

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun–Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

HARECH MAHDJOUBA

HACINI ASMA

TAYEBI FAIZA

Thème

**Isolement et identification de *Staphylococcus aureus*
responsable de mammite clinique chez les ruminants**

Soutenu publiquement le : 29/06/2019

Jury:Grade

Président: M^{me} AIT ABDERRAHIM LEILA.MAA

Encadreur : M.BIA TAHA.Enseignant vacataire

Co-encadreur: M. MEKHLouFI AMINE.Enseignant vacataire

Examinatrice: M^{lle} MADJBER NASSIRA.MCB

Année universitaire 2018-2019



Remerciements

*Nos remerciements vont tout premièrement à Dieu tout-puissant Pour
La volonté, la santé et la patience, qu'il nous A donnée
Durant toutes ces longues années.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur Monsieur **Bia Taha**
et le co-promoteur Monsieur **Makhloufi Amin**, Qui nous inspiré le sujet Et Guidé dans
sa simulation pour son aide, ces conseils Et la documentation qu'il nous a fournie.
Egalement nous adressons un grand merci à Monsieur **HOCINE L.** Responsable de la
spécialité.*

*Nos sincères remerciements vont aux membres du jury Pour L'honneur
Qu'il nous en fait en participant au
Jugement de ce travail.*

*Nos remerciements vont aussi à tous les enseignants du Département De
Sciences de la nature et de la vie spécialement les enseignants de microbiologie
appliquée qui Ont Contribué à notre formation.*

*Nous remercions aussi tous les membres de Laboratoire de Microbiologie de la faculté
des Sciences de la Nature et de la Vie pour leur disponibilité et leur
compréhension.*

*Nous tenons à remercier vivement toute personne qui nous A aidés De près
Au de loin à réaliser ce mémoire.*



Dédicace

Je rends hommage à mon dieu tout puissant.

Ce travail est dédié :

A Mes parents qui je ne saure jamais remercier

Assy Pour Les sacrifices qu'il a consentaient pour moi

Ainsi que chaque instant, De bonheur de qu'elle m'a procuré.

Je dédie ce modeste travail aussi à:

*Mes chères frères et sœurs et plus particulièrement ma tante **Karima** qui je la remercie et je n'oublierai jamais son soutien dans les moments difficile.*

A tout la famille.

A mes amis.

*Mes cousins et cousines spcialement **Amounti**, **Kholouda (Bavin, Abido)**, **Sof, Chnwi**.
A l'ensemble des enseignants qui m'ont permis d'arriver à cette fin sur tout **Mr Bia Taha** et
Mr Mekhloufi Amine.*

*A mes adorables **Sara, Sabrina, Nano** et ma coupine **Fouziti** qui illumine mes jours est toute circonstance..*

Aujourd'hui, j'ai envie de te dire un énorme "merci", pour tout ce que tu m'apportes de bon durant tout le temps.

Pour ta presence à mes cotés, pour ton soutien, pour tes conseils, pour l'attention que tu me portes, pour ta grandes gentillesse; pour ta générosité... (la liste pourrait faire des pages et des pages!)

je voudrais simplement te remercier d'exister et d'exiter pour moi.

A toutes la promotion de 2019 de Microbiologie Appliquée.

Tous ce qui m'est chers et que j'ai oublié involontairement.

Et enfin à tous ceux qui nous ont aides de prés ou de loin à accomplir

Mahdjouba (Joujou)



Dédicace

Je rends hommage à mon dieu tout puissant.

Ce travail est dédié :

A Ma grand-père et ma mère, qui je ne saure jamais remercier

Assy Pour Les sacrifices qu'il a consentaient pour moi

Ainsi que chaque instant, De bonheur de qu'elle m'a procuré.

Je dédie ce modeste travail aussi à:

*Mon frère **Djamel** et ma chère sœur **Fatima** et plus particulièrement mon oncle **Bounif**
Abed qui est toujours sacrifiée pour mon éducation, je la remercie et je n'oublierai jamais
son soutien dans les moments difficile.*

*A mon niece **Nihal**.*

A tout la famille.

A mes amis.

Mes cousins et cousines.

*A l'ensemble des enseignants qui m'ont permis d'arriver à cette fin sur tout **Mr Bia Taha** et
Mr Mekhloufi Amine.*

*A mon adorables amis **Mahdjouba, Sabrina, Sara**, qui illuminent mes jours est toute
circonstance.*

A toutes la promotion de 2019 de Microbiologie Appliquée.

Tous ce qui m'est chers et que j'ai oublié involontairement.

Et enfin à tous ceux qui nous ont aides de près ou de loin à accomplir

Ce travail.

Faiza



Dédicace

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles, et ceux à qui je dois tant

A mes chers parents pour leur amour et leur support continu, je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies, je suis très heureuse et fière de votre présence à mon côté.

Je dédie ce modeste travail :

A mon cher frère Yacine Abed Rahman

A toutes mes chères sœurs, Amel, Abir, Soundess, Hadjer, Raghad

A mes amies spécialement Malika et Kenza

A mes oncles Rachid, Mohamed, Kassimo

Ainsi qu'à toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

ASMA

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX

| Tableau | Titre | Page |
|-------------------|---|-------------|
| Tableau 01 | Les cas étudiés durant notre expérimentation. | 09 |
| Tableau 02 | Appareillage, Verreries, Produits chimiques et autres. | 11 |
| Tableau 03 | Les antibiotiques testés. | 17 |
| Tableau 04 | Résultats des cultures sur milieu GC. | 19 |
| Tableau 05 | Résultats de l'antibiogramme en fonction de la sensibilité (S) et la résistance (R) de S.aureus dans les échantillons analysés. | 25 |

Liste des figures

LISTE DES FIGURES

| Figure | Titre | Page |
|------------------|---|-------------|
| Figure 01 | Mammite clinique chez une brebis. | 03 |
| Figure 02 | Mammite clinique chez une vache. | 03 |
| Figure 03 | Les différentes régions de prélèvements (TIARET). | 08 |
| Figure 04 | Réalisation du test de la catalase. | 14 |
| Figure 05 | Test de coagulase libre. | 15 |
| Figure 06 | Test de coagulase liée. | 15 |
| Figure 07 | Réalisation du test de l'ADNase. | 16 |
| Figure 08 | Réalisation de l'antibiogramme. | 17 |
| Figure 09 | Aspect de la culture sur milieu (GC+ Tellurite de potassium) après incubation à 37°C pendant 24h. | 19 |
| Figure 10 | Aspect des colonies sur le milieu Chapman. | 20 |
| Figure 11 | Répartition des cultures sur le milieu de Chapman. | 20 |
| Figure 12 | Aspect d'une souche de staphylococcus aureus sous un microscope optique (grossissement x 100). | 21 |
| Figure 13 | Test de catalase+. | 22 |
| Figure 14 | Résultat de test coagulase libre. | 22 |
| Figure 15 | Résultat de test coagulase liée. | 23 |
| Figure 16 | Résultat de test de l'ADNase après incubation de 24h à 37°C. | 23 |
| Figure 17 | Zones d'inhibition vis-à-vis S.aureus. | 24 |
| Figure 18 | Le taux de résistance et de sensibilité de S .aureus vis à vis quelques antibiotiques. | 26 |

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AINS : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

ATCC: American Type Culture Collection

ADN: Acide désoxyribonucléique

BHIB: Brain-Heart Infusion Broth

CMT: California Mastitis Test

CG: Giolitti Cantoni

HCL: Chlorure d'hydrogène

GC: Les glucocorticoïdes

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

| | |
|---|-----------|
| Introduction..... | 01 |
| Chapitre I : Synthèse bibliographique | |
| I.1. Mammite clinique à Staphylococcus aureus..... | 03 |
| I.1.1. Définition..... | 03 |
| I.1.2. La classification des mammites | 03 |
| I.1.2.1. mammite clinique | 03 |
| I.1.2.2. les mammites suraigües | 04 |
| I.1.2.3. les mammites aiguës | 04 |
| I.1.2.4. les mammites chroniques | 04 |
| I.1.2.2. Les mammites subcliniques..... | 04 |
| I.1.3. Diagnostic des infections intra mammaires | 05 |
| I.1.4. Le traitement des mammites cliniques..... | 05 |
| I.1.4.1. Le traitement à base d'antibiotique intramammaire..... | 05 |
| I.1.4.2. Traitement générale | 06 |
| I.2. Généralités sur staphylococcus aureus | 06 |
| I.2.1. L'historique de Staphylococcus aureus | 06 |
| I.2.2. L'habitat | 06 |
| I.2.3. Caractères bactériologiques..... | 06 |
| I.2.4. Facteurs de virulences | 07 |
| Chapitre II : Matériel et méthodes | |
| II.1. L'Objectif du travail | 08 |
| II.2. Lieu et durée de l'étude | 08 |
| II.3. Matériel et Méthodes | 09 |
| II.3.1 Matériel..... | 09 |
| II.3.1.1 Matériel biologique..... | 09 |

| | |
|--|-----------|
| • Le lait | |
| • La souche | |
| II.3.1.2 Matériel de laboratoi..... | 11 |
| II.3.2. Méthodes..... | 12 |
| II.3.2.1. Méthodes de prélèvement | 12 |
| II.3.2.2. L'enrichissement..... | 12 |
| II.3.2.3. L'isolement..... | 13 |
| II.3.2.4. Identification..... | 13 |
| _ Examen macroscopique | |
| _ Etude microscopique | |
| _ Test de la catalase | |
| _ Test de la coagulase libre | |
| _ Test de coagulase liée (pastorex) | |
| _ Test de thermonucléase (ADNase) | |
| II.3.2.5.L'antibiogramme | 16 |
| Chapitre III : Résultat | |
| III.1. L'enrichissement | 19 |
| III.2. L'isolement | 20 |
| III.3.L'identification | 21 |
| III.3.1.Examen macroscopique | 21 |
| III.3.2.Examen microscopique | 21 |
| III .3.3.Test de la catalase..... | 21 |
| III.3.4.Test de la coagulase libre | 22 |
| III.3.5.Test de la coagulase liée | 22 |
| III.3.6.Test de thermonucléase (ADNase)..... | 23 |
| III.4.L'antibiogramme..... | 24 |
| Chapitre IV : Discussion..... | 29 |
| Conclusion..... | 30 |
| Références Bibliographiques | |
| Annexes | |
| Résumé | |

Introduction

Les mammites consistent en une inflammation de la glande mammaire, le plus souvent développées en réponse à une infection bactérienne intramammaire. Elles constituent la pathologie la plus fréquente et la plus coûteuse rencontrée en élevage laitier et allaitant (**Wallemmaq et al., 2010**).

Les mammites se rencontrent généralement chez les ruminants en lactation, elle entraîne la baisse de la production du lait d'une part, la baisse de qualité hygiénique et nutritive du lait et ses produits dérivés et d'autre part (**Gourreau et Bendali, 2008**).

En Algérie, comme dans la plupart des pays, les mammites constituent une pathologie dominante dans les élevages laitiers et allaitants. Cependant malgré la fréquence des mammites subcliniques et cliniques dans les élevages algériens il faut signaler le manque d'études approfondies, indispensables pour cerner les facteurs de risque associés à ces infections mammaires ainsi que la connaissance des bactéries responsables (**Niar et al., 2000 ; Bouaziz et al., 2002 ; Benmounah, 2002**).

Staphylococcus aureus est l'une des principales sources d'infections intramammaires dans le monde et ses caractéristiques pathogènes facilitent sa propagation (**Bruno et al., 2014**).

les mammites cliniques à *S. aureus* ont souvent une résistance à de multiples classes d'agents antimicrobiens, ce qui réduira les options de traitement pour les cliniciens et les vétérinaires (**Petersson-Wolfe et al. , 2010**).

La rareté des données sur les infections mammaires nous a insisté à mener une étude globale afin de contribuer à une meilleure connaissance des mammites cliniques des ruminants dans la région de Tiaret. Pour cela, la présente étude a pour objectifs de :

Introduction

- Déterminer l'aspect épidémiologique des mammites cliniques chez les ruminants
- Identifier et isoler *Staphylococcus aureus* à partir de lait mammitéux.
- Evaluer la sensibilité des souches isolées vis-à-vis quelques antibiotiques.

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1. Mammite clinique à *Staphylococcus aureus* :

I.1.1. Définition :

La mammite est une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle, provoquée généralement par une infection, elle se traduit dans la majorité des cas par une réponse inflammatoire de type cellulaire impliquant une augmentation dans la concentration cellulaire dans le lait. **(Barone, 1990)**.

Cette infection intra mammaire se définit par la présence et la multiplication d'une population bactérienne dans un ou plusieurs quartiers de la mamelle, elle est suivie le plus souvent par une réaction inflammatoire à l'origine de lésions du tissu mammaire, ces derniers s'accompagnent d'une augmentation de la perméabilité entre le comportement sanguin et le lait qui à pour conséquence des modifications de la composition du lait **(Rainard et Poutrel, 1993)**.

La mammite est la principale cause de l'utilisation des antibiotiques dans les exploitations laitières **(Saini et al., 2012)**.

I.1.2. La classification des mammites

I.1.2.1. mammite clinique :

Se définit par la présence des symptômes fonctionnelles et locaux, elles entraînent systématiquement une modification du lait dans son aspect, sa texture, et dans la qualité produite (grumeaux, pus, caillots sanguins ...) et des symptômes généraux (hyperthermie, abattement, anorexie ...), **(Remy, 2010)**. Ainsi qu'une inflammation des quartiers atteints avec rougeur, chaleur, douleur, enfilement **(Debreil, 2008)**.

Le bilan de l'examen clinique permet alors de classer les mammites cliniques dans trois catégories : les mammites aiguës, les mammites suraigües, les mammites chroniques. **(Allain, 2011)**.



Figure 01 :Mammite clinique chez une brebis. **Figure 02** :Mammite clinique chez une vache

Chapitre I : synthèse bibliographique

I.1.2.1.1. les mammites suraigües :

Ce sont des inflammations très violentes de la mamelle, qui apparaît alors extrêmement congestionnée, douloureuse, chaude, volumineuse. L'état général de l'animal est généralement très affecté et on peut noter de la fièvre et un abattement profond. La sécrétion lactée est soit interrompue, soit très modifiée (aspect séreux, aqueux, hémorragique). Ces mammites sont caractérisées par une très grande rapidité d'apparition et d'évolution. Elles sont heureusement rares mais très souvent mortelles.

Après une phase intense d'inflammation. Il se forme un sillon disjoncteur séparant les tissus vivants des tissus morts. Ceux-ci sont noirâtres et froids, la sécrétion est alors nauséabonde. Cette mammite est le plus souvent due à *Staphylococcus aureus* et parfois associée à certaines bactéries anaérobies (**Hanzen, 2010**).

I.1.2.1.2.les mammites aiguës :

Ce sont des inflammations violentes de la mamelle avec atteinte de l'état général de l'animal. Les signes principaux sont visibles au niveau de la glande mammaire qui apparaît rouge, gonflée, douloureuse et chaude. La production laitière est modifiée en qualité et en quantité. Ces mammites évoluent moins rapidement que les précédentes, parfois pendant plusieurs semaines, mais peuvent, dans certains cas, conduire à la mort de l'animal (mammites à *Nocardia*). Elles peuvent survenir à tous les stades de la lactation ; toutes les bactéries peuvent provoquer ce type d'inflammation de la mamelle. Une forme caractéristique de ce type de mammite est la mammite pyogène, due à la présence de plusieurs espèces bactériennes agissant ensemble, dont *Corynebacterium pyogenes*. Dans ce cas, la sécrétion présente un aspect crémeux, de couleur bleu-verdâtre et d'odeur nauséabonde. La mamelle atteinte est le siège d'une inflammation intense ; l'état général de l'animal peut être gravement affecté (**Hanzen, 2010**).

I.1.2.1.3.les mammites chroniques :

C'est une inflammation modérée mais persistante de la mamelle, évoluant lentement sur plusieurs mois, voire plusieurs années, parfois durant la vie entière de l'animal, elle fait habituellement suite à une mammite aiguë ou suraigüe, l'état général de l'animal n'est pas affecté, dans certains cas le quartier est dur et chaud avec peu ou pas de sécrétion lactée (**Hanzen, 2010**).

I.1.2.2. Les mammites subcliniques:

Elles ne présentent aucune des signes précédemment évoqués, l'état général de l'animal est parfaitement normal, la mamelle est cliniquement saine et le lait ne présente aucune modification macroscopique, elle se traduit uniquement par une réaction immunitaire mit en

Chapitre I : synthèse bibliographique

évidence indirectement par une augmentation de la concentration en cellules somatiques du lait (**Bosquet et al., 2013**).

Ces mammites sont détectées par les examens complémentaires et surtout par les résultats de comptage cellulaire individuel fournis par le contrôle laitier, pour chaque cas de mammite clinique il y a en moyenne 20 à 40 cas des mammites subcliniques (**Hanzen, 2010**).

I.1.3. Diagnostic des infections intra mammaires

Le diagnostic clinique d'une mammite ne présente pas des difficultés lorsque l'on observe des symptômes.

L'examen clinique de la mamelle et de sa sécrétion est le moyen le plus simple et le plus évident du diagnostic de mammite, il consiste à un examen visuel, on observe la symétrie, le volume, la couleur, des déformations, les uns par rapport aux autres, en suite on observe le trayon (présence de verrue, d'anneau ...).

La palpation permet d'évaluer la consistance de la mamelle, la présence du nodule par pression très importante (fibrose), la taille et la consistance du canal du trayon, la sensation de chaleur signe d'inflammation et la réaction de l'animal signe de douleur (**Allain, 2011**).

Examens des sécrétions mammaires doit permettre d'évaluer la couleur (blanc, jaune, rouge), l'odeur, la viscosité, l'homogénéité et la quantité (diminution, absence). (**Allain, 2011**).

Cet examen local doit être couplé avec un examen général détaillé

I.1.4. Le traitement des mammites cliniques

I.1.4.1. Le traitement à base d'antibiotique intramammaire (Remy, 2010).

Il faut traiter la mammite clinique le plus précocement. Pour réaliser le traitement intramammaire, des précautions sont à prendre :

- 1- Se laver les mains.
- 2- Vidanger la mamelle pour éliminer le lait chargé en bactéries.
- 3- Désinfecter l'extrémité du trayon pour éviter que de nouvelles bactéries ne soient introduites dans la mamelle.
- 4- Injecter le produit en respectant la prescription et en évitant le traumatisme du sphincter lors de son introduction.
- 5- Désinfecter par trempage le trayon pour le protéger, le temps que le sphincter se referme
- 6- Identifier l'animal traité pour écarter son lait pendant le délai d'attente. Durant ce délai, le lait contient des résidus d'antibiotique et est impropre à la consommation
- 7- Noter la date du traitement et le délai d'attente pour ne pas les oublier

Chapitre I : synthèse bibliographique

- 8- Noter le numéro de l'animal et son traitement dans le carnet sanitaire afin de surveiller l'évolution de l'état de santé de la mamelle au cours du reste de la lactation et de disposer de cette information au moment du tarissement.
- 9- Traiter à la main dans un récipient réservé à cet usage, si possible à la fin de traité ou du lot de traite, les deux demi-mamelles du ruminant traité, de manière à éviter tout risque de transmission de l'infection et de résidus antibiotique.
- 10- Après avoir manipulé une mammites clinique, ne pas oublier de se laver à nouveau les mains avant de s'occuper d'autre.

I.1.4.2. Traitement général (Remy, 2010).

Le traitement général consiste à injecter des antibiotiques par voie générale, Les agents anti –inflammatoires sont fréquemment utilisée chez les ruminants atteints de mammites cliniques aiguës sévères. Ils permettent de contrôler l'enflure, la douleur et la souffrance. ils sont souvent utilise en complément d'une antibiothérapie et pour des raison d'éthique. il existe deux classes d'anti- inflammatoires soit les glucocorticoïdes (GC) et les anti-inflammatoires non stéroïdiennes (AINS).

Autre traitement sont utilisé, les injections de vitamines et les traitements homéopathiques.

I.2.Généralités sur *Staphylococcus aureus*

I.2.1.Historique de *Staphylococcus aureus* :

Observés par Pasteur en 1879 dans un pus de furoncle, le nom commun staphylococcus qui du grec (staphylé, grappe de raisin, et KoKKos, grain), a été proposé par Ogston en 1883 pour désigner des coques regroupés en amas irréguliers responsables d'infections suppurées chez l'homme. En 1884, Rosenbach a fourni la première description de genre *Staphylococcus*. En 1986 il appartenait à la famille de Micrococcaceae (**Federighi, 2005**).

I.2.2.L'habitat :

S.aureus est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux, mais il est également environnemental (eau, sol, aliments) (**Larpen et al., 2010**).

I.2.3.Caractères bactériologiques :

A la coloration de gram, *S. aureus* apparait sous forme de coques à gram positif de 0,5 à 1 um de diamètre, associés par paires, en chainettes, ou en amas irréguliers de raisins. *S. aureus* est immobile et non sporulé.

La paroi de *S. aureus* est formée d'un peptidoglycane épais et très réticulé qui représente environ 50% de la masse de la paroi.

Chapitre I : synthèse bibliographique

S.aureus est chimioorganotrophe, de type respiratoire anaérobie facultatif, oxydase négative et catalase et coagulase positive. C'est un germe mésophile dont la température de croissance maximale est comprise entre 30 et 37°C. Il est capable de se multiplier à des valeurs de PH comprises entre 4,0 et 9,8, avec un PH optimale de croissance de croissance de 6,0 à 7,0.

S. aureus est halotolérant, qui peut se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (jusqu'à 20%). Il tolère une activité de l'eau exceptionnellement basse (**Federighi, 2005**).

I.2.4. Facteurs de virulences (**Federighi, 2005**).

L'apparition ou pas d'une maladie clinique dépend de la qualité de la réponse immunitaire de l'hôte et de la virulence des souches impliquées dans l'infection en question. Pour ce faire, la pathogénicité de *S. aureus* est due à la sécrétion de nombreuses toxines et enzymes. Certaines toxines (l'hémolysine α , β , γ , δ ou staphylolysines), ainsi la virulence des enzymes extracellulaires tel que :

- Le Staphylocoagulase qui serait responsable de la formation d'un caillot.
- La catalase associée à la paroi bactérienne protégerait les bactéries des effets létaux du peroxyde d'hydrogène produit par les phagocytes.
- D'autres enzymes (hyaluronidases, désoxyribonucléases, lipases, estérases) joueraient également un rôle lors de la diffusion tissulaire des staphylocoques.

On distingue également des entérotoxines qui sont responsables de toxi-infections d'origine alimentaire chez l'homme. Les entérotoxines Staphylococciques sont des petites protéines thermostables alors que la bactérie est thermosensible. Plusieurs types immunologiques d'entérotoxines ont été décrits : les types A à E détectables par des méthodes immunologiques commercialisées, d'incidence connue, et les types G à M, récemment décrits, d'incidence inconnue. Le type A, seul ou en association avec d'autres types. *S. aureus* possède une grande capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. L'Objectif du travail :

Notre présent travail consiste à l'isolement et l'identification des souches de *Staphylococcus aureus* à partir de lait mammitique (mammitique clinique) des ruminants de différentes régions de la wilaya de Tiaret. D'autre part, il s'agit d'évaluer la sensibilité des souches vis-à-vis quelques antibiotiques.

II.2. Lieu et durée de l'étude :

Notre étude est réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie-UNIVERSITE IBN KHALDOUNE TIARET, durant une période allant du 11 Février jusqu'au 18 Avril 2019.

Pour faire cette étude, différents prélèvements ont été réalisés au niveau de plusieurs exploitations de la wilaya de Tiaret (**Figure 03**).

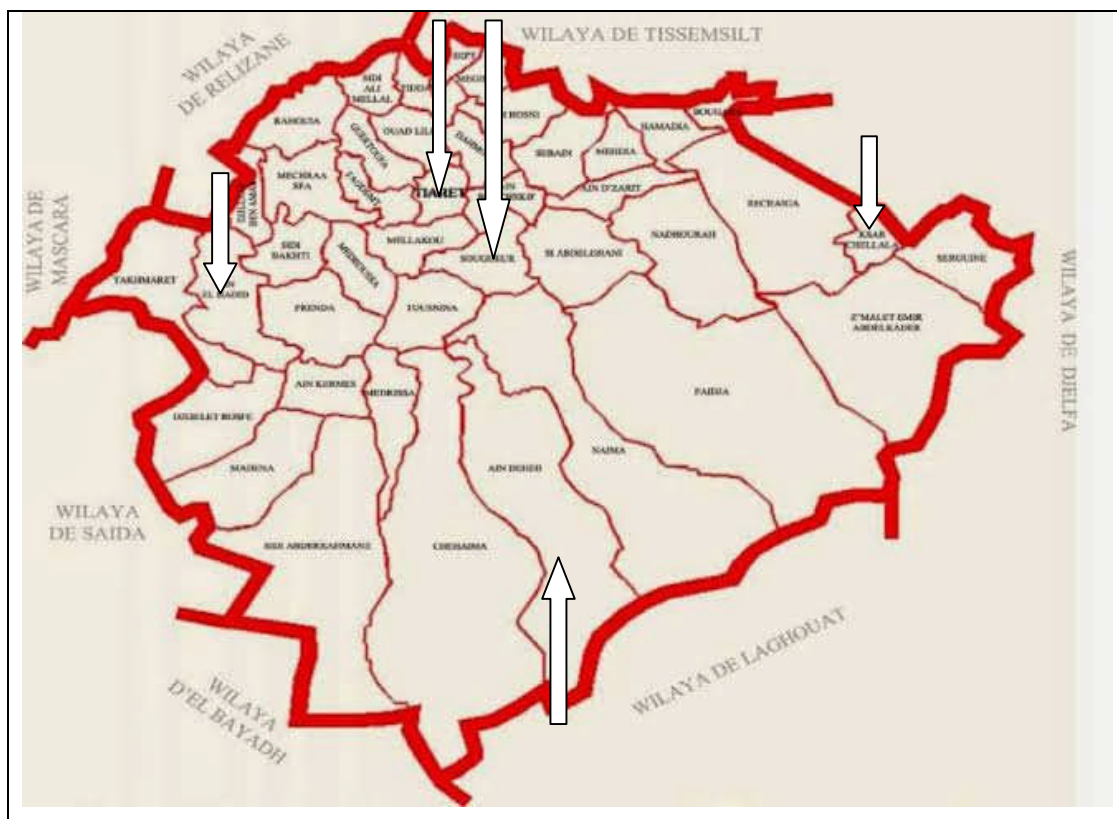


Figure 03 : Les différentes régions de prélèvements (TIARET).

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3. Matériel et Méthodes

II.3.1 Matériel

II.3.1.1 Matériel biologique

- **Le lait :**

Les échantillons de lait mammiteux (mammite clinique) étudiés proviennent de plusieurs régions de la wilaya de Tiaret. Les sujets concernés par l'étude sont répertoriés dans le **tableau 01**.

Tableau 01 : Les cas étudiés durant notre expérimentation.

| Echantillon | Région | L'espèce | L'âge | Cycle de reproduction de l'animal | Date de prélèvement |
|-------------|------------------|----------|---------------|-----------------------------------|---------------------|
| E 1 | Ain-Elhdid | Vache | 5 ans | Mise bas depuis 1.5 mois | 24 /02/2019 |
| E 2 | Ain-Elhdid | Vache | 4 ans | Mise bas depuis 15j | 24 /02/2019 |
| E 3 | Ain_Dheb | Brebis | 5 ans | Mise bas depuis 02 mois | 24 /02/2019 |
| E 4 | Tiaret chef lieu | Vache | 05 ans | Mise bas depuis 03 mois | 26/02/2019 |
| E 5 | Tiaret chef lieu | Vache | 04 ans | Mise bas depuis 15 jours | 26/02/2019 |
| E 6 | Tiaret chef lieu | Vache | 06 ans | Mise depuis 06 mois | 26/02/2019 |
| E 7 | Tiaret chef lieu | Brebis | 03 ans | Mise bas depuis 07 jours | 26/02/2019 |
| E 8 | Tiaret chef lieu | Vache | 07 ans | Mise bas depuis 1 mois | 26/02/2019 |
| E 9 | Ain-Gessma | Brebis | 03 ans | Mise bas depuis 22j | 03/03/2019 |
| E 10 | Ain-Gessma | Brebis | 04 ans | Mise bas depuis 1 mois | 03/03/2019 |
| E 11 | Ain-Gessma | Brebis | 6 ans | Mise bas depuis 1 mois | 03/03/2019 |
| E 12 | Tiaret chef lieu | Brebis | 7 ans | Mise bas depuis 2 mois | 05/03/2019 |
| E 13 | Tiaret chef lieu | Brebis | 5 ans | Mise bas depuis 1 mois | 05/03/2019 |
| E 14 | Ksar-chellala | Vache | 03 ans | Mise bas depuis 04 jours | 19/03/2019 |
| E 15 | Ksar-chellala | Brebis | 04 ans | Mise bas depuis 04 jours | 19/03/2019 |
| E 16 | Ksar-chellala | Brebis | 04 ans | Mise bas depuis 03 jours | 19/03/2019 |

Chapitre II : Matériel et méthodes

| | | | | | |
|------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------|
| E 17 | Tiaret chef lieu | Vache | 6 ans | Mise bas depuis 10 jours | 07/04/2019 |
| E 18 | Tiaret chef lieu | Vache | 7 ans | Mise bas depuis 08 jours | 07/04/2019 |
| E 19 | El_Mchara | Brebis | 05 ans | Mise bas depuis un mois | 08/04/2019 |
| E 20 | El_Mcharaf | Brebis | 03 ans | Mise bas depuis 20 jours | 08/04/2019 |
| E 21 | Tiaret chef lieu | Vache | 05 ans | Mise bas depuis 15 jours | 08/04/2019 |
| E 22 | Ain_Dheb | Brebis | 03 ans | Mise bas depuis 02 mois | 08/04/2019 |

La souche :

Nous avons utilisé une souche de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pour le contrôle microbiologique.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.1.2 Matériel de laboratoire

Tableau 02 : Appareillage, Verreries, Produits chimiques et autres.

| Appareillage | Verreries et autres | Produits chimiques | milieux de cultures |
|--|--|--|---|
| -Etuve (Memmert) -Agitateur magnétique thermique(Sturet) -Balance électrique (Sartorius) -Autoclave (Wolf) -Vortex (Technokartell) -Centrifugeuse (SIGMA203) -Microscope optique -Réfrigérateur (IRI) | -Béchers -Pipettes graduées -Flacons -Tubes à essai - Lames -Eprouvettes graduées -Barreaux magnétiques -Boites de pétri -Portoirs -Écouvillon -Pipettes pasteur -Pince -Spatule -Anses de platine -Cloches du Durham -Micropipette - Seringues -Bec bunsen | -Eau distillée (H ₂ O) -Eau physiologie -Eau oxygénée (H ₂ O ₂) -Fuschine -Violet de gentiane -Lugol -L' alcool -Glycérol -Huile à immersion | -Bouillon nutritif -Gélose de Chapman -Gélose à ADNase, -Gélose Muller Hinton -Giolitti Cantoni |

II.3.2. Méthodes

II.3.2.1. Méthodes de prélèvement

Modalités et gestion du prélèvement (Remy, 2010).

- Le prélèvement constitue une étape décisive dans l'établissement du diagnostic bactériologique, en effet sa qualité est essentielle et conditionne l'isolement de l'agent pathogène.
- Un prélèvement de lait pour étude bactériologie nécessite de suivre scrupuleusement des règles rigoureuses d'asepsie pour éviter de contaminer le prélèvement.

Règles à respecter pour effectuer un prélèvement aseptique (Remy, 2010).

- Prévoir une mallette.
- Nettoyer soigneusement le trayon de la mamelle (eau + savon).
- Sécher complètement avec une feuille de papier.
- Désinfecter l'extrémité du trayon avec du coton imbibé d'alcool ou à l'aide d'une serviette désinfectante.
- Laisser sécher.
- Extraire le premier jet puis recueillir une quantité suffisante de lait dans un flacon stérile, en prenant soin de le garder le plus horizontal possible (jamais à la verticale du trayon prélevé).
- Il faut assurer la conservation et le transport du lait recueilli au froid (4°C) jusqu'à son utilisation, le transport doit être rapide

II.3.2.2. Enrichissement :

Cette étape a pour but de favoriser la croissance d'une espèce en petit nombre (Guiraud J.P, 2012). Pour le réaliser on utilise le milieu liquide de Giolitti Cantoni (GC) qui favorise le développement des staphylocoques. 1ml de lait cru est mis dans 9 ml de (GC) plus 0.2 ml de téllurite de potassium, les tubes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.3.2.3. Isolement :

En cas de présence de Staphylocoques dans le milieu de GC (noircissement du contenu de tube) dans ce cas, on doit prendre une suspension bactérienne à l'aide d'un écouvillon, puis l'ensemencer par stries sur une boîte de Pétri qui contient la gélose de Chapman. Les boîtes sont incubées à 37° C pendant 24h.

II.3.2.4. Identification

_ Examen macroscopique :

Consiste à étudier la forme, l'aspect, la surface, la couleur des colonies après incubation sur la gélose de Chapman.

_ Etude microscopique :

L'étude microscopique des souches isolées est réalisée après une coloration de Gram, afin de déterminer leur morphologie et leur type de paroi.

_ Test de la catalase

Principe :

La fonction de l'activité catalase est l'élimination du peroxyde d'hydrogène produit chez les organismes aérobies (**Benjoudi et al., 2013**).

Technique :

Une colonie doit être prélevée de la gélose préalablement ensemencée à l'aide d'une anse de platine, puis la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame (**Figure 04**).

Chapitre II : Matériel et méthodes

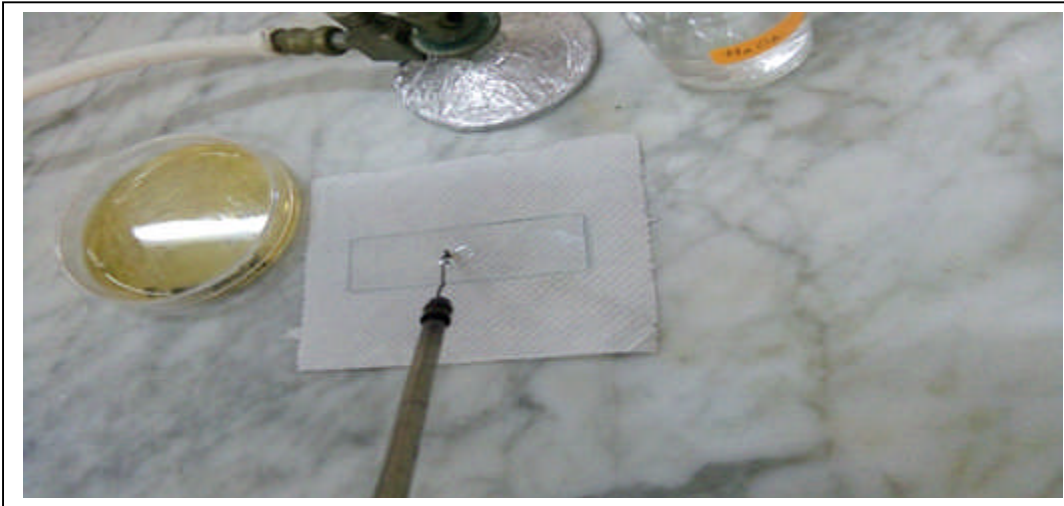


Figure 04 : Réalisation du test de la catalase.

Lecture :

Une réaction positive est marquée par la formation immédiate des bulles de gaz (oxygène), selon l'équation suivante :



_ Test de la coagulase libre

Principe :

Ce test consiste à mettre en évidence que les souches de *S. aureus* sont capables de coaguler le plasma humain ou de lapin (Singleton, 2005).

Technique :

Dissocier une colonie bactérienne dans un tube de bouillon nutritif (BHIB), incuber à 37°C pendant 24h, après incubation, 0,3 ml de la culture bactérienne est ajoutée à 0,3 ml de plasma humain dans des tubes stériles et incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture :

La réaction est considérée comme positive lors de la formation d'uncoagulatum qui se traduit par la coagulation du plasma, intervienne avant 24h.

Chapitre II : Matériel et méthodes



Figure 05: Test de coagulase libre.

_ Test de la coagulase liée (pastorex)

Principe :

Test d'agglutination basé sur la détection de facteur agglutinant, protéine staphylococcique A et polysaccharides capsulaires (**Larpent et Larpent-Gourgand, 1997**).

Technique :

Déposer une goutte de réactif de latex test dans un des cercles de la carte d'agglutination et déposer une goutte de réactif latex test négatif sur un autre cercle, prélever une colonie à l'aide d'un bâtonnet jetable et l'émulsionner dans la goutte de latex avec une homogénéisation par rotation douce (**Figure 06**).



Figure 06: Test de coagulase liée.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Lecture :

Une réaction positive se traduit par la formation d'agrégats

_ Test de thermonucléase (ADNase)

Principe :

Le test de désoxyribonucléase (ADNase) est utilisé pour détecter la dégradation de l'acide désoxyribonucléique (ADN), (Gerceker *et al.*, 2009).

Technique :

A l'aide d'une anse de platine, ensemercer la gélose à l'ADN contenue dans une boîte de Pétri par un strie, incuber à 37°C pendant 24h (**Figure 07**).

Après incubation, recouvrir la gélose par l'HCL.

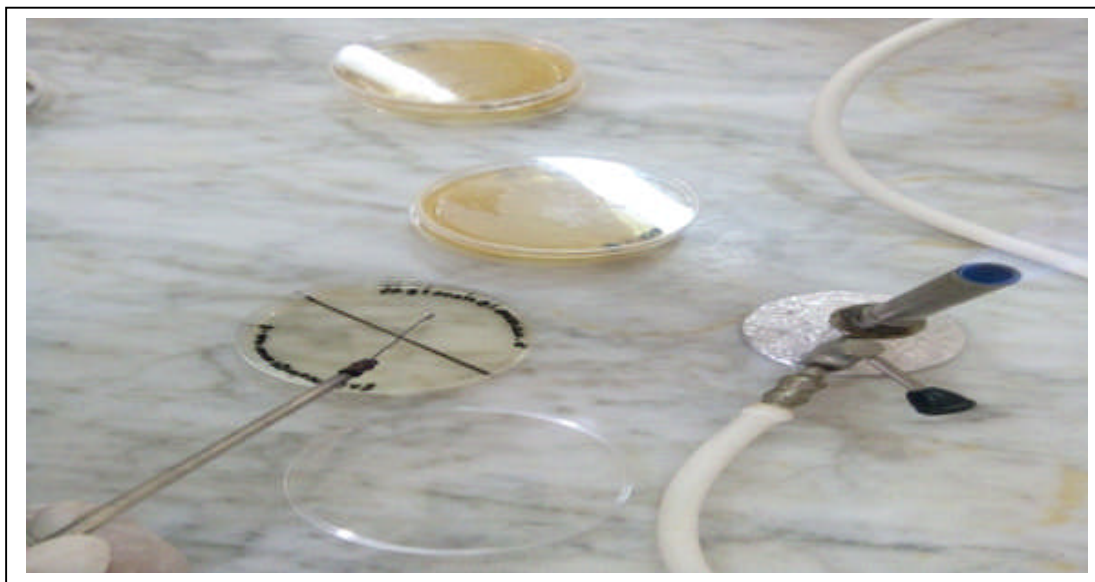


Figure 07: Réalisation du test de l'ADNase.

Lecture :

Une réaction positive est déterminée par une apparition d'une zone claire au tour de la culture en présence d'HCL.

II.3.2.5. Antibiogramme :

➤ Principe :

Selon la standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire à l'échelle nationale, (2011), L'antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion d'antibiotique sur gélose.

Chapitre II : Matériel et méthodes

➤ **Technique :**

Les étapes pour la réalisation de l'antibiogramme sont les suivants :

- A l'aide d'un Vortex, Homogénéiser bien la suspension bactérienne jeune (18-24h) après l'avoir Standardisé à 0,5Mc Farland.
- Répartir le milieu de Muller Hinton dans des biotes de pétri.
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et faire ensemencer cette dernière sur la totalité de la surface de la gélose MH en stries serrées.
- A l'aide d'une pince stérile, Déposer les disques d'antibiotique dans les boîtes de Pétri (chaque biote contient six antibiotiques).
- Incuber à 37° C pendant 24 h.



Figure 08 : Réalisation de l'antibiogramme.

Tableau 03 : Les antibiotiques testés.

| Disques d'antibiotique | Charge de disque |
|-------------------------------|-------------------------|
| Pénicilline G | 20µg |
| Erythromycine | 15 µg |
| Tétracycline | 30µg |
| Oxacilline | 30µg |
| Céfoxitine | 30µg |
| Gentamycine | 50µg |
| Chloramphénicol | 30µg |

Chapitre II : Matériel et méthodes

➤ **Lecture :**

Après incubation de 24 h à 37°C, mesurer les diamètres d'inhibition et les comparés aux valeurs critiques dans la table de lecture pour pouvoir classer les souches dans l'une des catégories (sensible, résistante ou bien intermédiaire) pour chaque antibiotique.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre III : Résultats

III.1.Enrichissement :

Les résultats des cultures des 22 prélèvements sont détaillés dans le tableau 05 :

Tableau 04 : Résultats des cultures sur milieu GC.

| Culture | Nombre | Pourcentage |
|----------|--------|-------------|
| Positive | 16 | 72.72 % |
| Négative | 06 | 27.27 % |
| Total | 22 | 100% |

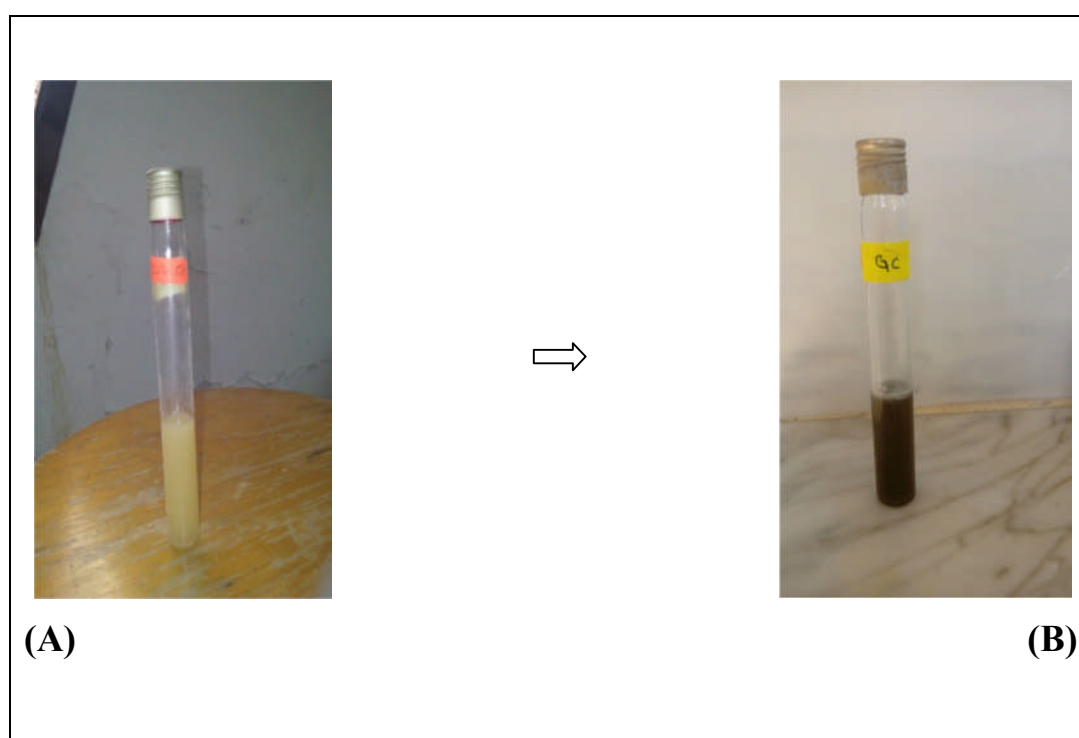


Figure 09 : Aspect de la culture sur milieu (GC+ Tellurite de potassium) après incubation à 37°C pendant 24h.

(A : négatif)

(B : Positif)

La présence de noircissement du contenu de tube de Giolitti Cantoni révèle donc la croissance des Staphylocoques.

Chapitre III : Résultats

III.2. Isolement :

Après incubation de 24h à 37° C sur le milieu de Chapman, les 16 souches ayant été isolées à partir de cultures positifs, ont permis d'obtenir 13 souches à mannitol positif et 03 souches à mannitol négatif.

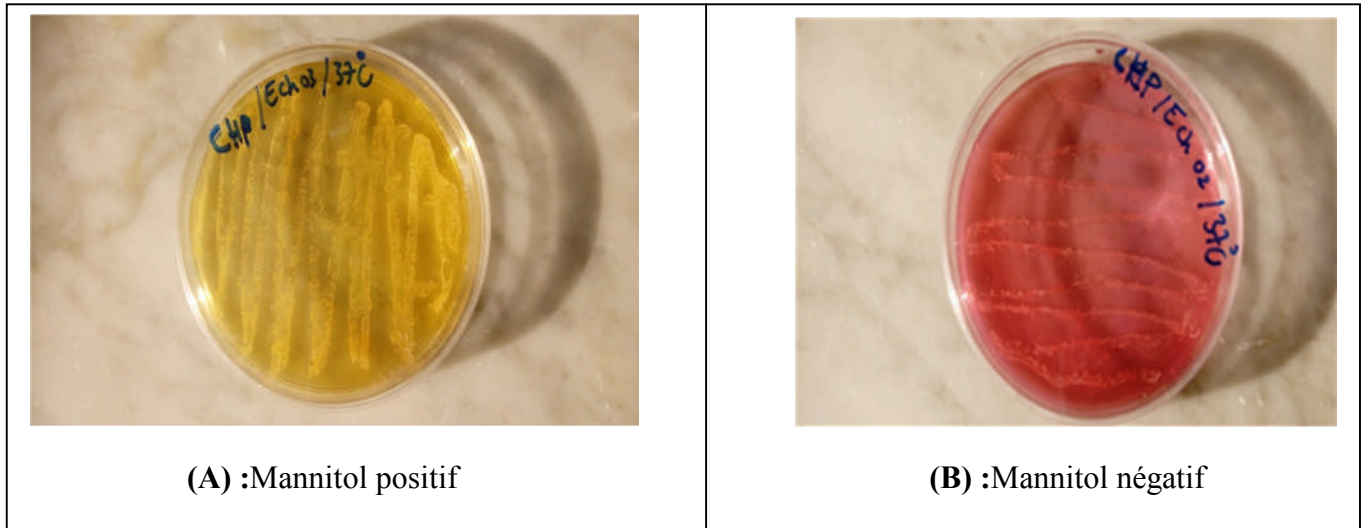


Figure 10 : Aspect des colonies sur le milieu Chapman.

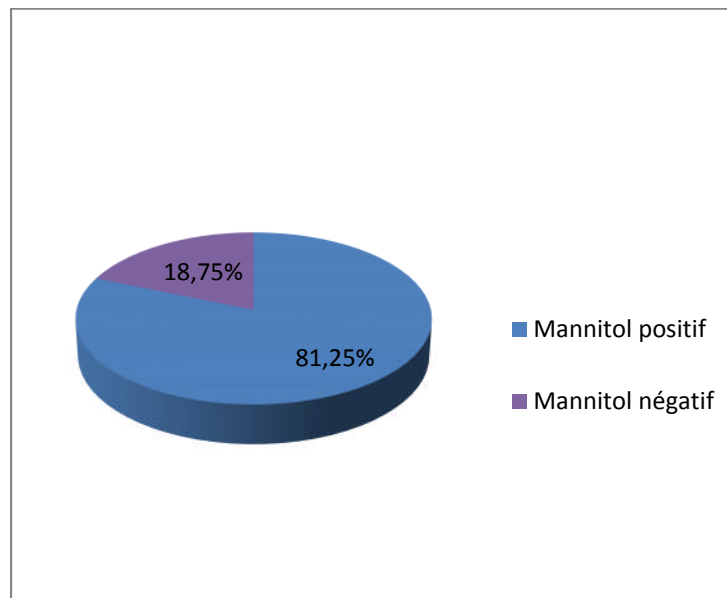


Figure 11: Répartition des cultures sur le milieu de Chapman.

III.3. Identification :

Sur les 13 souches appartenant au genre *Staphylococcus*, on a identifié seulement 10 souches (vu le manque des produits).

III.3.1. Examen macroscopique :

Sur le milieu de Chapman, les colonies de *Staphylococcus* sont apparues souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, autrement elles sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 mm de diamètre après 24h d'incubation à 37°C.

III.3.2. Examen microscopique :

La coloration de Gram pour les 10 souches isolées a révélé la présence, des cocci à Gram positif de forme sphériques de 0,5 à 1,5 Um de diamètre (El Kouir, 2003). Ils sont immobiles, non sporulés (Couture, 1990). Ayant une disposition en amas irréguliers, évoquant l'aspect caractéristiques de grappes de raisin (Fauchere et Avril, 2002).

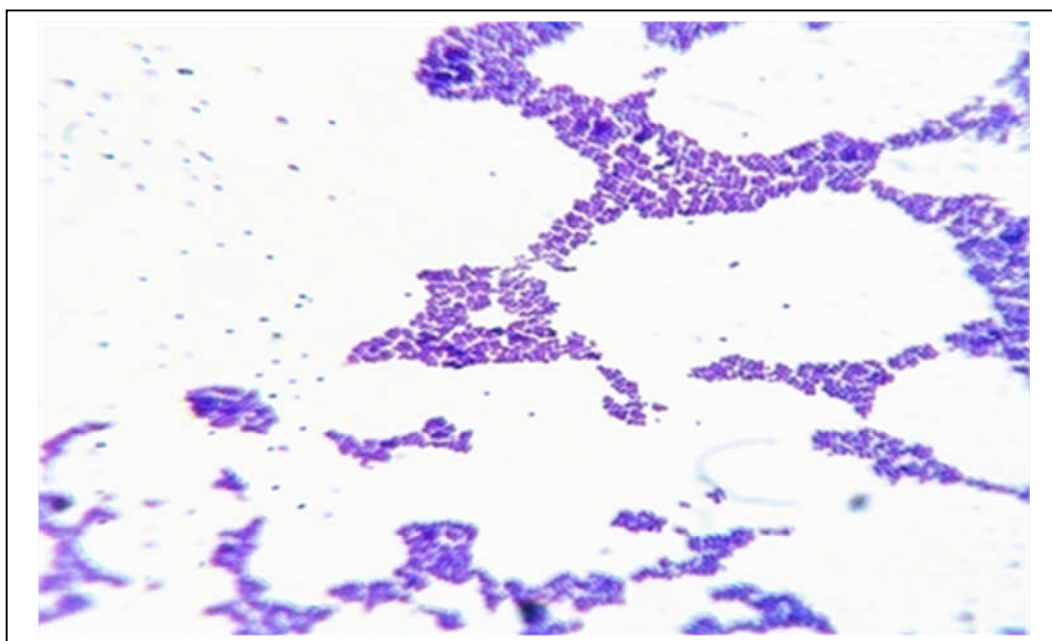


Figure 12: Aspect d'une souche de staphylococcus aureus sous un microscope optique (grossissement x 100).

III .3.3. Test de la catalase :

Toutes les bactéries isolées (mannitol positif), ont une catalase +, qui se traduit par la dégradation de l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (**Figure 13**).



Figure 13 : Test de catalase+.

III.3.4. Test de la coagulase libre :

On remarque la formation d'un caillot au fond du tube (**Figure 14**) contenant les souches à identifier, donc elles sont à coagulase positif.

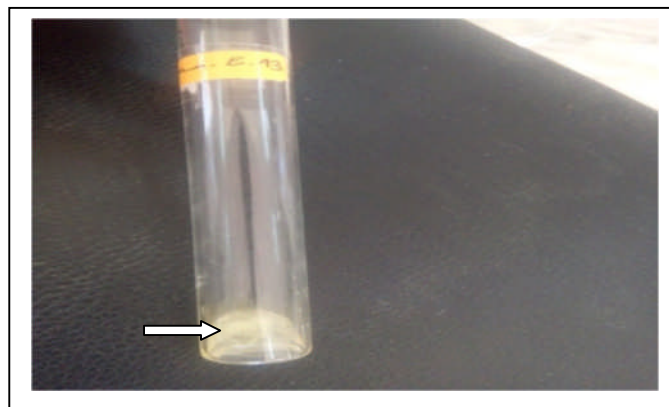


Figure 14 : Résultat de test coagulase libre.

III.3.5. Test de la coagulase liée :

Une apparition d'un coagulum (**Figure 15**) signifie un test positif pour les 10 souches.

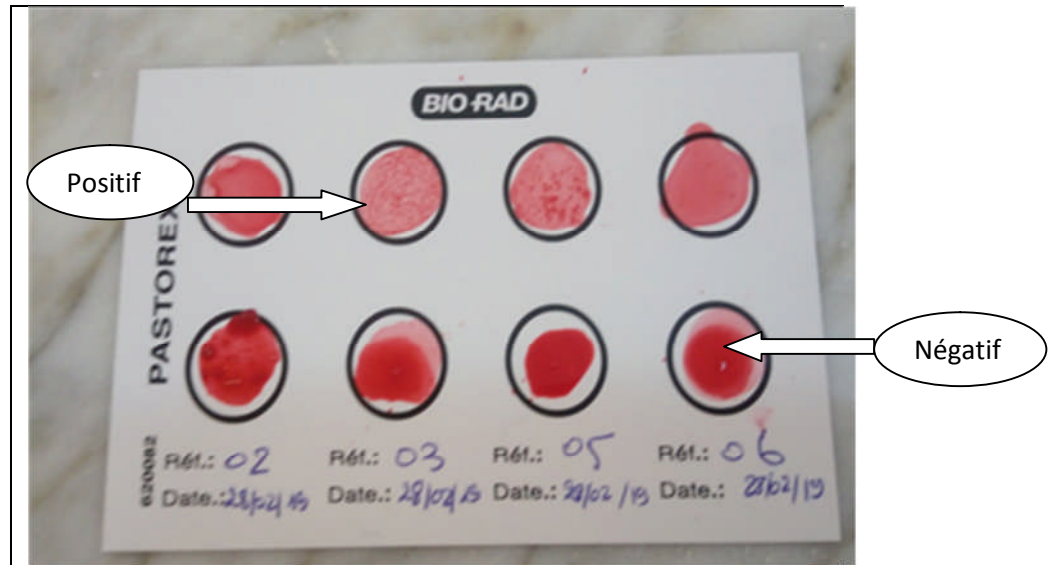


Figure 15: Résultat de test coagulase liée.

III.3.6. Test de thermonucléase (ADNase):

Toutes les souches isolées ont une ADNase positif (**Figure 16**).

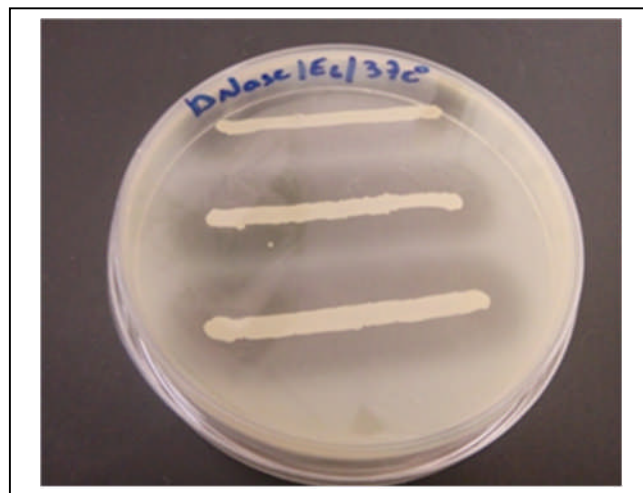


Figure 16 : Résultat de test de l'ADNase après incubation de 24h à 37°C.

III.4. AntibioGramme :

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques selon la méthode de diffusion sur gélose pour les 10 souches de *Staphylococcus aureus* testées, sont reportés dans le **tableau N°7** et la **figure N°17**.

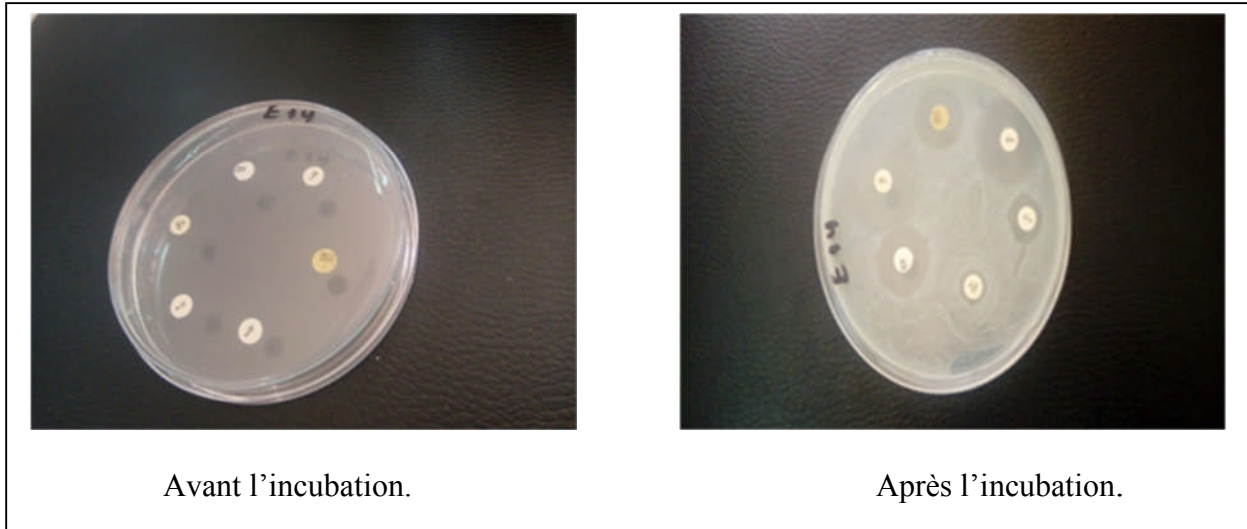


Figure 17 : Zones d'inhibition vis-à-vis *S.aureus*.

Chapitre III : Résultats

Tableau 05: Résultats Sde l'antibiogramme en fonction de la sensibilité (S) et la résistance (R) de S.aureus dans les echantillons analysés.

| Echantillon Antibiotique | E03 | E05 | E06 | E07 | E 08 | E 13 | E 14 | E 15 | E 17 | E 18 |
|-----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Pénicilline | 14 mm R | 10 mm R | 15 mm R | 27 mm R | 14 mm R | 16 mm R | 12 mm R | 15 mm R | 13 mm R | 16 mm R |
| Erythromycine | 28 mm S | 30 mm S | 24 mm S | 28 mm S | 1 mm R | 18 mm I | 23 mm S | 25 mm S | 27 mm S | 21 mm I |
| Tétracycline | 15 mm I | 13 mm R | 12 mm R | 06 mm R | 10 mm R | 22 mm S | 18 mm I | 15 mm I | 16 mm I | 27 mm S |
| Oxacilline | 21 mm R | 20 mm R | 20 mm R | 26 mm S | 20 mm R | 27 mm S | | | | |
| Céfoxitine | 30 mm S | 35 mm S | 35 mm S | 28 mm S | 30 mm S | 35 mm S | | | | |
| Gentamicine | 26 mm S | 30 mm S | 35 mm S | 35 mm S | 30 mm S | 13 mm I | 19 mm S | 20 mm S | 20 mm S | 19 mm S |
| Chloramphénicol | | | | | | | 26 mm S | 26 mm S | 26 mm S | 30 mm S |

R : résistant

S : sensible

I : intermédiaire

Chapitre III : Résultats

Les taux de résistance et de sensibilité de nos souches isolées (10 souches) vis-à-vis chaque antibiotique testé est répertoriés dans la **figure 18**.

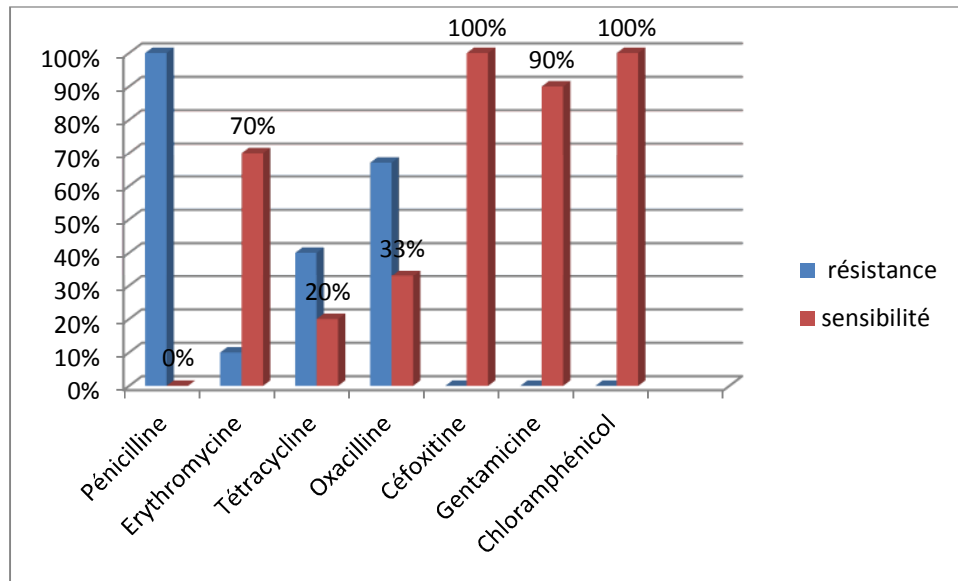


Figure 18 : Le taux de résistance et de sensibilité de *S.aureus* vis à vis quelques antibiotiques.

Chapitre IV : La discussion

Les mammites représentent une pathologie majeure des ruminants laitiers de part de leur fréquence et l'importance de leurs répercussions économiques (**Allain et al., 2011**).

L'infection se traduit parfois par des signes cliniques locaux tels que la présence des grumeaux dans le lait ou un quartier dur, gonflé et douloureux. Aussi, des signes généraux tels que la fièvre, l'abattement et l'anorexie qui peuvent apparaître. Ces mammites sont dites mammites cliniques (**Bouزيد et al., 2011**).

On a constaté que la mammite clinique se déclarent chez les animaux jeunes (45,45 %) et en début de lactation (95, 95%), qui peut être du à la production laitière plus importante chez ces derniers par rapport aux animaux plus âgés, et aux conditions d'élevage qui reste toujours traditionnels.

Staphylococcus aureus est reconnu comme le pathogène majeur impliqué dans les mammites. Il est responsable d'importantes pertes dans les élevages laitiers et se trouve impliqué dans les toxi-infections alimentaires chez l'homme car il contamine le lait par ses entérotoxines (**Hamiroune et al., 2017**). Pour l'isolement et l'identification de ce germe, on a réalisé des analyses bactériologiques de lait au niveau de laboratoire de microbiologie, la première étape c'est le prélèvement de lait qui doit être aseptique pour éviter la contamination de l'échantillon et la transmission de cette bactérie d'un animal à un autre en cas de présence de plusieurs prélèvements au même temps, pour se faire on a préconisé le nettoyage de trayon avec du savon et leur désinfection avec de l'alcool à 70°.

Les premiers jets de lait sont très chargés en germes microbiens. Il faut donc les recueillir à part, dans un petit récipient afin de ne pas contaminer l'ensemble de la traite (**Veisseyre, 1975**).

La flore du lait cru est abondante et susceptible d'évoluer rapidement, il faut donc abaisser sa température à 4° C et le transport des échantillons doit être rapide, au mieux, dans l'heure qui suite la traite. Le lait recueilli à la ferme par traite manuelle est directement transporté à +4°C, dans ces conditions, la flore microbienne est stabilisée (**Guiraud, 2012**).

L'enrichissement des 22 échantillons a permis de révéler un taux de 72,72% de culture positive (16 échantillons), qui ont marquées par l'apparition d'un noircissement de milieu GC. Cela est dû à la réduction de tellurite de potassium en tellure métallique noir (**Delarras, 2007**). Dans les autres tubes (6 échantillons de culture négative) avec absence de virage de

Chapitre IV : La discussion

couleur de milieu on a conclu que cette mammite était due à des agents microbiens autres que les Staphylocoques.

Ces résultats sont similaires à ceux mentionnés par **Allouche et Buazza (2018)**, qui ont trouvés pour 22 échantillons étudiés un taux de 94,64 % de culture positive et un taux de 5,35 % de culture négative.

Une enquête menée par **Bouaziz et al., (2002)** durant une année sur la prévalence des différents germes responsables de mammites cliniques de la vache dans l'Est algérien a montré que sur 252 prélèvements, *S.aureus* est l'espèce bactérienne la plus souvent rencontrée avec un taux de 28,4%.

L'isolement sur le milieu de Chapman nous a permis d'isoler 13 souches à mannitol positif et 03 souches à mannitol négatif.

Selon **Delarras (2007)**, la concentration élevée de chlorure de sodium (7,5) inhibe la croissance de nombreux germes, sauf les germes halophiles ou halotolérants et la fermentation du mannitol (polyalcool) libère des acides qui virent le rouge de phénol au jaune, dans le cas contraire, le milieu garde sa couleur rouge initiale.

L'objectif du traitement des mammites cliniques chez les femelles en lactation est d'obtenir une guérison clinique et bactériologique rapide, c'est-à-dire l'élimination de l'infection pour éviter la perte de lait sur tout dans la première phase de lactation et d'éviter les séquelles qui peuvent engendrer une mammite subclinique avec chute grave de la production laitière avec des phases cliniques répétitives (**Gourreau et Bendali, 2008**).

Le traitement repose sur l'utilisation des antibiotiques, le problème consiste à apporter un antibiotique actif au contact de la bactérie, à une concentration suffisante pendant un temps suffisant (**Gourreau et Bendali, 2008**).

Concernant l'antibiorésistance, *Staphylococcus aureus* est considéré parmi les bactéries à Gram positif qui offre le plus de résistance à l'antibiothérapie (**Perrin-coullioud et al., 1991**).

Nous avons également testé les antibiotiques classiques les plus utilisés en thérapie vétérinaire vis-à-vis nos souches.

D'après le **Tableau 7**, La résistance des souches isolées de *S.aureus* vis-à-vis de la pénicilline est confirmée pour toutes les souches avec 100% de taux de résistance, les mêmes résultats ont été rapportés par **Rahal (2001)**, et par **Bouaziz (2005)**, à l'Est algérien, en effet

Chapitre IV : La discussion

Selon **Guérin-Faublée et Brun (1999)**, les souches de *Staphylococcus aureus* synthétisent de pénicillinases, enzymes limitant l'action de pénicilline (**Boutet et al., 2005**). A cause de son utilisation fréquente en médecine vétérinaire cette antibiotique est devenue inefficace (**Ben Hassen et al., 2003**).

La résistance observée pour la tétracycline est peu élevée (40%), cette molécule selon **Ben Mahdi et Ouslimani (2009)**, occupe une place prépondérante dans la thérapie en élevage laitier en Algérie, trois modes de résistances aux tétracyclines ont été observés, soit l'élimination de cet antibiotique par efflux, la protection des ribosomes par modification de la cible et la modification des tétracyclines par des enzymes (**Speer et al., 1992**).

Un taux élevé de résistance a été accordé à l'oxacilline (67%), d'après **Dumitrescu et al., (2010)**, *Staphylococcus aureus* acquérait des gènes de résistance aux antibiotiques et de développer des mécanismes de régulations pour s'adapter à des concentrations croissantes d'antibiotiques.

Par contre, aucune résistance n'a été observée pour les 02 antibiotiques, gentamicine, Chloramphénicol, ainsi que la majorité des souches sont sensibles à l'érythromycine (70%).

La gentamicine (aminoside) est rarement utilisée comme traitement chez les ruminants à cause de la non disponibilité de produit en Algérie. D'après **Boulahbal et al., (2010)** elle se fixe au niveau de la sous unité 30S des ribosomes et perturbe ainsi la lecture des ARN messagers. Dans ce cas la bactérie synthétise des protéines anormales non fonctionnelles, tandis que le Chloramphénicol est retirée de l'arsenal thérapeutiques des produits vétérinaire car il a des effets secondaires comme les néphrites, elle se lie à la sous unité 50S de ribosome et inhibe la fixation de l' aminoacyl-ARNt et la formation de la liaison peptidique, concernant l'érythromycine (macrolide) se fixe sur la fraction 50S de ribosome, il inhibe la translocation et la transpeptidation, favorise ainsi la libération pré maturé du complexe ARNt –peptide de ribosome.

En outre, une sensibilité remarquée pour toutes les souches testées vis-à-vis la céfoxitine (100%) qui agisse par inhibition de la synthèse des peptidoglycanes de la paroi bactérienne en se liant à une protéine spécifique appelé PBP (**Boutet et al., 2004**).

Conclusion

Conclusion

Les mammites cliniques représentent une pathologie dominante en élevage laitier, leur impact économique est considérable en raison de la baisse de la quantité et de la qualité du lait produit, elles restent la maladie la plus fréquentes, la plus pénalisante et la plus couteuse des élevages laitiers. A cela, il faut ajouter le cout des réformes et celui des traitements.

Ces mammites causées par des infections intra mammaires dues essentiellement à *Staphylococcus aureus*, c'est l'espèce la plus fréquemment responsable de cette infection en début de lactation.

Ce travail a permis de contribuer au développement des connaissances sur les mammites cliniques à *S. aureus* chez les ruminants dans la wilaya de Tiaret. Il a également permis d'approfondir la description des niveaux de résistance de cette pathologie.

Les analyses bactériologiques de lait mammiteux, mettent en évidence l'isolement de 13 souches de *S.aureus* sur 22 échantillons. L'étude des profils de sensibilité aux antibiotiques à relevé des résistances marquées vis-à-vis de certains antibiotiques largement utilisées en médecine vétérinaire, ce qui laisse prévoir de nombreux échecs thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Allain C., Aurel M.R., Paillet F., Portes D., Menras J.M., Carriere F., Cluzel F., Duvallon O., Pena-Arnaud B., Caillat H., Marie-Etancelin C., Arhainx J., Dion S., Bergonier D., Foucras G. et Rupp R. (2011).** La cinétique d'émission du lait et l'anatomie de la mamelle sont associées à la résistance aux mammites: résultats d'une sélection divergente de brebis sur les comptages de cellules somatiques.
- Allain V. (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 doctorat vétérinaire, École nationale vétérinaire d'ALFORT, France.
- Allouche F.T. et Buazza L. (2018).** Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus aureus* impliqués dans les infections postpartum chez la vache. Mémoire envoyée de l'obtention du diplôme de Master académique. Université Ibn Khaldoun – Tiaret. p:23.
- Barone R. (1990).** Anatomie comparée des mammifères domestiques-Tome 4 : Splanchnologie II. Ed, vigot, Paris, P 951.
- Benjouidi D., Zouaoui F., Errahmani MB., Bendjeddou K. et Chekir N. (2013).** Mesure de deux biomarqueurs catalase et malondialdéhyde chez *pernaperna* et *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia) suite à une contamination aigüe par *Staphylococcus aureus*. *Travaux de l'institut Scientifique, Rabat, Série Zoologie*, N°49 : 19-27.
- Ben Hessen S., Messadil. et Ben Hessen A. (2003).** Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou nom de mammite. *Ann. Méd. Vét.*, 147, 41-47.
- Ben Mahdi MH. Et Ouslimani S. (2009).** Mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérie. *European journal of scientific research*. Volume 36. N°3. pp :357-362.
- Benmounah B. (2002).** Prévalence bactériologique des mammites subcliniques dans la Wilaya de Constantine. Thèse de magister, Université Mentouri Constantine.
- Bouaziz O., Aimeur R., Kabouia R. et Bererhi E.H. (2002).** Prévalence de différents germes responsables de mammites cliniques de la vache dans L'Est algérien. *Sciences et Technologie*, N° Spécial, PP27-32.
- Bouaziz O. (2005).** Contribution à l'étude des infections intra mammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat d'Etat en pathologie de la reproduction. Département des sciences vétérinaires. Université de Constantine. pp : 156-188.
- Boulahbal F., Ramdani Bouguessa N., Belouni R., Seghier M. et Benslimani A. (2010).** Manuel de microbiologie à l'usage des étudiantes en 3^{ème} année de médecine. 2^{ème} Edition. Paris.
- Boutet P., Dettelleux J., Motkin M., Deliege M., Piraux E., Depinois A., Debiliquy P., Mainil J., Czapllicki G. et Lekeux P. (2005).** Comparaison du taux cellulaire et de la

Références bibliographiques

sensibilité antimicrobienne des germes responsables de mammites subclinique bovine entre les filières conventionnelle et biologique. *Ann. Méd. Vét.*, 149, 173-182.

Bouid R., Houcine A., Maifia F., Rezig F., Ouzrout R. et Touati K. (2011).Prévalence des mammites en élevage bovin laitier dans le Nord-Est algérien. Centre Universitaire El Taref, Algérie.

Bosquet G., Faroult B., Labbé J.F., Page L.E. et Serréys P. (2013). Référentiel vétérinaire. SNGTV, Paris. P 100.

Botaro B.G, Dibbern A.G. et Benites N.R. (2014).*Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milkyieldand SCC of dairycows.

Bruno G.C., Cortinhas C.S., Aline G.D., Luis F.P.S., Nilson R.B. Marcos V.D. (2014).*Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milkyieldand SCC of dairycows. Springer science+ Business Media Dordrecht.

Couture B. (1990). Bactériologie médicale, étude de méthodes d'identification des bactérie, Paris.15-32.

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, doctorat vétérinaire, école nationale vétérinaire d'ALFORT, France.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.

Dumitrescu O., Dauwalder O., Biosset S., Reverdy M.E., Tristan A. et Vandenesch F. (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. Médecine, sciences, Vol 26. N°11 :934-9.

Durel L., Faroult B., Lepoutre D., Brouillet P. (2004). Mammites des bovins (cliniques et subcliniques). Démarches diagnostiques et thérapeutiques, Supplément technique, dépêche vétérinaire. P : 87-42.

El Kouri, D.P. (2003). Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques .EMC. Maladies infectieuses.

Federighi M. (2005). Bactériologie alimentaire. Compendium d'hygiène des aliments, 2ème Edition. Paris.

Fauchere J.L and Avril J.L. (2002).Bactériologie générale et medicale. Ellipses, Paris.213-217.

Gerceker D., Karasartova D., Elyurek E., Barkar S., Kryan M., Ozsan M., Kerem Calgin M. et Sahin F. (2009). A new, simple, rapide test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 55: 291-294.

Références bibliographiques

- Gourreau J.M. et Bendali F. (2008).** Maladies des bovins. 4^{ème} édition. France.
- GuerinFauble V.et Brun Y. (1999).** Les résistances aux antibiotiques chez les Staphylocoques d'origines animales. *Revue de médecine vétérinaire*, 150. PP:299-312.
- Guiraud J.P (2012).** Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris.
- Hamiroune H., Benyahia M., Chatih O., Bensefia S., Saidani K., FoughaliaA. et Berber A. (2017).** Mammites staphylococciques des vaches laitières: prévalence dans la région d'Alger et risques sur la santé publique. *Département des Sciences Agro-Vétérinaires, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ziane Achour-Djelfa, Algérie.*
- Hanzen CH. (2010).** Propédeutique de la glande mammaire sémiologie et diagnostic individuel et de troupeau .Approche individuelle.
- Larpent J.P. et Larpent-Gourgand M. (1997).** Memento technique de microbiologie. Tec et Doc. Lavoisier, Paris.
- Larpent J.P., Gautier M. et Le Loir Y. (2010).** Monographies de microbiologie. *Staphylococcus aureus*, Tec et Doc. Lavoisier. Paris, 197 p.
- Niar A., Ghazy K, et Dahache SY. (2000).** Incidence des mammites sur les différents élevages bovins de la wilaya de Tiaret. 4^{ème} séminaire international de médecine vétérinaire Constantine.
- Perrin-coullioud L., Martel J.L., Brouillet P. et Fedida M. (1991).** Identification et sensibilité aux antibiotiques des diverses espèces de staphylocoques associées à des mammites bovines inapparentes et subcliniques .Résultat d'une enquête régionale. Volume 1. Tome 142. pp:39-47.
- Petersson-Wolfe C.S., Mullarky I.K. et Jones G.M. (2010).** *Staphylococcus aureus* Mastitis : Cause, Detection, and control.
- Rahal B. (2001).** Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques en milieu vétérinaire. dans la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Projet de l'OMS. 3^{ème} rapport d'évaluation. pp : 68-91.
- Rainard P. et Poutrel B. (1993).** protection de la glande mammaire :biologie de lactation. Ed INSERM-INRA :p 415-429.
- Remy D. (2010).** Les mammites: hygiène, prévention, environnement. France.
- Saini V., McClure J.T., Leger S., Dufour A., Sheldon G., Scholl D.T et Barkenra H.W. (2012).** Antimicrobial use on canadian dairy farms. *J. Dairy sci.* 95 :1209-1221.
- Singleton P. (1999).** Bactériologie. Dunod, Paris, 319 p.
- Singleton P. (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.

Références bibliographiques

Speer B.S., Shoemaker N.B. et Salyers A.A. (1992).Bacterial resistance to tetracycline : mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol. Rev*, 5 :387-99.

Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire a l'échelle nationale. 6ème Edition. 2011.

Veisseyre R. (1975).Technologie du lait. Constitution, Récolte, Traitement et Transformation du Lait. 3 Ed, Paris.

Wallemacq H., Girard B., Lekeux P. et Bureau F. (2010). La vaccination contre les mammites à *Staphylococcus aureus* chez la vache laitière. *Ann. Méd. Vét.*, 154, 16-29.

ANNEXES

Annexes 01 : Méthodes de la coloration de Gram (Singleton, 1999).

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes :

- Fixation du frottis de la souche testée à la chaleur.
- Couvrir le frottis du violet de gentiane pendant une minute puis rinçage à l'eau distillé.
- Traitement pendant une minute par la solution de Lugol, rinçage à l'eau distillé.
- Décoloration à l'alcool à 95% pendant 1 à 3 secondes, jusqu'à que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis.
- Rinçage à l'eau distillé.
- Couvrir avec de la fuschine pendant 30 secondes. Après un bref rinçage.
- Séchage de frottis.
- Observation au microscopique optique à l'objectif x 100 à l'immersion.

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries Gram positif et celles colorées en rose sont des bactéries Gram négatif.

Annexes 02 : Composition des milieux de culture.

Le bouillon de **GC**

| Composition | g/l |
|---------------------|------------|
| Peptone de caséine | 10 |
| Extrait de viande | 5 |
| Extrait de levure | 5 |
| Chlorure de lithium | 5 |
| D(-) mannitol | 20 |
| Chlorure de sodium | 5 |
| Glycine | 1,2 |
| Pyruvate de sodium | 3 |
| Tween 80 | 1 |

pH=6,9

ANNEXES

Milieu de culture **Chapman**

| Composition | g/l |
|---------------------------------|------------|
| Extrait de viande | 1 |
| Peptone de caséine et de viande | 10 |
| Chlorure de sodium | 75 |
| D-Mannitol | 10 |
| Agar | 15 |
| Rouge de phénol | 0,025 |

pH=7,4

Gélose **ADN**

| Composition | g/l |
|----------------------------------|------------|
| Hydrolysate tryptique de caséine | 20 |
| ADN | 2 |
| Chlorure de sodium | 5 |
| Bleu de toluidine | 3 |
| Agar | 12 |

pH= 7.3

Bouillon de **BHIB**

| Composition | g/l |
|------------------------------|------------|
| Infusion de cervelle de veau | 12.5 |
| Infusion de cœur de bœuf | 5 |
| Peptone | 10 |
| Glucose | 2 |
| Chlorure de sodium | 5 |
| Phosphatase di sodique | 2.5 |

pH =7.4

Milieu de culture **Muller Hinton**

| Composition | g/l |
|------------------------|------------|
| Extraits des viandes | 3 |
| Hydrolysate de caséine | 17,5 |
| Amidon | 1,5 |
| Agar | 17 |

pH= 7,2 à 7,4

Résumé

Les mammites consistent en une inflammation de la glande mammaire, le plus souvent développées en réponse à une infection bactérienne intramammaire . *Staphylococcus aureus* est l'une des principales sources d'infections intra-mammaires dans le monde. Les mammites cliniques à *S. aureus* ont souvent une résistance à de multiples classes d'agents antimicrobiens, ce qui réduira les options de traitement pour les cliniciens et les vétérinaires

Notre objectif principal est l'isolement et l'identification de *S. aureus* à partir de lait mammitique et leur évaluation par rapport à un panel d'antibiotiques.

L'isolement de *S. aureus* a été effectué à partir de lait mammitique prélevés de différents régions de la willaya de Tiaret et leur identification a été réalisée par les tests de la catalase, thermonucléase, coagulase libre, coagulase liée (pastorex) en plus de l'étude de leurs profils de résistance afin de déterminer leur sensibilité vis-à-vis quelques antibiotiques selon la technique standard de diffusion de l'antibiotique en gélose.

Sur les 22 échantillons analysés 13 prélèvements étaient contaminés par *S.aureus*. 10 isolats ont été identifiées. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des isolats présentent un taux de résistance de 100% à la Pénicilline, 67% à l'Oxacilline et 40% à la Tétracycline, Par contre, aucune résistance n'a été observée pour la gentamicine, la Chloramphénicol, la Céfoxitine ainsi que la majorité des souches sont sensibles à l'Erythromycine (70%).

Ce travail indique une incidence élève de staphylococcus aureus dans le lait mammitique des ruminants, ainsi que des souches multirésistantes ont été détectées.

Mots clés : Mammite clinique, lait mammitique, , *Staphylococcus aureus*, résistance aux antibiotique.

Abstract

Mastitis is inflammation of the mammary gland, most often developed in response to an intramammary bacterial infection. *Staphylococcus aureus* is one of the leading sources of intra-mammary infections worldwide. *S. aureus* clinical mastitis often has resistance to multiple classes of antimicrobial agents, which will reduce treatment options for clinicians and veterinarians.

Our main aim is the isolation and identification of *S. aureus* from mammalian milk and their evaluation against a panel of antibiotics.

The isolation of *S. aureus* was performed from mammalian milk collected from different regions from the willaya of Tiaret and their identification was performed by catalase, thermonuclease, free coagulase, bound coagulase (pastorex). In addition, their resistance profiles were studied in order to determine their susceptibility to some antibiotics according to the standard technique of diffusion of the antibiotic in agar.

Of the 22 samples analysed, 13 samples were contaminated with *S.aureus*.10 isolates were identified. The study of the antibiotic sensibility of the isolates showed a resistance rate of 100% to Penicillin, 67% to Oxacillin and 40% to Tetracycline. However, no resistance was observed for the Gentamicine, Chloramphenicol. Cefoxitin and most strains are sensitive to Erythromycin (70%).

This work indicates a high incidence of staphylococcus aureus in the mammalian milk of ruminants, as well as multiresistant strains were detected.

Key words: Clinical mastitis, milk, , *S. aureus*, antibiotics. Clinical Mammitis, Mammitus Milk, *Staphylococcus aureus*, Antibiotic Resistance.

ملخص

التهاب الضرع هو التهاب في الغدة الثديية، وغالبًا ما يتم تطويره استجابةً للعدوى البكتيرية داخل الثدييات. المكورات العنقودية الذهبية هي واحدة من المصادر الرئيسية للعدوى داخل الثدي في جميع أنحاء العالم. التهاب الضرع الحاد بالمكورات العنقودية الذهبية في كثير من الأحيان لديه مقاومة لفئات متعددة من العوامل المضادة للميكروبات، والتي سوف تقلل من خيارات العلاج للأطباء والأطباء البيطريين.

هدفنا الرئيسي هو عزل وتحديد المكورات العنقودية الذهبية من حليب المجترات و تقييم تأثير المضادات الحيوية عليها .

تم إجراء عزل المكورات العنقودية من حليب المجترات لمناطق مختلفة لولاية تيارات وتم تحديد هويتهم عن طريق الكاتالاز ، نوكلياز ، عزل الحراري ، تجلط الدم الحر ، تجلط الدم المرتبط (باستوريكس) و بالإضافة إلى ذلك تم تحديد مقاومتهم للمضادات الحيوية بواسطة المضادات الحيوية

من بين 22 عينة تم تحليلها ، ظهر تلوث 13 عينة من طرف المكورات العنقودية الذهبية ، 10 عزلات حددت هويتها. أظهرت دراسة الحساسية للمضادات الحيوية في العزلات معدل مقاومة 100% للبنسيلين ، و 67% للأوكساسيلين و 40% للنتراسيكلين ، ومع ذلك ، لم يلاحظ أي مقاومة لعامل الأوراماميسين ، الكلورامفينيكول. سيفوكسيتين ومعظم السلالات حساسة للإرثروميسين(70 %).

يشير هذا العمل إلى وجود نسبة عالية من المكورات العنقودية الذهبية في حليب الثدييات من المجترات ، وكذلك تم اكتشاف سلالات متعددة المقاومة.

الكلمات المفتاحية :

التهاب الضرع السريري ، حليب ، المكورات العنقودية الذهبية ، مقاومة المضادات الحيوية