates was performed based on cultural traits and Gram stain to select colonies showing Gram positive cocci. This purification is done by continuing subculturing on the same type of medium until obtaining a pure isolate with the same characteristics as that obtained in the first isolation. The hemolytic character was sought by inoculating the isolates on Trypto-Casein-Soy agar, supplemented with 5% sterile defibrinated sheep blood.

The identification of the genus was made by the search for catalase which is of paramount importance for the differentiation between the genera *Staphylococcus* and *Streptococcus*.

The identification of the species: was carried out by researching Staphylocoagulase which is an enzyme capable in vitro of clotting rabbit plasma and DNase which hydrolyzes DNA.

The study of antibiotic sensitivity tests was carried out by the classical method of diffusion of the antibiotic on Müller Hinton agar according to the recommendations of the CLSI (2011).

The sensitivity of the isolated strains was determined mainly with respect to eleven antibiotics: Penicillin (10 IU), Amoxicillin + Clavulanic acid (20/10 µg), Cefoxitin (30 µg), Erythromycin (15 µg), Neomycin (30 µg), Gentamicin (10 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Trimethoprim + Sulfamethoxazole (1.25 / 23.75 µg), Tetracyclines (30 µg), Bacitracin (130 µg), Clindamycin (2 µg). Resistance to oxacillin is tested using a cefoxitin disc (30 µg) with an inoculum of 10⁶CFU/ml. The diameters of the inhibition zones are measured with precision using a caliper. The results obtained are compared with the critical values shown in the corresponding reading tables, and the bacterium is classified in one of the categories S, R or I. A reference strain (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) was used for quality control of the antibiogram.

RESULTS AND DISCUSSION

Of the 42 lactating cows tested ,29 (69.04%) were CMT positive with 58 positive quarters out of the 167 quarters tested, i.e. a rate of 34.73% (Table 1).

Table 1. Results of the California Mastitis Test

<i>Farms</i>	<i>cows tested</i>	<i>Positive cows (frequency)</i>	<i>Positive quarters (frequency)</i>
<i>F1</i>	<i>04</i>	<i>3 (75%)</i>	<i>8 (53,33%)</i>
<i>F2</i>	<i>03</i>	<i>2 (66,66%)</i>	<i>2 (16,66%)</i>
<i>F3</i>	<i>07</i>	<i>6 (85,71%)</i>	<i>14 (50%)</i>
<i>F4</i>	<i>28</i>	<i>18 (64,28%)</i>	<i>34 (30,35%)</i>
<i>Total</i>	<i>42</i>	<i>29 (69,04%)</i>	<i>58 (34,73%)</i>

In our study, the prevalence of quarters with subclinical mastitis according to the CMT test (34.73%) is close to the results found by Belmamoun (2016) in western Algeria with a rate of 33.6%. It is higher than that reported by Boufaïda Asnour *et al.*, 2016 in north-eastern Algeria with a rate of 28.7%, and that found in the study by Saidi *et al.*, 2012 in the central region of Algeria with a rate of 28.77%.

However, our result is lower than that found by; Benhamed (2014) in the Oran region of Algeria, Shyaka *et al.*, 2010 in the farm of Wayembam (Senegal) and M'sadak *et al.*, 2014 in the region of Monastir (Tunisian Sahel) with 40.56% , 38.83% and 60% respectively. The CMT test, long used in several countries (Rakotozandrindrainy *et al.*, 2007), remains the best indirect technique feasible in dairy cows to detect subclinical mastitis (Ruegg and Reiman, 2002).

According to Hanzen (2015), the CMT has above all a point value as a complement to the determination of the cell level when it comes to deciding on the culling of an animal or the specific treatment of one or the other quarter. It also makes it possible to verify the healing of the animal. Systematically carried out during milking, it lengthens its duration and involves the recording of a large amount of information.

Finally, it can be used to determine the extent of losses in milk production. CMT, when performed regularly, has the same indications as individual cell count. It has the advantage, over the latter, of being less expensive, of being able to be carried out by all breeders and of providing a more precise picture of infections by giving results quarter by quarter. It can also be used to check or even select the animals to be treated at the time of dry-off. According to Debreil (2008), subclinical mastitis are much more common than clinical infections, which is consistent with our study where subclinical infections were detected in 69.04% of lactating cows tested. A high prevalence (73.6%) of subclinical mastitis was also reported by Bouaziz (2005) in eastern Algeria.

Of the 58 milk samples taken for bacteriology, 22 gave rise to a positive culture on Chapman's medium with golden, creamy, bulging colonies, 1 to 2 µm in diameter, smooth, shiny and surrounded by a yellow halo due to the attack of mannitol. Purification of the isolates allowed us to select 22 strains which were found to be Gram-positive cocci, grouped in clusters in the form of bunches of grapes. They are beta hemolytic on TSA medium supplemented with 5% of sterile defibrinated sheep blood. They are catalase positive, coagulase positive, DNase positive, which allowed them to be assigned to the species *Staphylococcus aureus*. Using the cefoxitin test, 01 single strain out of

the 22 isolates of *S. aureus* exhibited resistance to ceftiofur, i.e. a rate of 4.54%, and 21 strains were found to be sensitive to ceftiofur, i.e. a rate of 95.46%. The methicillin-resistant strain of *S. aureus* exhibits cross-resistance to β -lactams which extends to other families of antibiotics. It has been shown to be resistant to penicillin, the combination Amoxicillin + clavulanic acid, erythromycin, and neomycin.

On the other hand, gentamicin, ciprofloxacin, the combination Trimethoprim + Sulfamethoxazole and bacitracin were significantly more active on this strain. The phenomenon of antibiotic resistance has not spared tetracycline.

For clindamycin, the isolated MRSA shows intermediate sensitivity. Benhamed (2014) and Akkou (2016) did not isolate any MRSA from bovine mastitis in Algeria. In contrast, Smaali (2020) reported that the prevalence of MRSA isolated from mastitis in ruminants in the region of Tebessa in Algeria was 1.2%. These MRSA were resistant to more than one antibiotic namely; tetracycline (75%), erythromycin (25%), ampicillin (25%). However, these MRSA were 100% sensitive to clindamycin. Enany *et al.*, 2013 reported that 18.18% of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis in Egypt were resistant to methicillin. Gindonis *et al.*, 2013 also found in Finland that 1.5% of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis were MRSA which are resistant to penicillin (100%), trimethoprim (50%) but susceptible to: tetracycline, erythromycin, clindamycin, gentamicin and ciprofloxacin. Jamali (2014) found that 11.6% of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical bovine mastitis in Iran were MRSA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections worsen the prognosis and seriously complicate the management of staphylococcal disease. As a result, they represent a major public health problem (Gould, 2005). These bacteria are the source of severe nosocomial infections but also of community pathologies (Chambers, 2001). However, the detection of MRSA in animals once again confirms the risk to human health, not only to the consumer but also to all persons who come into contact with these animals (personnel of establishments intended for the slaughter of animals, veterinarians, breeders) (Maisiyama *et al.*, 2014).

Indeed, several studies have reported that close and repeated contact with these animals is a risk factor for the acquisition of MRSA. These at-risk individuals can then serve as reservoirs for MRSA and ensure its dissemination in the community (Lekkerkerk *et al.*, 2015). In terms of food safety, the presence of MRSA in food and in particular in raw bovine milk presents a proven threat, especially when it is consumed raw or used in cheese production, thus constituting a source of contamination for processed dairy products. The resistance of a strain of *Staphylococcus aureus* to methicillin is explained by the fact that it possesses the *mecA* gene which codes for a modified protein (PLP2a). The antibiotic resistance of MRSA isolated in our work could be explained on the one hand by the accumulation of this strain of several resistance mechanisms (the genetic flexibility of *Staphylococcus aureus* allowed it to acquire several mechanisms) (Hiramatsu, 2001), and on the other hand, by a selection pressure generated by an irrational use of antibiotics (Abbanat *et al.*, 2008). MRSA strains are most often resistant to other classes of antibiotics (Speller *et al.*, 1989), they are considered to be multi-resistant bacteria, and resistance to methicillin has since been used as a marker of multi-resistance (Grohs, 2009).

Of the methicillin-sensitive strains, only one strain (4.76%) was susceptible to all antibiotics tested, and the remaining strains (95.24%) were resistant to more than one antibiotic. SASMs show resistance to; penicillin (95.23%), to the combination of amoxicillin + clavulanic acid (47.61%), to erythromycin (19.04%), to the combination of Trimethoprim + Sulfamethoxazole (4.76%), to tetracyclines (90.47%), and bacitracin (9.52%). However, no resistance is noted against neomycin, gentamicin, ciprofloxacin and clindamycin.

Akkou (2016), reported resistance of MSSA isolated in Algeria of 86.5% against penicillin, 4.5% against erythromycin, 14.9% vis-à-vis tetracyclines and 3% vis-à-vis clindamycin. For gentamicin, the latter's result agrees with our study where no resistance was noted.

In the study carried out in Algeria by Belmamoun (2016), isolated MSSA showed strong resistance to penicillin G and tetracycline with levels of 80.95% and 71.43% respectively which is consistent with our study where strong resistances were recorded. For gentamicin, the result reported by the latter is in agreement with our study where the isolates were 100% sensitive. For the amoxicillin + clavulanic acid combination, Belmamoun (2016) reported a resistance rate of 14.28% which is lower than our result where resistance was detected in 47.61% of MSSA.

However, Belmamoun (2016) reported resistance rates in the order of; 4.76%, 14.28%, 14.29% towards ciprofloxacin, neomycin and clindamycin respectively. This result no longer agrees with our study where the isolated MSSA was 100% sensitive. For the combination trimethoprim + sulfamethoxazole and bacitracin, Belmamoun (2016) found that the isolated MSSA were 100% sensitive which is inconsistent with our results where resistances in the order of; 4.76%, 9.52% were detected.

El Behiry *et al.*, 2012 found that 85.71% of MSSA isolated from subclinical mastitis in German cows were resistant to penicillin G. Unlike our study, these strains were resistant to gentamicin (10.71%) but sensitive for 100% to erythromycin. Sahebkhitiari *et al.*, 2011 reported that MSSA isolated from subclinical mastitis in cattle in the

Mashhad and Tehran regions of Iran were sensitive to gentamicin and ciprofloxacin. This result is in agreement with our study.

Table 2. Results of the antibiogram of SASM

<i>Antibiotics</i>	<i>R (%)</i>	<i>I (%)</i>	<i>S (%)</i>
<i>Penicillin</i>	95,23	/	4,76
<i>Amoxicillin + Clavulanic acid</i>	47,61	/	52,38
<i>Cefoxitin</i>	00	/	100
<i>Erythromycin</i>	19,04	9,52	71,42
<i>Neomycin</i>	00	23,80	76,19
<i>Gentamicin</i>	00	/	100
<i>Ciprofloxacin</i>	00	/	100
<i>Trimethoprim + Sulfamethoxazole</i>	4,76	/	95,23
<i>Tetracyclines</i>	90,47	/	9,52
<i>Bacitracin</i>	9,52	/	90,47
<i>Clindamycin</i>	00	28,57	71,42

However, Sahebkhitiari *et al.*, 2011 recorded that the MSSA isolated in their study were resistant to penicillin (56%), to clindamycin (22%), to tetracycline (22%) and to the combination Trimethoprim + Sulfamethoxazole (2%). Yadav *et al.*, 2015 reported through their study that MSSA isolated from mastitis milk in cattle were sensitive for 100% to gentamicin and for 87.50% to neomycin. On the other hand, resistances were recorded vis-à-vis; erythromycin (6.25%) and bacitracin (18.75%).

Since antimicrobials play a key role in mastitis control programs and mastitis is the leading cause of antibiotic use in dairy animals (Awandkar *et al.*, 2013), the abusive and inappropriate use (insufficient doses, non-compliance with the duration of treatment) of these molecules has led to the appearance of resistance. The high rate of resistance to penicillin and tetracycline may be due to the widespread administration of these antimicrobials in dairy farms (Jamali *et al.*, 2015). In addition, it is postulated that resistance is exacerbated by the frequent use of intra-mammary preparations by farmers (Kateete *et al.*, 2013).

In Algeria, betalactamins including penicillin G are widely used in the treatment of mastitis without any test of the sensitivity of the bacterial strains to these antimicrobials. Thus, in 1941, penicillin-resistant staphylococci appeared, thanks to the acquisition of a plasmid penicillinase, an enzyme that degrades penicillin. Penicillin resistance initially restricted to hospitals, quickly spread to community setting and currently affects more than 90% of *S. aureus* strains (Dumitrescu *et al.*, 2010) which may partly explain the rate of resistance (95.23%) recorded in our study vis-a-vis penicillin.

According to Dumitrescu *et al.*, 2010, *Staphylococcus aureus* is a formidable pathogen that has developed resistance to each new antibiotic introduced for half a century. The plasticity of its genome gives it the ability to adapt to all environmental conditions, including acquiring antibiotic resistance genes and developing regulatory mechanisms to adapt to increasing concentrations of antibiotics. Among the isolated MSSA, the high rate of multi-resistant strains (95.24%) recorded in our study is worrying, on the one hand by the fact that the emergence of multi-resistant bacteria will increasingly confront clinicians with real therapeutic impasses (Sanders *et al.*, 2011), and on the other hand by the fact that the transmission of this type of bacteria from animals to humans is possible either by direct contact or via the food chain from food and animal products contaminated by these bacteria (Petinaki and Spiliopoulou, 2012). The total sensitivity of MSSA to; neomycin, gentamicin, ciprofloxacin and clindamycin may be justified by their lower use in veterinary practice in Algeria.

CONCLUSION

In the light of our study, we concluded that subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* remains the most common and most serious pathology in dairy cows. The control of subclinical mastitis is just as crucial as the treatment of clinical cases because; The antibiogram of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical

mastitis in cows showed a low prevalence of MRSA. Likewise, a high prevalence of multidrug resistance has been recorded. The isolates tested showed strong resistance to penicillin and tetracycline which are commonly used in veterinary medicine in Algeria.

REFERENCES

1. Abbanat D, Macielag M, Bush K, 2008. New agents in development for the treatment of bacterial Infections. *Current Opin Pharmac*; 8:582–592;
2. Akkou M *et al.*, 2016. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains Associated with Bovine Mastitis and Nasal Carriage of Workers in Contact to Animals in Algeria. *Pak Vet J*, 36(2): 184-188;
3. Awandkar S.P., A.U. Bhikane and M.B. Kulkarni. 2013. Antibiotic resistance trends in clinical bovine mastitis. *Bioline* 1:139-143;
4. Belmamoun A. R (2016). Étude microbiologique, épidémiologique et antibiorésistance du *Staphylococcus aureus* dans le lait de vache atteinte de mammite. these de doctorat en sciences.universite djillali liabes–Algérie-160p;
5. Bengtsson B *et al.*, 2009. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 136:142– 149;
6. Benhamed .N, 2014 . Evaluation de la qualité microbiologique et sanitaire du lait cru dans la région d’Oran, Algérie : Etude du profil moléculaire virulent des *Staphylococcus aureus* impliquées dans les mammites bovines. Thèse De Doctorat Troisième Cycle (Lmd) en Microbiologie Appliquée Option : Contrôle microbiologique et Hygiène alimentaire- université d’Oran –Algérie;
7. Botrel M. A., *et al.*, 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:479–487;
8. Bouaziz O (2005). Contribution à l’étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l’Est Algérien. Thèse pour l’obtention du diplôme de Doctorat d’Etat en pathologie de la reproduction. Université de Constantine-Algérie;
9. Boufaïda ASNOUNE Z, ASNOUNE B., BUTEL M.J. , OUZROUT R.(2016).Etiologie des mammites subcliniques en élevages bovins laitiers du nord-est de l’Algérie. *Renc. Rech. Ruminants*, 2016, 23. p318;
10. Boutet P., Detilleux J., Motkin M., Deliege M., Piraux E., Depinois A., Debliquy P., Mainilj., Czaplicki G., Lekeux P., 2005. Comparaison du taux cellulaire et de la sensibilité antimicrobienne des germes responsables de mammite subclinique bovine entre les filières conventionnelle et biologique. *Ann. Méd. vét.*, 149: 173-182;
11. Bradley A.J., 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. *Vet. J.*, 164: 116-128;
12. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001 ; 7 : 178-82;
13. Debreil E, (2008). Les analyses bactériologiques du lait des infections mammaires bovines applicables au cabinet vétérinaire en pratique courante et leurs intérêts dans le traitement des mammites. Thèse pour le doctorat vétérinaire. École nationale vétérinaire d’Alfort.103 p;
14. Dumas P.L., Faroult B., Serieys F. - Assurer le traitement en exploitation laitière : expérience et perspectives de l’action G.T.V. Partenaire. Journées Nationales des G.T.V., Tours, France, 2004, 71-75.
15. Dumitrescu *et al.*, 2010. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. *Les points-clés en 2010. MEDECINE/SCIENCES* ; 26 : 943-949;
16. Durel L, FAROULT B, LEPOUTRE D, BROUILLET P, LE PAGE P. Mammites des bovins (cliniques et subcliniques). Démarches diagnostiques et thérapeutiques. *Supplément technique, Dépêche Vétérinaire*. 2004, 87, 42 p;
17. El Behiry A, Schlenker G, Szabo I, Roesler U. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. *J. Vet. Sci.* (2012), 13(2), 153-161;
18. Enany, M.E., Younes, S. *, AL gammal, A.M. Salem, M. ** and El Dieb, H.A.(2013). Prevalence of coagulase (coa) gene and mec A gene of *S. aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *SCVMJ*, XVIII (1) :149-157;
19. Faroult B., Poutrel B., Brouillet P., Le Page P., 2003. *Dépêche vét. (Suppl.)* : 87;

20. Fessler, A., et al. 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. J. Antimicrob. Chemother. 65:619–625;
21. Gedilaghine V. 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 Doct. Vét., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Alfort, France, 2005, 106 p. theses.vetalfort.fr/telecharger.php?id=772;
22. Gindonis V (2013). Occurrence and characterization of methicillin resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. Acta Veterinaria Scandinavica .55:61;
23. Gould IM. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect 2005 ; 61 : 277-82;
24. Grohs P. Évolution de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques : la méticilline est-elle encore un marqueur de multirésistance ? Pathologie Biologie 2009 ; 57 : 1–8;
25. Hanzen C, (2015). Physio-anatomie et propédeutique de la glande mammaire. Symptomatologie, étiologie et thérapeutiques. Approches individuelles et de troupeau des mammites. Université de Liège. Faculté de médecine vétérinaire. 170 p;
26. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. The Lancet Infectious Diseases 2001, 1: 147-155;
27. Jamali H, Radmehr B, Ismail S (2014). Short communication: prevalence and antibiotic Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. J. Dairy Sci.;
28. Jamali, H., Paydar, M., Radmehr, B., Ismail, S., & Dadrasnia, A, (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. Food Control, 54: 383-388;
29. Kateete, D. P., Kabugo, U., Baluku, H., Nyakarahuka, L., Kyobe, S., Okee, M., Najjuka, C. F., & Joloba, M. L (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. PloS one, 8(5): e63413;
30. Lekkerkerk WSN, van Wamel WJB, Snijders SV, Willems RJ, Van Duijkeren E, Broens EM, Wagenaar JA, Lindsay JA, Vosa MC (2015). What Is the Origin of LivestockAssociated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 isolates from humans without livestock contact? An epidemiological and genetic analysis. J. Clin. Microbiol. 53: 1836-1841. <https://doi.org/10.1128/JCM.02702-14>;
31. Mai-siyama IB, Okon KO, Adam NB, Askira UM, Isiaka TM, Adamu SJ, Mohammed A (2014). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization rate among ruminant animals slaughtered for human consumption and contact person in Maiduguri, Nigeria. Afr. J. Microbiol. Res. 2643-2649. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6855>;
32. Marchal.N, Bourdon.J.L, Richard.CL (1987).Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. ISBN 2-7040-0541-9 (3^{ème} édition):505 p;
33. Monecke, S., P. Kuhnert, H. Hotzel, P. Slickers, and R. Ehricht. 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. Vet. Microbiol. 125: 128–140;
34. M'sadak.Y, MAKHLOUF.M & BEN OMRANE.H, Étude sanitaire mammaire et pertes laitières conséquentes en élevage bovin hors sol dans la région de Monastir (Sahel Tunisien) Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. (2014) 2 (1):37-43;
35. Petinaki E, Spiliopoulou I (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among companion and food-chain animals: impact of human contacts Clin. Microbiol. Infect. 18: 626-634. <https://doi.org/10.1111/j.14690691.2012.03881.x>;
36. Petrovski k., TRAJCEV M., BUNESKI g. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. J. S. Afr. Vet. Assoc., 2006, 77, 52-60;
37. Rainard P., RIOLLET C. Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet. Res., 2006, 37, 369400.
38. Rakotozandrindrainy R., Razafindrajaona J.M., Foucras G. - Diagnostic rapide à la ferme des mammites subcliniques des vaches laitières du triangle laitier des hautes terres de Madagascar. Revue Méd. Vét., 158, 2007, 100-105 ;
39. Remy D., 2010. Les mammites : hygiène, prévention, environnement, 1re éd. Paris, France, La France agricole, 260 p ;
40. Ruegg P.L., Reiman D.J. - Milk quality and mastitis tests. Bovine Pract., 36, 2002, 41-54;

41. Sahebkhitiari N *et al.*, 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in tehran and mashhad. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 58 (2), pp. 113–121;
42. Saidi R, Khelef D, Kaidi R. Etude de l'incidence et de l'étiologie des mammites subcliniques dans les troupeaux bovins laitiers de la région centre de l'Algérie. *Renc. Rech. Ruminants*, 2012, 19,p 142;
43. Sanders P, Bousquet-Melou A, Chauvin C, Toutain PL (2011). Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00939567>;
44. Sear S P., MCCARTHY K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 2003, 19, 171-185;
45. Seeger S h., FOURICHON C., BEAUDEAU F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.*, 2003, 34, 475491;
46. Sériey F. - Le traitement ciblé des mammites: Enjeux et faisabilité. *Le Point Vétérinaire*, 35(246), 2004, 5459. www2.toulouse.inra.fr/sante-animale/velisa/article.php?auteur=166 ;
47. Shim E., SHANKS R., MORIN D. Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87, 2702-2708 ;
48. Shyaka A, KADJA M.C; KANE Y; KABORET Y; BADA ALAMBEDI R. Diagnostic des mammites cliniques et subcliniques en élevage bovin laitier intensif. Cas de la ferme de Wayembam (Sénégal). *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*. Vol.8 N03-4, 2010;
49. Smaali S, Boukazoula F, Saadi L, Brahem I (2020). Prevalence of Methicillin-resistant Staphylococcal Mastitis in Ruminants. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. Volume 8(4): 428-432;
50. Speller DC, Johnson AP, James D, Marples RR, Charlett A, George RC. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid. *England and Wales. Lancet* 1989; 350:323-5;
51. Sutra L., POUTREL B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994, 40, 79-89;
52. Yadav R, Kumar Sharma S, Yadav J, Choudhary S and Kataria A K. Profiling of Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Obtained from Mastitic Milk of Cattle and Buffalo. *Journal of Pure And Applied Microbiology*, June 2015 .9(2):1539-1544;
53. Vanderhaeghen, W. *et al.*, 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet. Microbiol.* 144:166–171;