

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**Université IBN KHALDOUN -Tiaret-**

Institut des sciences vétérinaires



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

**Thème :**

**Fréquences des mammites subcliniques et leur impact sur la glande mammaire  
Et qualité du lait cru de la vache laitière dans les élevages bovins de la wilaya de  
Sidi Bel Abbés**

**Présentée par :**

**ZIDANE Nadia**

Devant la commission du jury composée de :

<b>Président</b>	<b>: BENALOU BOUABDELLAH</b>	Professeur, Université de TIARET
<b>Examineur</b>	<b>: TIR TOUIL AICHA</b>	Professeur, Université de MASCARA
<b>Examineur</b>	<b>: ABDELHADI SI AMEUR</b>	Professeur, Université de TIARET
<b>Examineur</b>	<b>: KANOUN KHEDOUDJA</b>	Maître de conférences A, Université de Sidi Bel Abbés
<b>Examineur</b>	<b>: ZEMRI KHALIDA</b>	Maître de conférences A, Université de Sidi Bel Abbés
<b>Promoteur</b>	<b>: GHAZI KHEIRA</b>	Professeur, Université de TIARET

# Remerciements

Avant que je commence mes remerciements je dois m'abaisser aux deux êtres les plus chers au monde, mes parents que Dieu le miséricordieux les accueille dans son vaste paradis.

L'accomplissement de mes études n'a pu se réaliser sans l'aide, l'appui et la compréhension de gens exceptionnels que je veux remercier de tout mon cœur.

Je commence par l'équipe scientifique, je tiens à remercier l'encadreur de cette thèse de doctorat, Professeur **GHAZI KHEIRA** (Professeur, Université de TIARET) d'avoir accepté de diriger cette étude. Au président de jury, le professeur **BENALOU BOUABDELLAH** (Professeur, Université de TIARET), aux examinateurs, Professeur **ABDELHADI SI AMEUR** (Professeur, Université de TIARET), Professeur **TIR TOUIL AICHA** (Professeur, Université de MASCARA), Docteur **KANOUN KHEDOUDJA** (Maître de conférences A, Université de SIDI BEL ABBES) et Docteur **ZEMRI KHALIDA** (Maître de conférences A, Université de SIDI BEL ABBES) d'avoir accepté à participer à l'évaluation de ce travail

Tous mes collègues de l'université de Tiaret et L'université de Sidi Bel Abbés.

# Dédicace

*À toute ma famille*

# Résumé

La mammite est une infection des glandes mammaires chez les vaches laitières. Elle est caractérisée par la présence, dans le lait, de cellules inflammatoires (leucocytes) et éventuellement de bactéries.

L'objectif de notre étude, premièrement était de voir l'impact de la mastite subclinique sur la structure de la glande mammaire. Nous avons effectué des coupes histologiques de fragments appartenant à la glande mammaire des vaches laitières apportées à l'abattoir après la chute du rendement du lait due à la mastite. Parmi les 101 des échantillons, 36,36% n'ont montré aucun changement dans leur structure tissulaire, tandis que 65,65 des échantillons présentaient des inflammations importantes. Nous avons classé ces vaches laitières selon leur mode de traite, nous avons constaté que 64,64% de notre échantillon subissaient un mode de traite mécanique et 36,36% un mode de traite manuelle. Suite à cette répartition, nous avons constaté que 42,42% de vaches à traite mécaniques étaient saines contre 32,32% à traite manuelle, nous avons remarqué aussi que la propagation de la mammite au niveau des 4 trayons était observée le plus chez les vaches dont le mode de traite était manuel. Les échantillons du lait cru provenant des vaches qui ont présentaient un CMT positif ont montré une mauvaise qualité microbiologique.

Notre deuxième objectif était de tester l'effet du miel directement sur la bactérie isolée (*Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*). L'effet du miel sur ces souches a donné des résultats prometteurs.

**Mots clés :** Vache laitière, mammite subclinique, inflammation, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, antibiogramme, miel.

# Abstract

Mastitis is an infection of the mammary glands in dairy cows. It is characterized by the presence in the milk of inflammatory cells (leukocytes) and possibly bacteria.

The objective of our study was to see the impact of subclinical mastitis on the structure of the mammary gland. We have performed histological sections of fragments belonging to the mammary gland of dairy cows brought to the slaughterhouse after the drop in milk yield due to subclinical mastitis. Of the 101 samples, 36,36% showed no change in tissue structure, while 65,65% of the samples showed significant inflammation. We classified these dairy cows according to their milking mode; we found that 64% of our sample was under a mechanical milking mode and 36,36% a manual milking mode. Following this distribution, we found that 42,42% of cows with mechanical milking were healthy compared to 32,32% with manual milking, we also noticed that the spread of mastitis at the level of the 4 teats was observed most in cows whose mode milking was manual. Raw milk samples from cows with a positive CMT showed poor microbiological quality.

Our second objective was to test the effect of honey directly on the isolated bacteria (*Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*). The effect of honey was more active than antibiotic therapy.

**Keywords:** Dairy cow, Subclinical mastitis, Inflammation, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Antibiogram, honey.

## ملخص

التهاب الضرع هو عدوى في الغدد الثديية للأبقار الحلوب. يتميز بوجود الخلايا الالتهابية (leucocytes) في الحليب وربما مع البكتيريا.

كان الهدف من دراستنا، أولاً، هو رؤية تأثير التهاب الضرع تحت الإكلينيكي على بنية الغدة الثديية. أجرينا أقسام النسيجية من شظايا الغدة الثديية من الأبقار الحلوب التي جلبت إلى المسلخ بعد الانخفاض في إنتاج الحليب بسبب التهاب الضرع. من بين 101 عينة، 36 لم يكن هناك تغيير في تركيب الأنسجة، في حين أظهرت 65 عينة أظهرت التهابات كبيرة. قمنا بتصنيف هذه الأبقار الحلوب وفقاً لطريقة الحلب، وجدنا أن 64٪ من العينات كانت تحت وضع الحلب الميكانيكي و36٪ تحت وضع الحلب اليدوي. وبعد هذا التوزيع، وجدنا أن 42٪ من الأبقار ذات الحلب الميكانيكي كانت صحية مقابل 32٪ ذات الحلب اليدوي، لاحظنا أيضاً أن انتشار التهاب الضرع في 4 الحلمات كان لدى الأبقار التي كانت تحلب يدوياً.

كما أظهرت عينات اللبن الخام للأبقار ذات الـ CMT الإيجابي بانعدام الجودة ووجود كمية كبيرة من الميكروبات.

هدفنا الثاني هو اختبار تأثير العسل مباشرة على البكتيريا المعزولة (المكورات العنقودية الذهبية، البكتيريا القولونية). فكانت النتيجة أن العسل أكثر نشاطاً من المضادات الحيوية.

**الكلمات الدالة:** بقرة الألبان، التهاب الضرع تحت الإكلينيكي، التهاب، المكورات العنقودية الذهبية، البكتيريا القولونية، المضادات الحيوية، عسل النحل.

## LEXIQUE DES ABREVIATIONS

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**ADH** : Arginine Dihydrolase

**LDC** : Lysine décarboxylase

**MG** : Matière Grasse

**ONIL** : Office National Interprofessionnel Du Lait

**ONPG** : Orthonitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside

**ODC** : Ornithine décarboxylase

**TDA** : Tryptophane désaminase

**TB** : Taux butyreux

**TP** : Taux protéique

**UFC** : Unité Formant Colonie

**VP** : Voges-Proskauer

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Le peroxyde d'hydrogène.

***S. aureus*** : *Staphylococcus aureus*.

***E. coli*** : *Escherichia coli*.

**UFC** : Unité Faisant Colonie.

**NaCl** : Le chlorure de sodium.

**DMSO** : Le diméthylsulfoxyde.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Bactéries et champignons isolés de la peau normale de bovin.....	10
<b>Tableau 2</b> : Liste des cellules du système immunitaire et de leurs principales fonctions.....	11
<b>Tableau 3</b> : Composition moyenne du lait de vache .....	18
<b>Tableau 4</b> : Flore originelle du lait cru .....	22
<b>Tableau 5</b> : Germes contaminant le lait cru .....	23
<b>Tableau 6</b> : Dénombrement de la flore bactérienne du lait cru des vaches de SBA .....	51
<b>Tableau 7</b> : Flore bactérienne du lait cru des vaches laitières subissant une traite manuelle .....	52
<b>Tableau 8</b> : Flore bactérienne du lait cru des vaches laitières subissant une traite mécanique.....	52
<b>Tableau 9</b> : Antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Tableau 10</b> : Effet du miel sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Peau de trayon.....	05
<b>Figure 02</b> : Peau de l'extrémité du trayon .....	07
<b>Figure 03</b> : Peau de la mamelle .....	08
<b>Figure 4</b> : Répartition des vaches atteintes selon leur âge .....	49
<b>Figure 5</b> : Répartition des vaches atteintes selon le nombre de gestation .....	49
<b>Figure 6</b> : Répartition des vaches atteintes selon la race.....	50
<b>Figure 7</b> : Fréquence de mammites subclinique chez les vaches (traite manuelle) .....	50
<b>Figure 8</b> : Fréquence de mammites subclinique chez les vaches (traite mécanique).....	50
<b>Figure 9</b> : <i>Staphylococcus</i> à coagulase négative .....	53
<b>Figure 10</b> : Aspect macroscopique de <i>S aureus</i> sur milieu Chapman .....	53
<b>Figure 11</b> : Coloration de Gram de <i>S aureus</i> .....	53
<b>Figure 12</b> : Aspect macroscopique d' <i>E.coli</i> sur milieu Hecktoen.....	54
<b>Figure 13</b> : Coloration de Gram d' d' <i>Echerichia.coli</i> .....	54
<b>Figure 14</b> : Antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Figure 15</b> : Effet de miel sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
<b>Figure 16-17</b> : Effet de miel pur sur l'inhibition de la croissance d' <i>Escherichia coli</i> .....	56
<b>Figure 18-19</b> : Activité antimicrobienne des dilutions de mile sur <i>Escherichia coli</i> .....	56
<b>Figure 20</b> : Acinus mammaires en activité mamelle en lactation.....	57
<b>Figure 21</b> : Mamelles en fin d'activité.....	58
<b>Figure 22</b> : Réaction inflammatoire intense.....	58
<b>Figure 23</b> : Invasion de sang dans les conduites alvéolaires .....	59
<b>Figure 24</b> : Perte de structure, destruction alvéolaire.....	59

# Table de matière

Remerciement .....	ii
Dédicace.....	iii
Résumé .....	iv
Liste d'abréviation .....	vii
Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des photos.....	x
Table de matière.....	xi
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>

## Étude bibliographique

### **Chapitre I : Rappel anatomo-physiologique**

I. Généralité .....	4
I.1. la glande mammaire saine .....	4
I.2. Le trayon et mamelle .....	4
I.3 Le processus infectieux .....	13
I.4. Etiologie des mammites bovines .....	13

### **Chapitre II : La qualité bactériologique du lait de vache**

II.1. généralité sur le lait .....	15
II.2. la composition du lait .....	15
II.3 Variations dans la composition du lait .....	18
II.3.1 Facteurs intrinsèques .....	19
II.3.1 Facteurs extrinsèques.....	20
II.4 Quelques caractéristiques physico-chimiques du lait .....	20
II. 5 Microbiologie du lait cru .....	21
II.6 Hygiène de la traite.....	32

### **Chapitre III : Mammites à *Staphylococcus aureus***

III.1. Généralité .....	34
III.2. Variabilité génomique .....	34
III.3. Problèmes sanitaire .....	36
III.4. Origine de contamination .....	37
III.5 Le cycle infectieux .....	37

### **Chapitre IV : Mammites à *Escherichia coli***

IV.1.Caractères bactériologiques d' <i>Escherichia coli</i> .....	42
IV.2. Infection à coliformes.....	42
IV.2.1 Mammite à <i>Escherichia coli</i> .....	42
IV.2.1.1 Voies de transmission .....	42
IV.2.1.2 Prévalence .....	43
IV.2.1.3 Pathogénie .....	43

# Étude expérimentale

## Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. L'objectif du travail .....	47
I.2. Matériel.....	47
I.2.1. Matériel biologique.....	47
I.3. Méthodes.....	47
I.3.1 Première partie .....	47
I.3.2 Deuxième partie .....	47
I.3.3 Troisième partie .....	48
I.3.4 Quatrième partie.....	48

## Chapitre II : Résultats et discussion

II.1 Caractéristiques descriptives des vaches atteintes de mammites.....	49
II.2 Description de la propagation de l'infection chez des vaches atteintes de mammites selon le mode de traite .....	50
II.3 Dénombrement de la flore bactérienne du lait cru de vaches suspectes .....	51
II.4 Identification et isolement d'une souche bactérienne responsable de mammite.....	53
A. Identification de bactéries Bacille à Gram positif.....	53
B. Identification de bactéries Bacille à Gram négatif.....	54
II.5 Evaluation du pouvoir antibactérien du miel sur <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> .....	55
II.5.1 Evaluation du pouvoir antibactérien du miel sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
II.5.2 Evaluation du pouvoir antibactérien du miel sur <i>Escherichia coli</i> .....	55
II.1.5 Caractéristiques histologiques.....	57
<b>Conclusion</b> .....	60
<b>Références bibliographiques</b> .....	61
<b>Annexe</b> .....	71

## Publications

## Introduction

---

L'Algérie se place au troisième rang mondial en matière d'importation de lait et de produits laitiers à cause d'un déficit de production qui ne couvre que 40 % des besoins de la population. (Dadoune J.P, 2006). Parmi les causes de cette défaillance, c'est la baisse de production laitière dû aux problèmes des mammites.

La mammite est une inflammation de la glande mammaire qui est principalement causée par une infection d'origine bactérienne. Elle peut aussi être due à une infection d'origine virale, ou fongique ou encore résulter de changements physiologiques, d'un traumatisme ou d'une lésion (Charron G, 1986). L'infection se traduit parfois par des signes cliniques locaux tels que la présence de grumeaux dans le lait ou un quartier dur, gonflé et douloureux des mamelles et même parfois de la fièvre, ces mammites sont dites mammites cliniques, mais le plus souvent l'infection passe inaperçue et les mammites sont dites subcliniques.

La prévention contre la mammite est une préoccupation majeure dans l'élevage des vaches laitières. C'est parmi les maladies les plus coûteuses des compagnies de l'industrie du lait.

Le coût s'explique par une baisse de la production de lait (Dehkal G,1982), des problèmes de transformabilité de la matière première (Boualem W,2006), la réforme prématurée des animaux atteints de mammites cliniques ou chroniques (Dehkal G,1982), les coûts de traitements (produits et frais vétérinaires) et les pénalités financières sur la qualité du lait en fonction du comptage des cellules somatiques (CS), sans compter la surcharge de travail pour l'éleveur.

De nombreux problèmes sanitaires peuvent aussi en découler de la moindre qualité de la matière première. En effet, la présence de germes dans le lait suite à la traite d'animaux infectés peut entraîner une contamination tout au long de la filière laitière causant notamment des toxi-infections alimentaires (Almeida, R et al, 1996). Dans les cas très graves, l'infection progressait pour produire une réaction inflammatoire avec une destruction importante du tissu sécrétoire.

Chez les bovins, les germes responsables des mammites sont principalement bactériennes (*Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*). (Afif A et al, 2008)

La maîtrise des mammites en élevage reste un enjeu sanitaire majeur. Malgré le nombre important d'études dédiées à cette maladie, aucune stratégie de lutte efficace n'a été mise au point. L'antibiothérapie reste la solution principalement utilisée, mais son efficacité est toutefois limitée.

Dans notre étude nous avons un double objectif. Premièrement, nous avons contemplé les relations entre la structure de la glande mammaire bovine et l'impact de la mastite subclinique en observant des coupes histologique au niveau des tissus mammaires prélevé de vaches atteintes de mastites. Nous avons effectué aussi des analyses microbiologiques du lait cru des vaches provenant des étables qui endure des problèmes de santé de leur vaches ainsi que des chute dans la production du lait.

Tandis que dans notre deuxième objectif nous avons essayé de remplacer l'antibiothérapie par une application au miel, nous avons testé l'effet du miel sur deux bactéries isolée (*Staphylococcus aureus* & *Echerichia coli*) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques).

---

# Étude Bibliographique

## **1. Généralités**

La mammite est une inflammation de la glande mammaire qui est principalement causée par une infection d'origine bactérienne. Elle peut aussi être due à une infection d'origine virale, ou fongique ou encore résulter de changements physiologiques, d'un traumatisme ou d'une lésion. Cette inflammation intra mammaire est caractérisée par de nombreuses modifications observables directement dans le lait. L'une de ces modifications est l'augmentation du nombre de cellules somatiques (CS) dans le lait. Ce taux de CS est retenu d'ailleurs aujourd'hui comme critère de la qualité sanitaire du lait. Ainsi, au niveau de l'exploitation agricole, un taux de CS inférieur à 250.000 cellules/ml correspond à une qualité sanitaire acceptable. A l'inverse, un taux supérieur à 250.000 cellules/ml entrainera une diminution du prix du litre de lait.

### **I.1 La glande mammaire saine**

La mamelle est une glande exocrine composée de quatre quartiers indépendants chez les bovins, située sur la face ventrale de l'animal. Les quartiers de droite et de gauche sont séparés par un ligament de suspension central composé de tissu élastique (figure 3). La morphologie de la mamelle est importante à prendre en compte puisque si le ligament médian est trop faible, cela aura pour conséquence une mamelle qui pend trop. Ceci entrainera des difficultés à la fois pour la traite et une exposition plus importante à des agents pathogènes due à la proximité des trayons avec le sol.

Le parenchyme mammaire possède deux lobes, eux-mêmes divisés en lobules formés d'acini ou d'alvéoles glandulaires. Chaque alvéole est constituée principalement d'une couche monocellulaire (lactocytes) qui est le lieu de synthèse du lait. Les lactocytes entourent la lumière alvéolaire et reposent sur un réseau de cellules myoépithéliales.

Chaque alvéoles irrigue la citerne de la glande via des canaux galactophores (Figure 1) La masse glandulaire épithéliale est une structure transitoire se transforme au cours de la gestation en produisant du lait durant la période de lactation et elle disparaît au sevrage ou bien au tarissement.

**a. Les canaux galactophores :** Les petits canaux galactophores qui drainent chaque alvéole se rejoignent pour former des canaux tertiaires. Ces derniers se rassemblent en canaux secondaires puis primaires qui aboutissent à la citerne de la glande. Des cellules myoépithéliales entourent l'épithélium des canaux et des alvéoles et se contractent sous l'action de l'ocytocine, provoquant l'éjection du lait.

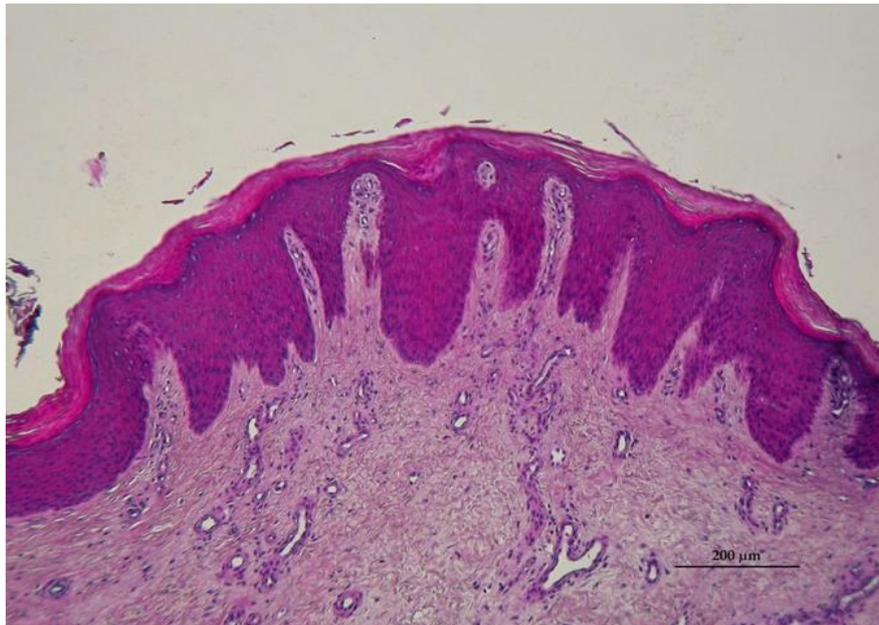
**b. La citerne de la glande mammaire :** Il existe une citerne de la glande par quartier. La citerne correspond à une dilatation des canaux galactophores en sinus et en poches. Chez la vache, le volume de la citerne est de 400 à 500 ml, mais le volume est variable en fonction de la race.

### **I.2 Le trayon et la mamelle**

#### **I.2.1 Histologie du trayon**

La peau du trayon est une structure fragile, en effet celle-ci ne possède ni poil ni glande sébacée, muqueuse ou sudoripare susceptible de la protéger.

Elle est donc très sensible aux variations de température, d'hygrométrie et de luminosité.



**Figure 1 :** Peau de trayon x 100, HE (Pr D. PIN)

L'épithélium des bovins a une épaisseur comprise entre 16 et 145 µm (Scott et al, D.W1988)

Il se compose de plusieurs couches :

**a. La couche basale (stratum germinativum)** constituée de cellules germinatives. Elle possède une substance fondamentale riche en polysaccharides et ainsi que de nombreux kératinocytes et mélanocytes. On note un mélanocyte pour dix à vingt kératinocytes (Scott et al, D.W, 1988)]. Les cellules y sont petites, prismatiques, irrégulières et fixées à la membrane basale par les hémidesmosomes (Gourreau, J.M, 1995).

Des cellules de Langerhans se trouvent également au niveau de cette couche ainsi que dans la suivante, elles possèdent des récepteurs à Fc-IgG et à C3 et participent ainsi à la stimulation antigénique.

Ces cellules, de par leur position à la limite entre le conjonctif et l'épithélium, sont le siège d'échanges nutritionnels, physicochimiques et parfois pathologiques. Elles sont donc souvent le point de départ des dermatoses.

**b. La couche de Malpighi (stratum spinosum)** se compose de six à huit couches de cellules ; elle correspond à l'épiderme proprement dit. C'est une structure vivante et colorée contenant de nombreuses terminaisons nerveuses et des cellules irrégulières reliées entre elles grâce à des tonofilaments.

Le trayon étant une zone glabre, l'épaisseur de cette couche, à ce niveau, est plus importante.

**c. La couche granuleuse (stratum granulosum)** ne contient que deux à cinq couches de cellules qui vont subir des modifications importantes. La présence au sein de tout le parenchyme de grains de kératohyaline caractérise cette couche. Le phénomène de kératinisation se met en place, les cellules commencent à s'aplatir, deviennent fusiformes et perdent leur noyau. On note également la présence de tonofibrilles qui assurent le maintien des liaisons de l'épithélium. Les cellules sont unies entre elles grâce aux desmosomes.

**d. La couche cornée claire (stratum lucidum)**, cette couche qui assure la régulation des échanges hydriques, ne possède que quelques couches de cellules mortes aplaties constituées d'un substrat lipidique.

**e. La couche cornée (stratum corneum)** contient beaucoup de cellules plates totalement dégénérées, elles ont une forme hexagonale et sont dépourvues de noyau.

Elles contiennent des substances lipidiques et protéiques qu'elles perdent en cours de migration du derme vers l'épiderme. Cette couche a la capacité de capter l'eau extérieure ou d'être hydratée à partir du derme et du tissu conjonctif sous-cutané. Il est important de noter la présence, à sa surface, d'un réseau compact de filaments de lipides et de kératines orientés parallèlement les uns aux autres formant une barrière efficace, contenant de 20 à 25% d'eau et 20% de lipides. L'ensemble est recouvert par un film hydro-lipido-protéique.

Chez les bovins, ce sont essentiellement les glandes sébacées qui produisent ce film, les lipides sont distribués irrégulièrement sous forme de globules notamment au niveau des couches les plus extérieures. L'épaisseur de cette couche cornée dépend directement des contraintes mécaniques qui s'exercent dessus. On comprend donc facilement l'épaississement de cette couche suite à la traite.

Le derme situé en dessous est constitué de deux couches principales :

Le derme papillaire (stratum papillare) constitué de crêtes hérissées de papilles et refermant des fibres de collagène et des fibres élastiques entrelacées étroitement, se situe contre la membrane basale. Il est richement vascularisé par des capillaires veineux et artériels très fins.

Le derme réticulaire (stratum reticulare) se situe quant à lui plus en profondeur et présente un réseau de fibres de collagène parallèles entrelacées en angle droit.

Plusieurs éléments sont présents :

La substance interstitielle qui compose en grande majorité le derme est un gel mucoïde d'origine fibroblastique composé de protéoglycanes, d'acide hyaluronique, de dermatane sulfate, de chondroïtine-4-sulfate et de chondroïtine-6-sulfate. Ce gel remplit l'espace et entoure les différentes structures du derme sans limiter les échanges. Les électrolytes, les nutriments et les cellules le traversent en passant des vaisseaux du derme jusqu'à l'épiderme avasculaire.

Les cellules du derme sont essentiellement représentées par les fibroblastes. On note la présence de quelques mélanocytes autour des vaisseaux superficiels du derme. Chez les ruminants, il y a une accumulation périvasculaire de cellules lymphoïdes et d'histiocytes. Quelques mastocytes et éosinophiles sont présents.

Le derme est parcouru par de nombreuses artères et veines, avec la possibilité d'anastomoses et de shunts artério-veineux notamment au niveau des extrémités jouant un rôle dans la thermorégulation.

Le système lymphatique est très développé, il assure la nutrition et l'élimination des déchets. Il fait le lien entre la peau et les ganglions lymphatiques permettant la réponse immunitaire.

Enfin le tissu sous-cutané est fibreux et gras. Il contient des cellules graisseuses : les lipocytes et les adipocytes.

Il a un rôle de réserve énergétique et d'isolant thermique.

Au sein de la paroi du trayon, on note la présence de nombreux faisceaux de fibres musculaires disposés irrégulièrement sur toute la longueur de trayon puis progressivement en anneau vers son extrémité pour former un sphincter. Ceci permet au trayon de se rétracter et de se fermer.

Le trayon est une structure très sensible, il est parcouru par de nombreuses terminaisons nerveuses :

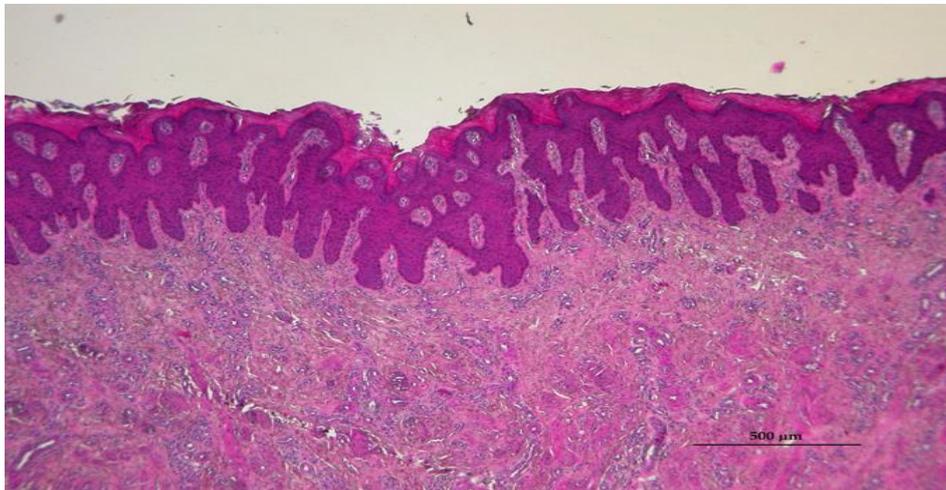
- ✓ Les papilles tactiles de Merkel et les corpuscules de Meissner pour le contact,
- ✓ Les corpuscules de Pacini et ceux de Golgi-Mazzoni pour la pression,
- ✓ Les corpuscules thermorécepteurs de Krause pour le froid et les organes de Ruffini pour la chaleur.

On note la présence en partie distale du trayon de la Rosette de Furstenberg.

Dans le canal du trayon, l'épithélium se stratifie et devient de plus en plus pavimenteux.

A ce niveau, la dégénérescence cornée est importante ce qui permet de faire la différence entre cet épithélium et celui du sinus du trayon.

La muqueuse du canal se raccorde au tégument cutané du trayon au niveau de l'ostium papillaire en formant un anneau blanc caractéristique.



**Photo 2 :** Peau de l'extrémité du trayon x 50, HE (Pr D. PIN)

### **I.2.2. Reste de la mamelle**

La peau du reste de la mamelle reprend ces éléments auxquels s'ajoutent différentes structures essentiellement dans le derme.

#### **a. Les glandes sébacées :**

Ce sont des glandes holocrines qui s'ouvrent au niveau de l'infundibulum du follicule pileux. Elles sécrètent le sébum (substance huileuse) qui assure la souplesse de la peau et qui forme une émulsion. Répartie sur la couche cornée, elle permet de retenir l'humidité et de maintenir une bonne hydratation.

#### **b. Les glandes sudoripares :**

Ces glandes apocrines s'ouvrent également au niveau de l'infundibulum en dessous des glandes sébacées. Elles sécrètent une substance colloïde. Elles assurent la thermorégulation en association avec d'autres

phénomènes, elles permettent d'éliminer les déchets et maintiennent l'humidité de la peau en assistant le flux de sébum.

Elles ont également un rôle dans la signalisation olfactive.

**c. Les phanères :**

Les vaches possèdent uniquement des follicules primaires contenant des glandes sébacées et sudoripares ainsi qu'un muscle piloérectile.

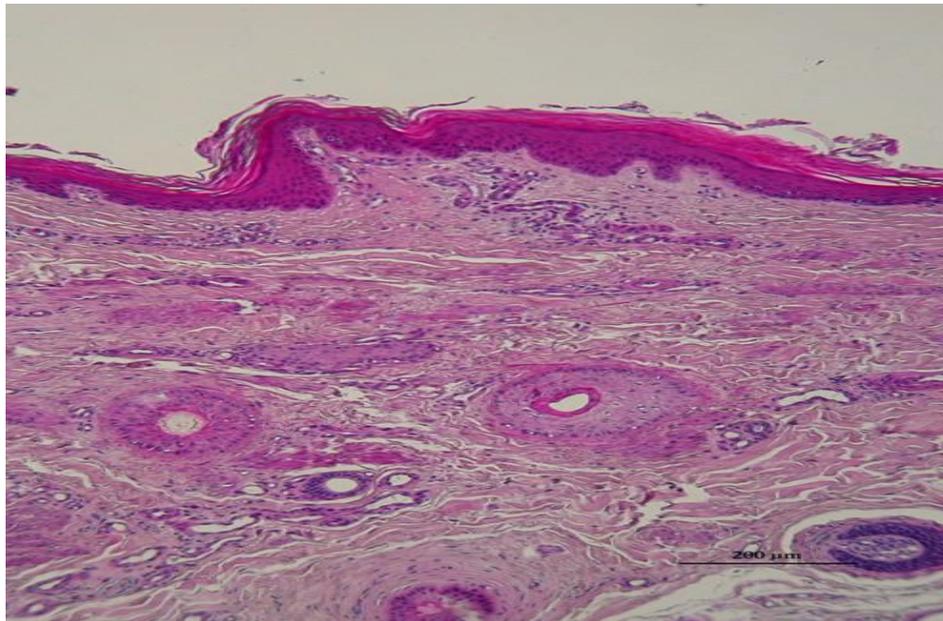
**d. Les follicules pileux :**

Il se compose de trois régions, l'infundibulum qui correspond à la région entre la surface de la peau et le conduit de la glande sébacée, l'isthme entre ce conduit et l'attachement du muscle piloérectile et enfin le segment inférieur de l'attachement de ce muscle à la papille dermique.

Cette dernière est en continu avec le tissu dermique et est recouvert d'une fine couche de membrane basale.

Le poil pousse à partir d'une couche de cellules nucléées épithéliales qui recouvre la papille.

Le poil en lui-même est constitué d'une médulla contenant des cellules plates près de la racine, de l'air et de vacuoles de glycogènes dans le reste du poil et d'un cortex fait de cellules kératinisées. Enfin la cuticule, couche la plus externe du poil, est formée de cellules anucléaires plates et kératinisées rangées comme les tuiles d'un toit.



**Figure 3 :** Peau de la mamelle x 100, HE (Pr D. PIN)

### **I.2.3 Les protections naturelles de la glande mammaire**

**a. Les défenses anatomiques**

La défense de la peau se fait sur trois plans : physique, chimique et microbiologique.

Les poils représentent la première barrière physique en empêchant le contact entre la peau et d'éventuels agents pathogènes et en minimisant les atteintes physiques ou chimiques.

La glande mammaire est protégée par une variété de mécanismes de défense (Nickerson, 1987). Parmi eux, il existe une protection physique assurée par un sphincter musculaire qui assure l'étanchéité de l'entrée du canal du trayon. L'anatomie même du canal contribue à la protection : l'épithélium kératinisé permet de limiter l'attachement des bactéries pathogènes réduisant leur implantation et leur progression (Paulrud, 2005 ; Krömker et Friedrich, 2009). De plus, à la base de la glande entre la citerne du trayon et la citerne de la glande, la Rosette de Furstenberg est un repliement muqueux enrichi en leucocytes qui participe grandement à la protection vis-à-vis du pathogène présent (Figure 5). Le trayon est le seul orifice entre le système interne de sécrétion et l'environnement et constitue donc la seule voie d'accès naturel possible pour les agents pathogènes (outre une lésion cutanée au niveau de la glande). Plusieurs défenses ou barrières existent pour limiter la pénétration des agents pathogènes. En dehors des barrières physiques, de nombreuses substances bactériostatiques (acides myristique, palmitoléique et linoléique...) et de nombreux facteurs solubles (lactoferrine, lysozyme, lactoperoxydase...) assurent la première ligne de défense anti-bactérienne. Enfin ils peuvent également arborer de nombreux microorganismes sur lesquels nous reviendrons. La couche cornée forme la base de la défense physique. Elle se compose comme nous l'avons vu de cellules kératinisées très serrées et est imperméabilisée par une émulsion de sébum et de sudation.

En plus de ses propriétés physiques, les émulsions fournissent une barrière chimique aux éventuels pathogènes.

Les acides gras qui la composent, notamment l'acide linoléique, ont des propriétés antibactériennes et antifongiques.

Des substances hydrosolubles contiennent également des sels inorganiques et des protéines inhibant la croissance des microorganismes.

Du sodium chlorure, l'interféron glycoprotéine antiviral, de l'albumine, des transferrines, le complément, des glucocorticoïdes et des immunoglobulines sont présents. La présence des immunoglobulines A, G et M a été démontrée à la surface du revêtement cutané des vaches et des moutons.

Les IgA sont présentes dans la substance intercellulaire de l'épiderme et dans la sudation, les IgG dans la substance intercellulaire de l'épiderme, du derme et dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, enfin les IgM sont présents au niveau de la membrane basale, de la papille folliculaire et dans la paroi des vaisseaux sanguins dermiques.

La microflore de la peau saine constitue également un moyen de défense.

Les bactéries et éventuellement les levures ainsi que les filaments mycéliens sont localisés à la surface de l'épiderme et au niveau de l'infundibulum du follicule pileux.

Les bactéries qui sont normalement présentes y vivent en symbiose. Cette relation avec l'hôte permet aux microorganismes d'occuper les niches microbiologiques et inhibe la colonisation par des organismes pathogènes.

Le tableau ci-dessous montre la multiplicité des microorganismes résidant sur la peau des bovins (Scott, D.W, 1988). L'absence de poils, de glandes sébacées et de glandes sudoripares au niveau du trayon rend la peau très fragile. De plus, le revêtement cutané à ce niveau subit une forte sollicitation lors de la traite, ce qui le rend propice aux affections.

**Tableau 1 : Bactéries et champignons isolés de la peau normale de bovin**

BACTERIES	CHAMPIGNON
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacillus spp.</li> <li>• <i>Corynebactérium bovis</i></li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Klebsiella pneumoniae</i></li> <li>• Proteus sp.</li> <li>• Pseudomonas sp.</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus hyicus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus saprophyticus</i></li> <li>• <i>Streptococcus agalactae</i></li> <li>• <i>Streptococcus faecalis</i></li> <li>• <i>Streptococcus uberis</i></li> <li>• Streptococcus sp. hemolytic</li> <li>• Streptococcus sp. non hemolytic</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acremonium spp.</li> <li>• Arthrimum spp.</li> <li>• Arthroderma sp.</li> <li>• Aspergillus spp.</li> <li>• Aureobasidium sp.</li> <li>• Botrytis spp.</li> <li>• Candida spp.</li> <li>• Chaetumium spp.</li> <li>• Cladosporium spp.</li> <li>• Epicoccum spp.</li> <li>• Fusarium sp.</li> <li>• Mucor spp.</li> <li>• Penicillium spp.</li> <li>• Phoma spp.</li> <li>• Rhodotorula spp.</li> <li>• Trichothecium sp.</li> </ul>

### b. Les défenses immunitaires

Outre les barrières physiques, l'immunité de l'hôte assure la seconde ligne de défense. Elle peut être divisée en deux types : immunité innée et acquise. Les défenses immunitaires sont assurées par des cellules produites par la moelle osseuse, les leucocytes (Tableau 2). Même en absence d'infection, celles-ci sont présentes dans la glande à des concentrations entre 50.000 à 200.000 cellules par millilitre de lait (Sordillo et al, 1997, Bradley et al, 2002).

L'immunité innée, ou non spécifique, est particulièrement importante lors d'une première exposition à un agent pathogène. Les réponses non spécifiques sont déjà présentes et rapidement activées au site d'infection. La réponse immunitaire innée est principalement médiée par les macrophages, neutrophiles, les « Natural Killer » ainsi que d'autres facteurs solubles. Si malgré cette immunité innée le pathogène n'est pas éliminé, l'immunité acquise (ou spécifique) sera induite. Ce type de réponse immunitaire reconnaît spécifiquement des déterminants antigéniques d'un pathogène afin de l'éliminer sélectivement. La réponse immunitaire acquise est principalement médiée par les anticorps (immunité humorale), les macrophages (cellules présentatrices d'antigènes ; CPA) et les cellules lymphocytaires (Rainard et Riollot, 2006) (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Liste des cellules du système immunitaire et de leurs principales fonctions.

Type de cellules		Rôle principaux
	Cellule dendritique	Phagocytose / opsonisation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation) Cellules présentatrices d'antigènes
	Monocytes - Macrophage	Phagocytose / opsonisation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation) Cellules Présentatrices d'Antigènes
	Neutrophiles	Phagocytose Destruction des agents pathogènes Homéostasie de l'inflammation Synthèse de cytokines (médiateur de l'inflammation)
	Basophiles	Synthèse d'histamine et d'héparine Activation de l'inflammation Action antiallergique Perméabilité tissulaire
	Eosinophile	Action antiparasitaire Activation de l'inflammation Action antiallergique Perméabilité tissulaire
	Mastocytes	Sécrétion de sérotonine, histamine et héparine Action antiallergique Synthèse de cytokines
	B	<b>Immunité humorale</b> Production d'immunoglobuline (anticorps) Plasmocytes (synthèse d'anticorps spécifique à l'opsonisation), cellules B à mémoire (mémorisation des antigènes)
	T	<b>Immunité cellulaire</b> Action cytotoxique (destruction des cellules infectées), auxiliaire (activation de cellules immunitaires), ou suppresseur (retour à l'état basal de l'inflammation)
	Cellule NK	<b>Cellules tueuses naturelles</b> Lyse des cellules du non-soi sans reconnaissance spécifique d'antigène Libération de perforine et granzyme

La défense de la glande mammaire nécessite une action coordonnée et interactive des deux types de réponses immunitaires. Les macrophages sont les cellules dominantes dans le lait sain (Gourreau, J.M et *al*, 1995). Leur rôle est de détecter les flores indésirables et de recruter les neutrophiles du sang vers la glande mammaire via la libération de cytokines (tableau 2) (Gourreau, J.M et *al*, 1995). Lors d'une infection, la proportion de macrophages diminue mais assure le rôle de présentation d'antigènes. Les neutrophiles sont donc activement transférés du sang vers la citerne dès le début de l'inflammation et ils représentent jusqu'à 90 % des cellules somatiques lors d'une mammite (Gourreau, J.M et *al*, 1995)]. Si les pathogènes persistent, les lymphocytes B et T seront également recrutés. Les lymphocytes B assurent la synthèse d'anticorps (immunité humorale). Les lymphocytes T assurent une immunité cellulaire. Les lymphocytes T4 (LT4, ou « helper ») sont activés via les CPA et orientent la réponse vers une immunité humorale ou cellulaire. Les LT8, cellules cytotoxiques, assurent l'immunité cellulaire proprement dite (Gourreau, J.M., 2000). Les principaux effecteurs solubles du système immunitaire sont les anticorps produits par les lymphocytes B dont quatre classes participent à l'immunité mammaire, les IgG1/2, les IgA et les IgM (Gourreau, J.M et *al*, 2000).

### **c. L'immunité des cellules épithéliales**

La détection du pathogène ainsi que la réponse inflammatoire initiale sont cruciales pour le recrutement des neutrophiles (Rainard et Riollet, 2006). Certaines cellules du système immunitaire peuvent résider dans la glande mammaire et participer au recrutement des neutrophiles, cependant, d'autres lignées cellulaires participent à ce phénomène comme les CEM. En effet, le tissu mammaire bovin a montré une capacité à exprimer des ARNm des récepteurs membranaires TLR2, 4 et 9, impliqués dans l'interaction avec les bactéries, ainsi que leur surexpression durant une infection intramammaire (Rainard et Riollet, 2006 ; Goldammer et al., 2004 ; Strandberg et al., 2004). Les TLR sont des récepteurs cellulaires permettant la reconnaissance des « pathogen-associated microbia pattern ». La stimulation des TLR par les PAMPs est à l'origine d'une cascade d'activation moléculaire intracellulaire incluant des molécules comme MyD88 et le groupe des "IL1-R-associated serine kinase" (IRAK) (Medzhitov R, 1997). Cette cascade conduit à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui est une plaque tournante intracellulaire responsable de la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-1 et IL-12) et directement effectrice comme le TNF alpha aboutissant à la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules épithéliales mammaires peuvent ainsi réagir en synthétisant des cytokines proinflammatoires telles que l'IL6, l'IL8 et le TNF- $\alpha$  permettant le recrutement des cellules spécialisées (Gourreau, J.M et *al*, 1995). Ces résultats ont été obtenus à partir de cellules primaires ou de lignées immortalisées (MAC-T) qui ont toutes deux montré des capacités de sécrétion. Par conséquent, les cellules du tissu mammaire participent grandement et sont de plus en plus étudiées pour leur capacité à détecter les pathogènes et à induire le recrutement de cellules immunitaires spécialisées (Hyunh et *al*, 1991 ; Boudjellab et *al*, 2000 ; Bannerman et *al*, 2004 ; Riollet et *al*, 2000 ; 2001). Cependant, certaines études ont montré des différences *in vitro* entre des lignées primaires ou immortalisées, soulignant les limites de l'utilisation

des lignées de cellules comme les MAC-T dans l'étude de la réponse immunitaire (Aslani, M.R et al, 1995)

### **I.3. Le processus infectieux**

Le processus infectieux au cours d'une mammites d'origine bactérienne n'est pas totalement élucidé. Cependant, l'ensemble des données *in vitro* (lignées cellulaires, explant, culture primaire) ou *in vivo* (infections intramammaires) permettent de dessiner un schéma d'infection cohérent. Les mammites d'origine bactérienne se caractérisent par trois étapes successives : la contamination de la mamelle, l'invasion cellulaire et l'inflammation (Aslani, M.R et al, 1995). La première étape est la contamination du trayon par le pathogène. Une fois le canal du trayon contaminé, les bactéries peuvent atteindre la lumière de la citerne, se multiplier puis envahir le tissu mammaire (Le Loir et Gautier, 2010). La réaction inflammatoire et immunitaire qui est induite par l'invasion de la glande mammaire permet le recrutement en très grand nombre de polynucléaires neutrophiles et d'autres leucocytes (monocytes et lymphocytes) (Aslani, M.R et al, 1995). Le cycle infectieux sera décrit en détail dans le paragraphe relatif aux mammites staphylococciques, car celui-ci peut se dérouler différemment en fonction du pathogène impliqué.

### **I.4. Etiologie des mammites bovines**

L'incidence et la prévalence des pathogènes impliqués dans les mammites sont différentes chez les bovins et chez les ovins-caprins. Il existe une multitude de microorganismes responsables de mammites, notamment chez les bovins. Les microorganismes causant des mammites peuvent être classés en trois grandes catégories : les pathogènes majeurs (contagieux et environnementaux), les pathogènes mineurs et les pathogènes occasionnels.

#### **a. Les pathogènes majeurs**

Au sein de la famille des pathogènes majeurs impliqués dans les mammites bovines, on distingue les mammites contagieuses (réservoir mammaire) des mammites environnementales (réservoir environnemental : litière, sol...).

Les pathogènes contagieux sont essentiellement des bactéries capables de survivre et proliférer au niveau de la peau, des trayons et des pis. Ces pathogènes peuvent se transmettre à d'autres quartiers et d'autres animaux, les principaux représentants de cette catégorie sont *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus uberis* (Oviedo-Boyso et al, 2007, Bidaud et al., 2007, Bradley et al, 2007) (tableau 4).

Les pathogènes environnementaux sont présents dans l'environnement de l'animal (*S. uberis* est à la fois un pathogène avec un réservoir environnemental et mammaire) (Oviedo-Boyso et al, 2007). Ces pathogènes sont considérés comme opportunistes. Ils pénètrent la glande via le canal du trayon et induisent une inflammation mais sont souvent vite éliminés. De nombreux microorganismes peuvent être considérés comme pathogènes environnementaux mais les principaux représentants sont *Streptococcus uberis* et *Escherichia coli* (Bradley et al, 2002).

**b. Les pathogènes mineurs**

Ceux-ci se distinguent des pathogènes majeurs par la prévalence et par l'incidence des mammites qu'ils induisent. Ils causent généralement peu de problèmes et sont majoritairement des bactéries commensales de la peau et des poils. Cette catégorie regroupe l'ensemble des Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN), et plus fréquemment *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus heparis* (Pyorala et Taponen, 2009 ; Almeida et Oliver, 2001). On peut également retrouver *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium bovis*, etc... (Khan et Khan, 2006). Ces pathogènes ne causent généralement pas de mammites cliniques.

**c. Les pathogènes occasionnels**

La majorité des cas de mammites résultent d'une infection bactérienne impliquant les espèces citées ci-dessus. Cependant de nombreux autres microorganismes peuvent pénétrer la glande mammaire et déclencher une inflammation et donc une mammite. Parmi ces pathogènes occasionnels se retrouvent des bactéries mais aussi des virus et certaines levures. Les pathogènes occasionnels les mieux identifiés sont les mycoplasmes, qui peuvent engendrer des mammites cliniques ou subcliniques (González et Wilson, 2003 ; Fox L.K., 2009 ; 2012).

Cependant, pour en obtenir de meilleurs effets et résultats, il vaut toujours mieux l'utiliser la plus fraîche possible.

## **II. GENERALITES SUR LE LAIT**

### **II.1 Définitions du lait**

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum » (Alais, 1975). Le Codex Alimentarius en 1999, le définit comme étant la sécrétion mammaire normale d'animaux de traite obtenue à partir d'une ou plusieurs traites, sans rien y ajouter ou en soustraire, destiné à la consommation comme lait liquide ou à un traitement ultérieur. Selon Deforges et al. en 1999, le lait cru est un lait non chauffé au-delà de 40°C ni soumis à un traitement non thermique d'effet équivalent notamment du point de vue de la réduction de la concentration en micro-organismes.

### **II.2 Composition du lait**

Le lait de vache est un lait caséineux, sa composition générale est représentée au tableau n°1. Les données sont des approximations quantitatives, qui varient en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation et état de santé de l'animal, période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite. Il reste que la composition exacte d'un échantillon de lait ne peut s'obtenir que par analyse (Roudaut et al, 2005).

#### **II.2.1 L'eau**

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910 g par litre, en elles, sont dispersés tous les autres constituants du lait, tous ceux de la matière sèche (Mathieu, 1998).

#### **II.2.2 Matière grasse**

La matière grasse ou taux butyreux représente 25 à 45 g par litre (Luquet, 1985). Elle est constituée par 98,5% de glycérides (esters d'acide gras et de glycérol), 1% de phospholipides polaires et 0,5% de substances liposolubles cholestérol, hydrocarbures et vitamines A, D, E, et K (Goursaud, 1985).

La matière grasse est dispersée en émulsion, sous forme de microgouttelettes de triglycérides entourées d'une membrane complexe, dans la phase dispersante qu'est le lait écrémé (Boutonnier, 2008). Cet état globulaire est fragile ; toute altération de la membrane par voie chimique, physique et microbienne conduit à la déstabilisation de l'émulsion. Cette évolution peut être accidentelle, elle se traduit alors le plus souvent par une séparation de la phase grasse sous forme d'huile ou d'agrégats et/ou par l'apparition de saveurs indésirables (rancidité-oxydation) ; lorsqu'elle est dirigée, elle permet la concentration de la phase grasse sous forme de beurre après barattage, ou sous forme d'huile de beurre et de matière grasse laitière anhydre après chauffage et centrifugation (Madji, 2009).

#### **II.2.3 Matière azotée**

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait (Goursaud, 1985). Les protéines se répartissent en deux phases : une phase micellaire et une phase soluble. La phase micellaire représente la caséine totale (environ 80% des protéines du lait) du lait. Elle est formée par quatre protéines

individuelles : - Alpha-caséines ou caséines  $\alpha_1$  36 % et  $\alpha_2$  10 % - Bêta-caséine ou caséine  $\beta$  34 % - Kappa-caséine ou caséine  $\kappa$  13 % - Gamma-caséines ou caséine  $\gamma$  7 % (produits de la protéolyse de la  $\beta$ -caséine) (Goy et al, 2005). Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (2,9 % de Ca, 0,1% de Mg, 4,3% d'ions phosphate, 0,5% d'ions citrate) (Cayot et Lorient, 1998). La présence de phosphate de calcium lié à la caséine est l'une des forces responsables de la stabilité de la structure des micelles de caséine (Marchin, 2007). Une propriété importante des micelles est de pouvoir être déstabilisée par voie acide ou par voie enzymatique et de permettre la coagulation. Elle constitue le fondement de la transformation du lait en fromage et en laits fermentés (Ramet, 1985). L'autre fraction protéique (environ 17%) du lait est présente dans le lactosérum. Les deux principales protéines sériques sont la  $\beta$ -lactoglobuline et l' $\alpha$ -lactalbumine (Cayot et Lorient, 1998).

#### **II.2.4 Les glucides**

Le sucre principal du lait est le lactose ; c'est aussi le composé prépondérant de la matière sèche totale. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g par litre. C'est un disaccharide constitué par de l' $\alpha$  ou  $\beta$  glucose uni à du  $\beta$  galactose, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactoses (Luquet, 1985) :  $\alpha$  Glu +  $\beta$  Gal  $\alpha$  Lac hydraté : C<sub>12</sub> H<sub>22</sub> O<sub>11</sub> + H<sub>2</sub>O  $\beta$  Glu +  $\alpha$  Gal  $\beta$  Lac anhydre : C<sub>12</sub> H<sub>22</sub> O<sub>11</sub> Le lactose est fermentescible par de nombreux micro-organismes et il est à l'origine de plusieurs types de fermentations pouvant intervenir dans la fabrication de produits laitiers (Morrissey, 1995). - Fermentation lactique : due aux bactéries lactiques naturelles ou ajoutées (ferments lactiques) qui utilise le lactose en le transformant en acide lactique. Cette fermentation lactique est souvent accompagnée d'une production plus au moins grande de substances secondaires (ex. diacétyle) responsables de l'arôme des produits laitiers (Gordon et Loisel, 1991). - Fermentation propionique : due aux bactéries propioniques qui transforment le lactose en acide propionique et en acide acétique responsables de la saveur des fromages à pâte cuite et en gaz carbonique induisant l'ouverture de ces fromages (Luquet, 1985). - Fermentation butyrique : par des bactéries du genre Clostridium qui utilisent l'acide lactique déjà produit en le transformant en acide butyrique, responsable d'odeurs putrides et de goût piquant, et en gaz carbonique et hydrogène. Ces substances induisent le gonflement tardif des fromages, en particulier à pâte cuite. - Fermentation alcoolique : due à des levures qui hydrolysent le lactose en glucose et galactose et qui transforment ensuite le glucose en alcool éthylique. Cette fermentation est utilisée en particulier dans la fabrication du kéfir, boisson issue de la fermentation du lait, contenant peu d'alcool et légèrement gazeuse. A température élevée, le lactose participe avec les protéines à des réactions de brunissement non enzymatique pouvant altérer la couleur des laits stérilisés (Alais, 1975).

#### **II.2.5 Matière minérale**

La matière minérale du lait (7g à 7,5g/l) est fondamentale d'un point de vue nutritionnel et technologique. Il est possible de doser les matières minérales ou cendres du lait par une méthode de calcination à 550°C (Luquet, 1985).

Les minéraux sont présents, soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les ions calcium, phosphore, magnésium et soufre existent dans les deux fractions (Mathieu, 1998). Il existe un équilibre entre les formes solubles et colloïdales, d'une part, et entre les formes ionisées et non dissociées d'autre part. Cet état est précaire parce qu'il est sensible à divers facteurs, notamment au pH, à la température, et à la concentration ou à l'addition de calcium. Toute altération de ces équilibres modifie la stabilité du lait, notamment les propriétés de la caséine native. En raison de la présence concomitante de lactose et de phosphopeptides (produits d'hydrolyse de la caséine), les minéraux sont, de tous les éléments du lait, ceux qui sont les mieux adsorbés et retenus. A cet égard, le rapport calcium/phosphore (Ca/P) du lait de vache (voisin de 1,2), bien qu'inférieur à celui du lait maternel (voisin de 2,2), est de loin supérieur à celui des autres denrées alimentaires, faisant du lait une excellente source de calcium et un bon correctif des rations pauvres en calcium (FAO, 1995).

## **II.2.6 Biocatalyseurs**

### **II.2.6.1 Enzymes**

Ce sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Plus de 60 enzymes principales ont pu être isolées du lait ou dont l'activité a été déterminée. La moitié d'entre elles sont des hydrolases (Blanc, 1982 ; Pougheon, 2001). Ces enzymes peuvent jouer un rôle très important en fonction de leurs propriétés : - Lyses des constituants originels du lait ayant des conséquences importantes sur le plan technologique et sur les qualités organoleptiques du lait (lipases, protéases).

Ainsi, on distingue des protéases originelles du lait ; la plasmine est le composant majoritaire (elle provient du sang et migre via la glande mammaire), et des protéases d'origine microbienne. Le genre *Pseudomonas* et tout particulièrement l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, synthétise des protéases exocellulaires thermostables. Il est également à souligner que dans les laits de mammites, le nombre de cellules somatiques peut être considérablement accru, le niveau de protéolyse est nettement plus élevé que dans les laits normaux (Miranda et Gripon, 1986).

- Rôle antibactérien, elles apportent une protection au lait (lactoperoxydase et lysozyme). - Indicateurs de qualité hygiénique (certaines enzymes sont produites par des bactéries et des leucocytes), de traitement thermique (phosphatase alcaline, peroxydase, acétyl estérase, sont des enzymes thermosensibles) et d'espèces (test de la xanthineoxydase pour détecter le lait de vache dans le lait de chèvre) (Pougheon, 2001).

**Tableau n°3** : Composition moyenne du lait de vache (Alais et al. 2008).

	<b>Composition (g/L)</b>	<b>Etat physique des composants</b>
<b>Eau</b>	905	Eau libre (solvant) plus eau liée (3,7%)
<b>Glucides</b> (lactose)	49	Solution
<b>Lipides</b>	35	Emulsion des globules gras (3 à 5 µm)
Matière grasse proprement dite	34	
Lécithine (phospholipides)	0,5	
Insaponifiable (stéroïls, carotènes, tocophérol)	0,5	
<b>Protides</b>	34	Suspension micellaire phosphocaséinate de calcium (0,08 à 0,12 µm) Solution (colloïdale) Solution (vraie)
Caséine	27	
Protéines solubles (globulines, albumines)	2,5	
	1,5	
Substances azotées non protéiques		
<b>Sels</b>	9	Solution ou état colloïdale
De l'acide citrique (en acide)	2	
De l'acide phosphorique (P <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) Du chlorure de sodium (NaCl)	2,6 1,7	
<b>Constituants divers</b> (vitamines, enzymes, gaz dissous)	Traces	
<b>Extrait sec total</b>	127	
<b>Extrait sec non gras</b>	92	

### II.2.6.2 Vitamines

Ce sont des molécules complexes de taille plus faible que les protéines, de structure très variées ayant un rapport étroit avec les enzymes, car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique.

On classe les vitamines en deux grandes catégories : - les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait et - les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, et K) associées à la matière grasse, certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie (Debry, 2001).

### II.3 Variations dans la composition du lait

Le lait qui arrive à l'usine, constitue une matière première dont la composition n'est pas fixe. Ce caractère rend donc l'utilisation de cette matière première assez difficile, diminue les rendements et

modifie les caractères organoleptiques des produits finis. Deux grands types de variation existent, au stade de l'animal et au stade du traitement du lait. La composition chimique du lait et ses caractéristiques technologiques varient sous l'effet d'un grand nombre de facteurs (Stoll, 2003). Ces principaux facteurs de variation sont bien connus. Ils sont soit intrinsèques liés à l'animal (facteurs génétiques, stade de lactation, état sanitaire, etc.), soit extrinsèques liés au milieu et à la conduite d'élevage (saison, climat, alimentation). Cependant, si les effets propres de ces facteurs ont été largement étudiés, leurs répercussions pratiques sont parfois plus difficiles à interpréter compte tenu de leurs interrelations (Wolter, 1988).

### **II.3.1 Facteurs intrinsèques**

#### **II.3.1.1 Facteurs génétiques**

On observe des variations importantes de la composition du lait entre les différentes races laitières et entre les individus d'une même race. D'une manière générale, on remarque que les fortes productrices donnent un lait plus pauvre en matières azotées et en matière grasse. Ces dernières sont les plus instables par rapport au lactose (Veisseyre, 1979). Jakob et Hänni en 2004, notent l'existence de variants génétiques A et B issus des mutations ponctuelles. Ces derniers donnent des protéines différentes qui ne se distinguent que par l'échange d'un ou deux acides aminés. Les variants génétiques des protéines du lait, notamment ceux de la caséine  $\kappa$  ( $\kappa$ -Cn) et de la  $\beta$ -lactoglobuline ( $\beta$ -Lg), influencent la composition du lait et certains critères de productivité des vaches.

#### **II.3.1.2 Stade de lactation**

Au cours de la lactation, les quantités de matière grasse, de matières azotées et de caséines évoluent de façon inversement proportionnelle à la quantité de lait produite. Les taux de matière grasse et de matières azotées, élevés au vêlage, diminuent au cours du premier mois et se maintiennent à un niveau minimal pendant le deuxième mois. Ils amorcent ensuite une remontée jusqu'au tarissement. L'amplitude de variation est généralement plus importante pour le taux butyreux que pour le taux protéique. Les laits de fin de lactation présentent les mêmes caractéristiques des laits sécrétés par les animaux âgés. En outre, les deux taux, protéique et butyreux, ont tendance à diminuer au cours des lactations successives (Meyer et Denis, 1999).

#### **II.3.1.3 Age et nombre de vêlage**

Veisseyre en 1979, montre que la quantité de lait augmente généralement du 1er vêlage au 5ème, puis diminue sensiblement et assez vite à partir du 7ème. Le vieillissement des vaches provoque un appauvrissement de leur lait, ainsi la richesse du lait en matière sèche tend à diminuer. Ces variations dans la composition sont attribuées à la dégradation de l'état sanitaire de la mamelle ; en fonction de l'âge, le nombre de mammites croît et la proportion de protéines solubles augmente en particulier celles provenant du sang (Mahieu, 1985).

#### **II.3.1.4 Etat sanitaire**

Lors d'infection, il y a un appel leucocytaire important qui se caractérise par une augmentation de comptage cellulaire induisant des modifications considérables dans la composition du lait (Badinand,

1994). Les mammites sont les infections les plus fréquentes dans les élevages laitiers. Elles sont à l'origine d'une modification des composants du lait avec pour conséquence, une altération de l'aptitude à la coagulation des laits et du rendement fromager (Toureau et *al*, 2004).

### **II.3.2 Facteurs extrinsèques**

#### **II.3.2.1 Alimentation**

L'alimentation joue un rôle important ; elle permet d'agir à court terme et de manière différente sur les taux de matière grasse et de protéines. En effet, selon Coulon et Hoden en (1991), le taux protéique varie dans le même sens que les apports énergétiques, il peut aussi être amélioré par des apports spécifiques en acides aminés (lysine et méthionine). Quant au taux butyreux, il dépend à la fois de la part d'aliment concentré dans la ration, de son mode de présentation et de distribution (finesse de hachage, nombre de repas, mélange des aliments).

#### **II.3.2.2 Saison et climat**

L'effet propre de la saison sur les performances des vaches laitières est difficile à mettre en évidence compte tenu de l'effet conjoint du stade physiologique et des facteurs alimentaires (Coulon et *al*, 1991). A partir des travaux réalisés par Spike et Freeman en (1967) cité par Coulon et *al*, en 1991, il a été montré que la production laitière est maximale au mois de juin et minimale en décembre. A l'inverse, les taux butyreux et protéique du lait sont les plus faibles en été et les plus élevés en hiver. Chez des vaches de type pie noire, ils atteignent 3g/Kg pour le taux butyreux et près de 2g/Kg pour le taux protéique.

### **II.4 Quelques caractéristiques physico-chimiques du lait**

#### **II.4.1 La densité**

Elle oscille entre 1,028 et 1,034. Elle doit être supérieure ou égale à 1,028 à 20°C. La densité des laits de grand mélange des laiteries est de 1,032 à 20°C. La densité des laits écrémés est supérieure à 1,035. Un lait à la fois écrémé et mouillé peut avoir une densité normale (Vierling, 2008).

#### **II.4.2 L'acidité de titration ou acidité Dornic**

L'acidité de titration indique le taux d'acide lactique formé à partir du lactose. Un lait frais a une acidité de titration de 16 à 18°Dornic (°D). Conservé à la température ambiante, il s'acidifie spontanément et progressivement (Mathieu, 1998). C'est la raison pour laquelle on distingue l'acidité naturelle, celle qui caractérise le lait frais, d'une acidité développée issue de la transformation du lactose en acide lactique par divers microorganismes (CIPC lait, 2011). On exprime couramment l'acidité d'un lait en degrés Dornic ; ce dernier étant le nombre du dixième de millilitre de soude utilisée pour titrer 10 millilitres de lait en présence de phénolphaléine. Deux laits peuvent avoir le même pH et des acidités titrables différentes et inversement. C'est dire qu'il n'y a pas de relation d'équivalence réelle entre le pH et l'acidité de titration (Dieng, 2001).

#### **II.4.3 Le point de congélation**

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre -0,54 °C et - 0,55°C

(Mathieu, 1998). La mesure de ce paramètre permet l'appréciation de la quantité d'eau éventuellement ajoutée au lait. Un mouillage de 1% entraîne une augmentation du point de congélation d'environ 0,0055°C (Goursaud, 1985).

#### **II.4.4 Le pH**

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium ( $H_3O^+$ ) et donc une diminution du pH, car :  $pH = \log 1/[H_3O^+]$  A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions  $H^+$  disponibles dans le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait (CIPC lait, 2011). Un lait mammiteux, contenant des composés à caractéristiques basiques, aura un  $pH > 7$  et le colostrum un pH voisin de 6 (Luquet, 1985).

### **II. 5 Microbiologie du lait cru**

Le lait contient un nombre variable de cellules ; celles-ci correspondent à la fois à des constituants normaux comme les globules blancs, mais également à des éléments d'origine exogène que sont la plupart des microorganismes contaminants (Gripon *et al*, 1975). Les microorganismes, principalement, présents dans le lait sont les bactéries. Mais, on peut aussi trouver des levures et des moisissures, voire des virus. De très nombreuses espèces bactériennes sont susceptibles de se développer dans le lait qui constitue, pour elles, un excellent substrat nutritif. Au cours de leur multiplication dans le lait, elles libèrent des gaz (oxygène, hydrogène, gaz carbonique, etc.), des substances aromatiques, de l'acide lactique (responsable de l'acidification en technologie fromagère), diverses substances protéiques, voire des toxines pouvant être responsables de pathologie chez l'homme (Institut de l'élevage, 2009). L'importance et la nature des bactéries contaminants le lait, dépendent, de l'état sanitaire de l'animal, de la nature des fourrages (Agabriel *et al*, 1995), mais aussi des conditions hygiéniques observées lors de la traite, de la collecte, de la manutention et de la température de conservation du lait (Robinson, 2002). Un lait est considéré comme peu contaminé s'il renferme quelques centaines à quelques milliers de germes par millilitre, un lait fortement pollué peut en contenir plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions par ml (Ramet, 1985). Dans cette microflore contaminante, les bactéries conditionnent le plus directement la qualité hygiénique ainsi que l'aptitude à la conservation et à la transformation de la matière première (Adda *et al*, 1982).

#### **II.5.1 Flore originelle**

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10<sup>3</sup> germes/ml). A sa sortie du pis, il est pratiquement stérile et est protégé par des substances inhibitrices appelées lacténines à activité limitée dans le temps (une heure environ après la traite) (Cuq, 2007). La flore originelle des produits laitiers se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis, les genres dominants sont essentiellement des mésophiles (Vignola, 2002). Il s'agit de microcoques, mais aussi streptocoques lactiques et lactobacilles.

Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation (Guiraud, 2003) et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait et sur sa production (Varnam et Sutherland, 2001). Le tableau n°2 regroupe les principaux microorganismes originels du lait avec leurs proportions relatives.

**Tableau n°4 : Flore originelle du lait cru (Vignola, 2002)**

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

### **II.5.2 Flore de contamination**

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

Ces contaminations par divers microorganismes peuvent provenir de l'environnement : entérobactéries, Pseudomonas, Flavobacterium, microcoques, corynébactéries, Bacillus, etc., par l'intermédiaire du matériel de traite et de stockage du lait, par le sol, l'herbe ou la litière (tableau n°5). Des contaminations d'origine fécale peuvent entraîner la présence de Clostridium, d'entérobactéries coliformes et, éventuellement, d'entérobactéries pathogènes : Salmonella, Yersinia. Ceci explique l'importance d'un contrôle rigoureux du lait (Leyral et Vierling, 2007). D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait, lorsqu'il est issu d'un animal malade. Il peut s'agir d'agents de mammites, c'est-à-dire d'infections du pis : Streptococcus pyogenes, Corynebactérium pyogenes, staphylocoques, etc. Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : Salmonella ; Brucella, agent de la fièvre de Malte, et exceptionnellement Listeria monocytogenes, agent de la listériose ; Mycobacterium bovis et tuberculosis, agents de la tuberculose ; Bacillus anthracis, agent du charbon ; Coxiella burnetii, agent de la fièvre Q, et quelques virus. Hormis les maladies de la mamelle, le niveau de contamination est étroitement dépendant des conditions d'hygiène dans lesquelles sont effectuées ces manipulations, à savoir l'état de propreté de l'animal et particulièrement celui des mamelles, du milieu environnant (étable, local de traite), du trayon, du matériel de récolte du lait (seaux à traire, machines à traire) et, enfin, du matériel de conservation et de transport du lait (bidons, cuves, tanks) (tableau n°4) (FAO, 1995).

#### **II.5.2.1 Contaminations du lait cru au stade de la production**

La flore du lait cru est abondante et susceptible d'évoluer rapidement. Il faut donc abaisser sa température à moins de 10°C le plus rapidement possible, au mieux dans l'heure qui suit la traite. Le lait recueilli à la ferme par traite mécanique ou manuelle est soit directement transporté au centre de

ramassage où il est réfrigéré, soit stocké dans des réservoirs réfrigérés avant transport dans le cas d'exploitations importantes. Dans ces conditions, la flore microbienne est stabilisée. Le lait cru doit être toujours maintenu au froid. La durée de conservation de ce lait est courte en raison de la possibilité du développement des germes psychrotrophes et psychrophiles (quelques jours) (Guiraud et Galzy, 1980).

**Tableau n°5** : Germes contaminant le lait cru (Jakob et al, 2009).

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

#### **II.5.2.1.1 Contamination par l'animal**

Le lait renferme, lorsque l'animal est sous médication, des résidus d'antibiotiques qui sont à l'origine de perturbations importantes des processus de fermentation et de maturation des produits laitiers de large consommation tels que les yaourt, fromages et autres laits fermentés (Ben Mahdi et Ouslimani, 2009).

Ces laits anormaux doivent être séparés du lait sain et ne pas être utilisés pour la transformation.

Le canal du trayon est toujours contaminé, même chez un animal sain ; de ce fait, les premiers jets de lait obtenus lors de la traite doivent être éliminés. L'extérieur de la mamelle est toujours chargé en germes ; l'importance de la charge, qui est liée aux conditions de propreté de la stabulation, représente une source de contamination majeure du lait. Un nettoyage correct de la mamelle effectué avant la traite est donc indispensable pour obtenir un lait de bonne qualité microbiologique. Deux méthodes peuvent être conseillées pour y parvenir : - La première consiste à réaliser un nettoyage à sec du pis à l'aide de serviettes en papier ou en polyester et à usage unique ; - La seconde méthode consiste à laver la mamelle avec une solution désinfectante tiède (chlore : 500 mg/l - iode : 75 mg/l), puis à la sécher avec une serviette propre à usage multiple ou mieux à usage unique (Boudier et Luquet, 1978). La propreté des

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

#### **II.5.2.1.2 Contamination au cours de la traite**

C'est en surface des trayons que l'on retrouve la plus grande diversité de groupes microbiens : une douzaine de groupes microbiens parmi les flores utiles, flores d'altération et pathogène sont systématiquement détectés. Les groupes microbiens utiles (bactéries lactiques) sont fortement dominants, leurs niveaux étant au moins 100 fois supérieures à ceux des groupes d'altération ou pathogènes (staphylocoques à coagulase positive).

Dans le lactoduc et l'air du lieu de traite, la diversité microbienne est moindre puisque que seuls quelques groupes microbiens sont systématiquement présents. Les niveaux des flores d'altération sont alors du même ordre de grandeur que ceux des groupes utiles. Pour un même réservoir, des différences de niveaux et de composition microbienne existent et sont liées à la saison ; ainsi, en été, les surfaces des trayons abritent des niveaux moindres de tous les groupes microbiens ; par contre, dans les lactoducs, en été, on extrait des niveaux plus importants de *Pseudomonas* (germes d'altération). Pour une même saison, des différences de composition microbienne de ces réservoirs existent entre les exploitations : elles sont alors associées aux pratiques mises en œuvre. Ainsi, en hiver, le niveau et la composition de la charge microbienne présente en surface des trayons sont en lien avec la nature des litières et le confinement de l'ambiance (Lemire, 2007).

#### **II.5.2.1.3 Contamination au cours du transport**

La collecte et le transport se font grâce à des camions-citernes réfrigérés qui récoltent régulièrement le lait dans les fermes. Ils doivent respecter un certain nombre de règles légales afin de livrer un lait de bonne qualité, notamment par le maintien du lait au froid qui a pour but d'arrêter le développement des microorganismes. Il constitue un traitement de stabilisation (Weber, 1985). Une altération de la qualité au cours du transport par une mauvaise réfrigération, peut avoir un impact grave sur la qualité du lait et engendrer des pertes financières importantes (Jakob et *al*, 2011).

#### **II.5.2.2 Principales activités microbiennes dans le lait**

Les altérations du lait sont associées à la multiplication de levures, moisissures et bactéries. Cependant et compte tenu de leurs caractères écologiques, les contaminations bactériennes sont les plus fréquentes et les plus importantes et leurs potentialités de développement les plus à craindre. Ces processus de dégradation sont possibles, lorsque les conditions du milieu environnant sont favorables à la prolifération microbienne et à l'activité enzymatique. De graves défauts de goût et d'odeur peuvent apparaître par accumulation des produits issus, soit du métabolisme cellulaire, soit de l'action de systèmes enzymatiques complexes sur les constituants du lait. Le plus fréquemment, il s'agit de lait

acide, amer, fruité, rance, malté, à goût étranger (Kim et al, 1982). Les principales activités microbiennes sont regroupées dans le tableau n°5.

#### **II.5.2.2.1 Fermentation homolactique et hétérolactique avec acidification du lait**

Un tel processus conduit à la coagulation de la caséine et à la prise en masse du lait. Selon la température du lait et les bactéries impliquées, le phénomène de coagulation sera plus ou moins rapide : de 10°C à 37°C, le germe le plus fréquemment impliqué est *Streptococcus lactis* avec plus rarement association avec des coliformes, entérocoques, microcoques et lactobacilles. Au-dessus de 37°C, les germes en cause sont *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* et *Lactobacillus bulgaricus*. A des températures inférieures à 10°C, le processus est plus lent, la prise en masse nécessite un délai relativement important. Le caillot peut être dégradé dans une seconde étape par les espèces psychrotrophes protéolytique : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, microcoques (Guiraud et Galzy, 1980 ; Leyral et Vierling, 2007). Après pasteurisation, l'acidification est produite par des germes thermotolérants ou des sporulés ayant résisté comme les *Clostridium* et les *Bacillus*. Lorsque des bactéries lactiques hétérofermentaires interviennent, il y a en plus des acides organiques, de nombreux composés volatils variés (aldéhydes, cétones, alcools) (Guiraud, 2003). Ces composés, lorsqu'ils sont élaborés en quantité limitée, sont parfois recherchés, car ils contribuent à former le bouquet caractéristique de beaucoup de produits laitiers ; mais lorsqu'ils sont présents à forte concentration, ils engendrent des mauvais goûts et odeurs. Un exemple classique est donné par le diacétyle qui à l'état très dilué est responsable d'un goût de noisette et à l'état plus concentré se traduit par une amertume marquée (Kim et al, 1982).

#### **II.5.2.2.2 Protéolyse**

Au cours de leurs activités métaboliques, certains microorganismes, grâce à l'action de leurs protéases, dégradent des fractions protéiques du lait. Ce phénomène produit la libération de sous-produits très variés, dont des peptides à longue ou courte chaîne à l'origine des goûts amers, des saveurs non désirées et atypiques ou de textures inadéquates des fromages contaminés. Les germes incriminés sont *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* ainsi que d'autres germes de la flore banale à Gram négatif (Vignola, 2002 ; Guiraud, 2003).

Le genre *Pseudomonas*, avec comme espèce principale *P.fluorescens*, est dominant dans les laits conservés à basse température, les comportements des enzymes sécrétées sont loin d'être homogènes mais elles sont très thermorésistantes (Chilliard et Lamberet, 1984).

Dans d'autres cas, la protéolyse est recherchée, elle est contrôlée et joue un rôle primordial dans l'obtention d'une texture caractéristique et de saveurs désirées de divers types de fromage lors de l'affinage (Vignola, 2002).

L'activité protéolytique des bactéries lactiques en est le meilleur exemple, ces bactéries dotées d'un système protéolytique complexe comprenant des protéases situées à la surface cellulaire, et une large gamme de peptidases intracellulaires, qui lorsqu'elles sont libérées dans le caillé fromager participent efficacement à l'affinage du fromage (Roudj et al, 2009).

### **II.5.2.2.3 Lipolyse**

La lipolyse est une réaction enzymatique de dégradation de la matière grasse qui se traduit dans le lait par une augmentation de la teneur en acides gras libres. Au-delà de certains seuils, cette augmentation peut provoquer l'apparition de défauts de goûts (rance, savon...) dans les produits laitiers (Heuchel et al, 2003). Dans un lait cru réfrigéré, la flore dominante est représentée par les psychrotrophes. 70% ou plus de cette population possèdent une activité lipolytique. Cependant, elle n'est perceptible au goût qu'à partir des teneurs de 106 à 107 germes/ml, c'est-à-dire pour des laits crus considérés comme très pollués (Richard, 1983 ; Chilliard et Lamberet, 1984). L'activité lipolytique est exploitée dans la production du Brie, du Saint-paulin et de nombreux fromages à pâtes molles, elle est alors contrôlée (Vignola, 2002).

### **II.5.3 Contrôle de la qualité du lait destiné à la fabrication du fromage**

La qualité du lait est déterminée sur la base de six critères différents : le nombre de germes, le nombre de cellules somatiques, la présence de résidus d'antibiotiques ou de désinfectants, le point de congélation et la propreté visible. Le nombre de germes est utilisé pour mesurer la contamination par les bactéries. Le matériel de traite peut constituer une importante source de contamination. De même, le refroidissement insuffisant du lait entraîne une augmentation du nombre de germes. Les exigences pour ce critère varient selon le devenir du lait. Ainsi, ils seront plus sévères dans le cas de fabrication de fromage au lait cru que lorsqu'il y a pasteurisation.

Le nombre de cellules somatiques est un indicateur important de la santé du pis. Un lait chargé en cellules présente un taux de protéines solubles élevé, une faible teneur en caséine, une protéolyse et une lipolyse accrue. En conséquence, le rendement fromager est diminué et des difficultés de coagulation apparaissent. Pour le traitement des animaux malades, l'emploi de médicaments vétérinaires, notamment d'antibiotiques, peut s'avérer nécessaire. Il est, toutefois, strictement interdit de fournir du lait contenant des substances inhibitrices dépassant les normes légales. A cette fin, chaque livraison de lait est analysée quant à la présence de résidus d'antibiotiques. Les désinfectants sont nécessaires pour garder l'installation exempte de bactéries. Grâce à un rinçage à l'eau claire, les restes de ces produits sont éliminés. Si ce rinçage n'est pas effectué ou est insuffisant, des restes de ces produits peuvent aboutir dans le lait. Le point de congélation du lait indique la présence d'eau ajoutée dans le lait. Le plus souvent, c'est dû à la négligence dans le nettoyage de l'installation de traite, de sorte que de l'eau de rinçage se mélange au lait. Mais il peut être le résultat d'une fraude. La propreté visible est déterminée par le filtrage du lait à l'aide du matériel filtrant adéquat. Un filtre sale indique que le pis et son environnement sont insuffisamment propres.

La composition du lait est contrôlée par deux critères : la teneur en matière grasse et la teneur en protéines. La valeur économique du lait dépend surtout de ces composants. Ils constituent la base de la production de fromage, de yaourt, de beurre, de crème, etc. (Gabli, 2005 ; Michel, 2005 ; Cauty et Perreau, 2009). Ces six critères définissent les trois composantes de la qualité du lait (figure n°3) : - La qualité technologique, elle dépend de la composition chimique (TB, TP), de la qualité bactériologique

et de l'aptitude à la transformation ; - La qualité sanitaire, le lait doit provenir de vaches saines, ne présentant aucune trace d'antibiotiques, d'antiseptiques, ou de pesticides - La qualité gustative : bonne saveur, absence de goût désagréable, pas de rancissement (Cauty et Perreau, 2009).

#### **II.5.4 Contrôle bactériologique du lait cru**

L'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru consiste en la recherche des germes pathogènes, des germes utiles et des germes nuisibles à la conservation. Ces micro-organismes peuvent proliférer dans le lait qui constitue un excellent milieu de culture. Selon l'intérêt de l'étude, on oriente donc notre recherche. Dans ce cas précis, on s'intéresse aux germes pathogènes et aux germes indésirables qui génèrent des problèmes de transformation fromagère et qui peuvent être gênants pour le consommateur.

##### **II.5.4.1 Flore mésophile aérobie totale**

La flore mésophile aérobie totale est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banaux de contamination. Son dénombrement reflète la qualité microbiologique générale du lait cru et permet de suivre son évolution au cours de sa transformation. Ainsi le nombre de germes totaux pourra donner une indication de l'état de fraîcheur ou de décomposition (altération) du lait (Guiraud et Rosec, 2004). Des valeurs élevées n'indiquent pas nécessairement la présence de pathogènes, aussi des valeurs basses peuvent accompagner la présence de pathogènes à des niveaux dangereux (Sutra et *al*, 1998).

##### **II.5.4.2 Les germes responsables des défauts de fabrication**

Il s'agit principalement de psychrotrophes et de thermorésistants. Ces deux types de germes entraînent des défauts organoleptiques, des problèmes de protéolyse (dégradation des protéines) responsables de la baisse du rendement fromager et de la lipolyse.

###### **II.5.4.2.1 Flore psychrotrophe**

La conservation du lait au froid aboutit à une sélection des germes psychrotrophes capables de se multiplier à des températures égales ou inférieures à 7°C. Ces germes proviennent du sol, des eaux ou des fourrages.

Ils ne constituent pas un groupe taxonomique à part, mais, présentent quelques caractères en commun : aérobies, Gram négatif, non sporulés (Mocquot et Auclair, 1967 ; Thomas, 1973). Ces bactéries appartiennent à certains genres : *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*, *Ps. putrefaciens*...), *Alcaligenes* (*A. viscolactis*, *A. tolerans*...), *Flavobacterium* (*F. lactis*, *F. malodosis*), ainsi que des entérobactéries des genres *Enterobacter*, *Serratia* et *Hafnia*. Les espèces bactériennes Gram positif, sont moins fréquentes. On rencontre notamment des *Bacillus* et des *Clostridium* (Auclair, 1979). Les bactéries lactiques sont largement représentées au sein du groupe des psychrotrophes. Ce sont des bacilles ou des cocci à Gram positif, non sporulés, dépourvus de catalase, produisant de l'acide lactique selon un métabolisme homo ou hétéro-fermentaire. Les lactobacilles présentent une activité jusqu'à une température de +2°C (Bornert, 2000). Selon Schultz, (1958) cité par Dehkal, (1982), 90% des souches psychrotrophes sont, soit lipolytiques, soit protéolytiques, 60% possèdent ces deux caractères. Les protéases extracellulaires de ces bactéries sont, sans doute, les enzymes qui ont été les plus étudiées. Il s'agirait, pour la plupart,

de métalloprotéases (inhibition par des agents chélateurs). Elles résistent remarquablement à haute température. Cependant, certaines d'entre elles ont un minimum de stabilité au voisinage de 55°C (Auclair, 1979). Leur action peut se manifester dans le lait cru, car elles sont produites dès le début de la phase de croissance, elle est particulièrement importante à basse température. Chez *Ps. fluorescens*, par exemple, l'élaboration d'enzyme est six fois plus forte à 3°C qu'à 28°C (Lenoir et al, 1974 ; Auclair et Lenoir, 1980). Une activité lipasique extracellulaire a été trouvée dans la plupart des bactéries psychrotrophes, et des défauts des produits laitiers reliés à cette activité ont été reconnus. Il s'agit d'abord de la rancidité due à l'hydrolyse des triglycérides et à l'apparition d'acides gras libres et occasionnellement de défauts dus à la formation de composés carbonylés et d'autres produits volatils (Bourgeois et al, 1996). Certaines lipases sont inactivées entre 52,5°C et 57,5°C, mais les lipases de la plupart des bactéries psychrotrophes sont thermostables. Ainsi, l'enzyme de *Pseudomonas fragi* n'est complètement inactivée qu'après un chauffage de 100°C pendant 3mn, celle d'*Achromobacter lipoliticum* exige un traitement de 99°C durant 40 mn (Lenoir et al, 1974).

#### **II.5.4.2.2 Flore thermorésistante**

Un certain nombre de bactéries sont capables de résister aux traitements thermiques usuels utilisés dans le but d'assainir ou de conserver le lait. Elles sont dites thermorésistantes (Guiraud, 2003). Leur développement ultérieur peut altérer les produits et, parfois, être dangereux pour la santé. On distingue :

- La flore thermorésistante totale, définie comme la flore résiduelle après un traitement à 63°C pendant 30 minutes ou un traitement équivalent tel que la pasteurisation HTST (High Temperature Short Time) 72 °C pendant 15 secondes).
- La flore moyennement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 75°C pendant 12 secondes.
- La flore fortement thermorésistante, qui n'est pas détruite par chauffage à 80°C pendant 10 minutes. Elle comprend notamment des spores bactériennes, dont beaucoup nécessitent des températures supérieures à 100°C pour être inactivées (FAO, 1995). Les spores butyriques en sont un exemple. En effet, ils germent lors de l'affinage des fromages et provoquent des fermentations à l'origine de la formation de gaz (CO<sub>2</sub> et hydrogène) qui font gonfler, voire éclater certains fromages à pâte cuite (Cauty et Perreau, 2009). Cette flore est apportée dans le lait par le sol, les ensilages, les fèces et les résidus dus à l'insuffisance de nettoyage et de désinfection des matériels en contact avec le lait (Mourgues et al, 1983). Au même titre que les coliformes, elle est une bonne indicatrice de l'hygiène de la machine à traire (Institut de l'élevage, 2009). Mourgues et Auclair (1973), ont démontré qu'en l'absence de toute recontamination post-pasteurisation, la durée de conservation du lait pasteurisé est limitée par des bactéries provenant du lait cru, donc thermorésistantes.

#### **II.5.4.2.3 Les marqueurs ou bactéries témoins de contamination fécale**

Certaines bactéries ou groupes bactériens mis en évidence peuvent être considérés comme témoins de contamination d'origine fécale et indiquent la présence possible de germe pathogène (Sutra et al, 1998). Parmi eux, nous avons :

#### **II.5.4.2.3.1 Coliformes**

Les coliformes sont des entérobactéries (bacilles Gram-, asporulés, glucose+, oxydase-, nitrate réductase+, aérobies anaérobies facultatifs) qui fermentent le lactose avec production de gaz. Il s'agit d'un groupe disparate non défini sur le plan taxonomique qui comprend les genres *Escherichia* (avec espèces *coli*, *intermedium*, *freudii*), *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (Cuq, 2007). Leur développement est freiné par l'abaissement du pH et leur croissance stoppée lorsque le pH est inférieur à 4,5. Ils sont peu résistants à la chaleur (Le Minor et Richard, 1993). Les coliformes se répartissent en deux groupes distincts :

- les non fécaux dont l'origine est l'environnement général des vaches, ils sont détectés dès 30°C.
- les fécaux dont l'origine essentielle est le tube digestif, qui sont plus thermotolérants (détectés à 44°C).

*Escherichia coli* fait partie de ce dernier groupe. Dans le domaine de la microbiologie des denrées alimentaires, *E. coli* sert en général d'indicateur de contaminations fécales : elle se développe à une température de 44°C, et produit de l'indole. En fabrication fromagère, on rencontre les colibactéries surtout en tant qu'agent causal du défaut «mille trous». Ceci pouvant être dû soit à une contamination excessive du lait, soit à un stockage du lait à une température trop élevée ou encore à une mauvaise acidification due à la présence de substances inhibitrices (Jakob et Winkler, 2009). Le contrôle d'*E. Coli* s'effectue au cours du processus de fabrication. Pour les fromages à pâte mi-dure, le contrôle se fait dans le fromage avant saumurage. En ce qui concerne les fromages au lait cru ou partiellement thermisés, le contrôle s'effectue dans le fromage après saumurage et pour les fromages à pâte molle au lait thermisé ou pasteurisé, il se fait sur produit fini avant commercialisation (Jakob et al, 2009).

**II.5.4.2.3.2 Streptocoques fécaux** Les streptocoques fécaux (*Enterococcus* ou streptocoques du groupe D) sont des commensaux de l'intestin. *Enterococcus faecalis* et *E. faecium* sont les deux espèces le plus souvent identifiées chez l'humain (Clausen et al, 1977 ; Gleeson et Gray, 1997). Elles sont présentes dans les intestins d'environ 75 % des humains (Olivieri, 1982), à des concentrations variant de 10<sup>5</sup> à 10<sup>8</sup> bactéries/g (Gleeson et Gray, 1997 ; Edberg et al, 2000 ; Hancock et Gilmore, 2000). Quant aux streptocoques du groupe D susceptibles de contaminer le lait, ils sont plutôt typiques des déjections animales, comme *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus* (Clausen et al, 1977 ; Farrow et al, 1984 ; Bitton, 1999). Ces espèces colonisent les intestins du bétail, des chevaux et de la volaille bien qu'elles puissent parfois être présentes chez l'humain, en particulier *S. bovis* (Ruoff et al, 1989 ; Devriese et al, 1998). Leur détection témoigne, généralement d'une pollution fécale ancienne (Clausen et al, 1977). De toutes les bactéries non sporogènes, ces germes sont parmi ceux qui résistent le mieux à des conditions de milieu défavorables. Ils résistent mieux que les coliformes et *E.coli* à la réfrigération, à la congélation, au chauffage, à la salaison et à la dessiccation (Cuq, 2007) et sont, donc selon certains auteurs de meilleurs indicateurs de la qualité hygiénique du lait (Waes, 1973). Toutefois, ces germes sont moins souvent associés aux germes pathogènes que les coliformes fécaux. Ils ne renferment pas d'espèce considérée pathogène du point de vue alimentaire. Cependant, après

prolifération abondante dans l'aliment, ces germes peuvent être à l'origine de toxi infections bénignes qui sont, toutefois, exceptionnelles (Cuq, 2007).

#### **II.5.4.2.4 Flore pathogène**

L'origine des contaminations par les bactéries pathogènes varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait et des produits laitiers par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, et elle fait, alors, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux, personnel) (Brisabois et al, 1997). Parmi ces germes nous avons :

##### **II.5.4.2.4.1 Salmonelles**

Ces entérobactéries lactose-, H<sub>2</sub>S + sont essentiellement présentes dans l'intestin de l'homme et des animaux. Elles ne font pas partie de la flore commensale du tube digestif de leurs hôtes, mais le portage asymptomatique reste fréquent et représente la plus grande voie de dissémination des bactéries dans l'environnement et dans les aliments (Guy, 2006). Dans le genre *Salmonella*, plus de 2000 sérotypes ont été décrits, tous présumés pathogènes pour l'homme. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies facultatives, leur survie voire leur multiplication est possible dans un milieu privé d'oxygène. Elles se développent dans une gamme de température variant entre 4°C et 47°C, avec un optimum situé entre 35 et plus 40°C. Elles survivent aux basses températures et donc résistent à la réfrigération et à la congélation. En revanche, elles sont détruites par la pasteurisation (72°C pendant 15 secs). Elles sont capables de se multiplier dans une plage de pH de 5 à 9, mais sont sensibles à la fermentation lactique, lorsque celle-ci entraîne des concentrations en acide lactique supérieures à 1% et un pH inférieur à 4,55 (Jay, 2000 ; Guy, 2006). Les vaches laitières demeurent très sujettes aux salmonelloses essentiellement dues aux sérovars ubiquistes provoquant ainsi une diarrhée profuse, une anorexie et une chute importante de la quantité du lait (Brisabois et al, 1997). Les salmonelloses causées aux consommateurs par le lait et les produits dérivés sont évaluées à environ 15% (Cuq, 2007).

##### **II.5.4.2.4.2 Staphylocoques**

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococaccae*. Ce sont des coques à Gram positif de 0,5 à 2,5 µm de diamètre, non sporulés et immobiles. En fonction de leur capacité à coaguler le plasma de lapin : on distingue ainsi des espèces à coagulase positive et des espèces à coagulase négative. Parmi les staphylocoques coagulase positive, seules les souches productrices d'entérotoxine sont impliquées dans une intoxication alimentaire (Leyral et Vierling, 2007). *S.aureus* est un germe mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C, il est capable de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un pH optimal de croissance de 7,0 à 7,5. Comme beaucoup d'espèces de staphylocoques, *S.aureus* est un germe halotolérant, qui peut se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10%) (Cuq, 2007). Chez l'animal et plus particulièrement chez la vache, il est présent sur la peau de la mamelle et des trayons et a, donc, toute la possibilité de coloniser des blessures de trayons et l'intérieur de la

mamelle. On qualifie les staphylocoques de germes pathogènes à réservoir mammaire puisque les quartiers infectés, les plaies, les gerçures sont les principaux réservoirs et les germes sont transférés dans les trayons sains à l'occasion de la traite. Etant donné son habitat et sa fréquente mise en cause dans les mammites, la présence des staphylocoques dans le lait paraît quasi inévitable. L'éleveur devra s'attacher à réduire le niveau de contamination du lait par des pratiques qui visent à réduire le risque d'infection tant sur les trayons qu'à l'intérieur de la mamelle, à éviter toute dissémination des staphylocoques au sein du troupeau et à supprimer tout risque de multiplication au cours du stockage du lait à la ferme (Fatet, 2004). Si le lait cru reste la principale source de contamination des produits laitiers en staphylocoques, il faut préciser que ces germes sont détruits par la pasteurisation. Par contre, ils sont peu gênés par l'acidification des fromages pas plus que par des taux élevés de sel ; par conséquent, la plupart des fromages réunissent, durant les 24 premières heures de fabrication des conditions souvent favorables à la croissance des staphylocoques s'il y en a au départ (Fatet, 2004). Le pouvoir pathogène de certaines espèces de staphylocoques est dû à la production d'une enterotoxine, elle n'est détruite ni par la pasteurisation du lait, ni au cours de l'affinage des fromages. L'entérotoxine staphylococcique étant un métabolite secondaire, sa production nécessite une température minimale de 8-10°C, elle est synthétisée en fin de phase exponentielle et au cours de la phase stationnaire de croissance. Le nombre minimum de germes nécessaires à la production de suffisamment de toxine pour provoquer l'empoisonnement est évalué selon les auteurs à 5.10<sup>5</sup> ou 5.10<sup>6</sup> germes/g. Sur un plan pratique, la prévention contre les staphylocoques passe par une bonne prévention des mammites et une attention toute particulière aux trayons (Cuq, 2007).

### **II.5.5 Altération du lait**

Suivant le degré de dégradation des constituants du lait sous l'effet des microorganismes, on distingue quatre états bactériologiques du lait.

#### **II.5.5.1 Phase de latence (bactériostatique)**

Du fait des substances antibactériennes du lait et des bactériocines produits par les bactéries lactiques, les autres germes tendent à stagner ou à régresser. C'est une phase d'adaptation. Le lait peut alors se conserver pendant longtemps sous réfrigération. Toutefois, cette durée est réduite considérablement à une température élevée (Petrasxiene et Lapied, 1981).

#### **II.5.5.2 Phase d'acidification**

Durant cette phase, l'acidité ionique diminue et le degré Dornic augmente. La fermentation du lactose par les espèces du groupe lactique principalement, aboutit à la production d'acide lactique. Les streptocoques sont les premiers germes acidifiants intervenant par abaissement du pH et par augmentation de l'acidité, puis viennent les lactobacilles acidophiles qui, en proliférant, abaissent davantage le pH et entravent la croissance d'autres germes. Cette phase se poursuit jusqu'à la coagulation du lait par acidification (maximum pH 4,6) (Petrasxiene et Lapied, 1981).

### **II.5.5.3 Phase de neutralisation**

Les levures acidophiles jouent un rôle désacidifiant. Leur prolifération dans le lait, élève sensiblement le pH et entraîne la production d'alcool. C'est la phase de neutralisation. Elle correspond à une reprise d'activité des germes de putréfaction. Ce stade est à éviter si l'on veut conserver les qualités hygiéniques et marchandes du produit (Dieng, 2001).

### **II.5.5.4 Phase d'alcalinisation**

Elle est également dite de putréfaction et se traduit par une production d'hydrogène sulfuré, indice de dégradation systématique du lait, car il affecte aussi bien les caractères hygiéniques qu'organoleptiques (Petransxiene et Lapied, 1981).

## **II.6 Hygiène de la traite**

Le lait est une denrée fragile dont le devenir industriel (lait en nature, beurre, fromage) dépend de sa qualité. La production d'un lait de qualité n'exige ni des installations coûteuses dans la ferme, ni des transformations ruineuses dans le système commercial et industriel ; il faut surtout un suivi rigoureux et permanent des bonnes pratiques d'hygiène tout le long du circuit de sa production notamment à la traite (Crapelet et Thibier, 1973).

### **II.6 1 Trayeur**

- Bon état de santé : pour éviter la pollution du lait et la contagion de certaines maladies (tuberculose) à la vache
- Propreté : le vacher, avant de commencer à traire, doit se laver soigneusement les mains et les essuyer avec un linge propre.
- Tenue : le trayeur doit être habillé proprement et simplement. La meilleure tenue est le bleu de mécanicien ; le trayeur doit mettre un tablier blanc toujours propre et une calotte blanche cachant ses cheveux (Crapelet et Thibier, 1973).

### **II.6.2 Animal**

- Propreté générale : elle sera obtenue par une litière correcte, si nécessaire un pansage journalier évitant la présence de souillures voire de plaques d'excréments.
- Propreté de la mamelle : elle sera acquise par le passage sur le pis d'un linge propre trempé de solution légèrement antiseptique tiède ; cette dernière devra être renouvelée aussi souvent que nécessaire pour rester propre et remplir son rôle.
- Pour la traite en étable, la queue devra être attachée, pour éviter qu'elle ne souille le lait.
- Santé : on détectera précocement et systématiquement les maladies particulièrement dangereuses : tuberculose, mammites (Crapelet et Thibier, 1973).

## **II.7 Conservation du lait a la ferme**

La réfrigération du lait à la ferme, qui s'est généralisée en Europe vers les années 70, a constitué un grand progrès d'un point de vue hygiénique (le taux de contamination des laits collectés en bidons non réfrigérés dépassait souvent 106 germes/ml alors qu'il est, maintenant, inférieur à 50 000 germes/ml). Mais, la flore dominante n'est pas la même car le froid favorise le développement d'espèces

psychrotrophes qui peuvent générer des enzymes protéolytiques et lipolytiques susceptibles d'altérer la qualité et la stabilité des laits (Veisseyre, 1979).

Le froid peut également entraîner des perturbations de nature physico-chimique ou biochimique avec des conséquences sur la qualité technologique des laits (stabilité thermique, aptitude à la transformation en fromage). Les plus importants sont la solubilisation de la  $\beta$ -caséine, la solubilisation des sels minéraux, la tendance à la cristallisation de la matière grasse et l'altération de l'équilibre des bactéries dans le lait (Bennett *et al*, 2005). C'est pourquoi il est recommandé, pour certaines fabrications, de ne pas prolonger la réfrigération au-delà de 48 heures. De plus, cette évolution s'est traduite par un mélange de laits issus de plusieurs traites et provenant de plusieurs troupeaux, ce qui peut avoir un impact négatif pour les producteurs qui font des efforts de qualité (Académie des Technologies, Académie d'Agriculture de France, 2004). Ainsi et afin d'obtenir un lait cru de bonne qualité microbiologique, deux paramètres sont à considérer le premier étant de réduire au minimum la contamination initiale ; l'autre est représenté par le refroidissement à basse température ( $< 4^{\circ}\text{C}$ ), rapide du lait afin de ralentir le développement des microorganismes. C'est ainsi que l'on a souvent tendance à surestimer les avantages que présente l'utilisation du froid artificiel en oubliant que la qualité microbiologique du lait dépend avant tout des soins qui sont apportés au moment de sa récolte : le froid n'améliore pas la qualité microbiologique du lait, il ne fait que la conserver (Dieng, 2001).

### **II.8 Précepte**

Le lait de vache comme matière première dans la fabrication fromagère exige l'emploi d'un lait de haute qualité bactériologique et physico-chimique. Ainsi, dans les pays à grande tradition fromagère tel que la France, ce fromage est élaboré, soit directement à partir du lait cru, soit à partir du lait pasteurisé. Remeuf *et al*, en 1991 soulignent que la fromageabilité du lait c'est à dire l'aptitude à la transformation du lait en fromage est dépendante d'un certain nombre de paramètres dont :

- Sa composition chimique (richesse en caséines) ;
- Son comportement vis-à-vis de l'enzyme coagulante la présure ;
- Son aptitude au développement des bactéries lactiques (présence de résidus d'antibiotiques) ;
- Enfin, sa charge microbienne et la nature de sa microflore.

Parmi les nombreuses espèces et sous-espèces de staphylocoques, seules dix-huit espèces ont été retrouvées chez l'homme dont certaines sont associées à des infections. La majorité des espèces n'est retrouvée que chez l'animal. Les espèces de staphylocoques sont généralement classées en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre. Les staphylocoques à coagulase positive incluent les espèces généralement considérées comme pathogènes et les SCN regroupent des espèces réputés moins dangereuses voire des espèces utilisées en fermentation alimentaire, telles que *Staphylococcus xylosum* ou *Staphylococcus carnosus*.

*S. aureus* communément appelé le staphylocoque doré, est commensal de la peau et des muqueuses de l'Homme et des animaux à sang chaud. Par sa présence quasi-permanente au contact de l'hôte, *S. aureus* est donc aux premières loges pour provoquer des infections opportunistes allant de superficielles (par exemple, impetigo, furoncle) (Tan et al, 1998 ; Frazee et al, 2005 ; Yamasaki et al, 2005) à profondes (ostéomyélite, endocardite) (Davis, 2005 ; Murray, 2005) ou généralisées (septicémie) (Lowy, 1998). Ce large panel d'infections est la résultante d'un équipement riche, sophistiqué et très variable en termes de facteurs de virulence.

### III.1 Généralités

Du point de vue taxonomique, le genre *Staphylococcus sp.* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Les membres du genre *Staphylococcus sp.* possèdent un contenu en G+C compris entre 30 et 39 %, une paroi insensible à l'action du lysozyme contenant des acides teichoïques et un peptidoglycane caractérisé par la présence de ponts penta-glycines. Les staphylocoques sont des coques à Gram+, immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas plans de plusieurs éléments (en grec staphylo signifie grappe de raisin). Les cellules ont un diamètre moyen de 0,8 à 1 µm. La grande majorité des souches de *S. aureus* possède une capsule mais certaines souches peuvent perdre ce caractère après culture. *S. aureus* présente une bonne croissance sur les milieux de laboratoires usuels en 18 à 24 h à 37 °C, sous agitation. Les colonies de *S. aureus* sont lisses, rondes, d'un diamètre de 1 à 3 mm, arrondies, bombées, opaques, parfois colorées (pigment jaune à jaune-orange). Leur capacité de croissance en présence et absence d'oxygène atteste de leur métabolisme aéro-anaérobie facultatif. *S. aureus* est halotolérant (croissance sur des milieux à 7% NaCl voire au-delà) et ce caractère est utilisé pour son isolement et l'élaboration de milieux sélectifs (milieu Chapman).

### III.2 Variabilité génomique

Parmi les souches de *S. aureus* isolées de cas cliniques humains, vétérinaires ou alimentaires, on distingue une très grande variabilité de leurs facteurs de virulence et du pouvoir pathogène associé. En effet, les souches de *S. aureus* peuvent présenter un équipement génétique très variable incluant des déterminants géniques de résistance aux antibiotiques et divers facteurs de virulence acquis par transfert horizontal. A l'heure actuelle, 164 séquences de *S. aureus* sont disponibles correspondant essentiellement à des souches d'origine humaine, le plus souvent résistantes à la méticilline,

nosocomiales ou communautaires (Genomes Onlines Database, GOLD). Parmi les souches d'origine animale séquencées se trouvent deux souches d'origine bovine, RF122 (renommée ET3-1) et Newbould 305, cette dernière ayant été séquencée durant cette thèse (Herron-Olson et al, 2007 ; Bouchard et al, 2012). Le développement des méthodes de séquençage à haut débit a permis de caractériser la diversité intra-spécifique chez *S. aureus*. Celle-ci s'organise autour d'un ensemble de séquences très conservées au sein de l'espèce appelé le « génome cœur ». Ce noyau conservé est interrompu par des séquences dites variables composant le génome accessoire qui comprend entre autres les éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, îlots génomiques, îlots de pathogénicité...) (Chiapello et al, 2005). L'ensemble du « génome cœur » et des régions variables constitue le « pangéome » d'une espèce bactérienne.

L'analyse génomique de cinq souches représentatives de l'espèce *S. aureus* (Mu50, MW2, COL, RF122, MRSA) révèle que le génome central représente en moyenne 84 % du génome et, au sein de ce génome central, les séquences nucléotidiques présentent 98 % d'identité. Toutes les souches séquencées de *S. aureus* contiennent un seul chromosome dont la taille varie de 2,7 à 2,9 Mb (Gautier et Le Loir, 2010). Si la variabilité nucléotidique est faible, la variabilité génomique est importante. Elle est associée à la présence d'éléments génétiques mobiles (=EGM), très souvent porteurs de résistances aux antibiotiques et autres facteurs de virulence apportant un avantage sélectif à la population bactérienne (Novick et al, 2003 ; Fitzgerald et al, 2003). Cette plasticité génomique chez *S. aureus* est à mettre en relation avec une adaptation à l'hôte (Ben Zakour et al, 2008).

### c. Adaptation à l'hôte

*S. aureus* est une espèce plastique au niveau génomique. Elle tire de cette plasticité (ou variabilité génomique) son extraordinaire adaptabilité à divers environnements et à différents hôtes, ses capacités d'échappement aux défenses de l'hôte et sa capacité de résistance aux antibiotiques. Un grand nombre de facteurs de virulence ont été identifiés dans le génome de *S. aureus* permettant à cette espèce de provoquer des infections d'intensité et de symptômes très variés. Parmi les souches de *S. aureus* isolées, des études ont révélé que les caractéristiques phénotypiques varient en fonction de l'hôte d'origine. Ainsi, six biotypes ont été identifiés : humain,  $\alpha$ -hémolytique humain, bovin, ovin-caprin, aviaire-abattoir et non spécifique d'hôte (Devriese, 1984 ; Isigidi et al, 1990 ; Shimizu et al, 1991 ; Peton et Le Loir, 2013). Cette séparation des souches en six biotypes a par la suite été confirmée par l'identification de pulsotypes différents associés à chaque biotype (Hennekinne et al, 2003). Plus récemment, l'utilisation de la technique de Multi Locus Sequence Typing (=MLST) a révélé la prédominance de certains complexes clonaux en fonction de l'hôte. Par exemple, au sein des isolats associés au bétail, un faible nombre de clones a été identifié (Fitzgerald et al, 1997 ; Mc Carthy et al, 2009 ; Sakwinska et al, 2011). Les isolats issus de mammites bovines appartiennent à cinq complexes clonaux dont un, le Complex Clonal 705, spécifique à l'hôte bovin.

Guinane et al, (2010) ont montré par comparaison génomique que les souches associées aux ruminants sont issues d'une transmission de l'humain à l'animal, donnant naissance à des clones spécifiques aux ruminants par évolution adaptative (Guinane et al, 2010). L'obtention récente des séquences de souches isolées de ruminants (bovins et ovins) contribue grandement à clarifier les phénomènes d'adaptation à l'hôte (Bouchard et al, 2012 ; Le Maréchal et al, 2010; Herron-Olson et al, 2007). Ces analyses ont permis l'identification de séquences encore inconnues chez les souches humaines et portées, notamment, par des EGM (Herron-Olson et al, 2007). Parmi ces critères spécifiques d'hôtes présents sur les EGM, l' $\alpha$ -hémolysine et LukM/F'-PV sont majoritairement portés par des souches associées à des mammites gangréneuses (Le Maréchal et al, 2010 ; Rainard et al, 2003). La leucotoxine de Penton-Valentine (PVL) est un autre facteur de virulence d'origine phagique. Cette toxine est faiblement active sur les neutrophiles bovins alors que Luk M/F' est faiblement active sur les polynucléaires humains (Prévost et al, 1998). Par conséquent, au niveau génomique, il n'est pas étonnant de retrouver le gène codant pour la PVL dans le génome des souches humaines, alors qu'il est absent des souches de ruminants et inversement concernant Luk M/F' (Bouchard et al, 2012 ; Le Maréchal et al, 2010 ; Herron-Olson et al, 2007).

De nombreux autres facteurs peuvent refléter cette adaptation ou co-évolution entre l'hôte et le pathogène. Parmi eux, nous pouvons citer des gènes ou allèles phagiques comme « l'immune evasion complex » (IEC, portant les gènes *scn*, *chp*, *sak* et *sea*) mais aussi le « staphylococcal complement inhibitor » (SCIN) et le « chemotaxis inhibitory protein » of *S. aureus* (CHIPS) majoritairement associé à l'hôte humain (Van Wamel et al, 2006 ; Rooijackers et al, 2005 ; Collen et al, 1993). A l'inverse d'autres facteurs, comme l'adhésine codée par le gène *bap*, sont spécifiques des souches isolées de mammites (Le Loir et al, 2003 ; Smyth et al, 2005 ; Cucarella et al, 2004 ; Van Wamel et al, 2006).

De même, la majorité des souches isolées de mammites bovines sont productrices de sphingomyélinase alors que seule une minorité de souches isolées de septicémies ou de portage nasal sont positives à la  $\beta$ -toxine (Aarestrup et al, 1999). Ces observations reflètent l'adaptation évolutive du pathogène face à une pression sélective présente dans un environnement donné (Goerke et al, 2009 ; Fraunholz et Sinha, 2012).

### III.3 Problèmes sanitaires

*S. aureus* est une bactérie pathogène de l'Homme et des animaux, provoquant un large spectre d'infections. Chez l'homme, les pathologies associées à *S. aureus*, vont des infections suppuratives ou toxiques à de graves bactériémies. Parmi les pathologies toxiques liées à *S. aureus*, on peut citer le syndrome de choc toxique staphylococcique lié à l'action de toxines appartenant à la famille des super antigènes staphylococciques. *S. aureus* est aussi associé aux toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en raison de sa persistance dans les produits alimentaires et de sa capacité à sécréter des toxines (entérotoxines) (Le Loir et al, 2003). *S. aureus* appartient aussi aux bactéries majoritairement associées aux infections nosocomiales (19 %, dont 52 % résistants à la méticilline), avec *Escherichia coli* (25 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (10 %).

Dans le règne animal, *S. aureus* cause également un large éventail d'infections. On retrouve dans la littérature scientifique une implication de *S. aureus* dans les infections chez la vache, la chèvre, le mouton, le cochon, le cheval, le chat, le chien et l'oiseau allant de simples infections superficielles de la peau à des infections profondes du tractus uro-génital et mammaire (Peton et Le Loir, 2013)

Tableau 6 : Infections animales les plus communes causées par les staphylocoques à coagulase positive (d'après Peton et Le Loir, 2013)

Dans les élevages de ruminants, l'infection intra mammaire causée par *S. aureus* pose deux problèmes majeurs : son aspect contagieux et surtout sa capacité à s'implanter et persister au niveau du réservoir mammaire. La formation de ce réservoir mammaire passe bien sûr par la contamination de la mamelle, mais surtout par sa capacité à former des biofilms bactériens ou sa capacité à envahir les tissus de l'hôte (Cucarella et al, 2004 ; Atalla et al, 2010). Cette dernière propriété est de plus corrélée à la capacité de *S. aureus* à former des variants phénotypiques dit small colony variants qui constituent un état végétatif ou dormant de *S. aureus* lui assurant une survie intracellulaire. A la différence des autres pathogènes, cette capacité de persistance engendre une infection pouvant être chronique, où le pathogène ressurgit à la lactation suivante malgré l'application d'un traitement antibiotique au tarissement.

#### III.4 Origine de la contamination

La peau et les muqueuses des animaux à sang chaud constituent la niche écologique de *S. aureus*. Chez l'homme, les fosses nasales, le cuir chevelu et les mains sont les principales localisations (Kloos et al, 1976 ; Watson et al, 2006). Chez les ruminants et plus particulièrement chez la vache, *S. aureus* se retrouve majoritairement dans les naseaux et sur la peau des trayons (Roberson et al, 1994). Il est capable de survivre dans l'environnement direct de l'animal puisque de nombreuses espèces de staphylocoques peuvent être retrouvées dans l'air, dans la salle de traite, la litière et au niveau des lésions cutanées (Roberson et al, 1998 ; Vautor et al, 2003 ; Matos et al, 1991 ; Haveri et al, 2008).

#### III.5 Le cycle infectieux

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons au cycle infectieux de *S. aureus* dans la glande mammaire. Il est très difficile de localiser *S. aureus* lors de dissection de glandes infectées de façon chronique, même durant des infections expérimentales, ce qui complique la compréhension de la pathogénie en contexte mammite. Les seules observations faites à l'heure actuelle font état de légères excréctions du pathogène dans le lait et de son isolement à partir de macrophages ayant phagocyté le pathogène. Des lésions de l'épithélium peuvent aussi être observées sans toutefois y observer de colonisation bactérienne. Elles sont souvent associées alors au pouvoir cytotoxique des souches résultant de l'action des toxines sécrétées en amont.

Comme décrit dans le chapitre précédent, la première étape du processus infectieux est la contamination du trayon. Le franchissement du canal du trayon, même par un très petit nombre de bactéries, leur donne accès à la lumière de la glande et suffit à induire une infection mammaire (Poutrel et Lerondelle, 1978). Le canal du trayon est donc central dans la protection de la mamelle. Après l'entrée dans la lumière de

la glande mammaire, les staphylocoques vont avoir la capacité de se répliquer dans le milieu lait, malgré certaines conditions non favorables : pression partielle en oxygène faible, composés bactériostatiques. Les étapes suivant la multiplication intraciternale sont des étapes primordiales dans la survie et donc dans la persistance de *S. aureus* dans la mamelle.

### 1. Adhésion de *S. aureus* aux cellules du tissu mammaire

*S. aureus* a la capacité de coloniser les tissus de l'hôte en adhérant aux surfaces abiotiques (par ex. équipements médicaux ou de traite) ou directement aux cellules eucaryotes et aux composants de la matrice extracellulaire. En effet, *S. aureus* peut adhérer à l'épithélium ou l'endothélium de l'hôte via son affinité vis-à-vis de la fibronectine (Fn), du fibrinogène (Fg), de l'élastine, du collagène et du facteur de Von Willebrand (Heilmann C., 2011) (figure 9). Dans le contexte mammaire, plusieurs études *in vitro* ont démontré la capacité de *S. aureus* à adhérer aux cellules épithéliales mammaires (Opdebeeck et al, 1988 ; Almeida et al, 1996). Il a été montré que *S. aureus* possède un fort taux d'adhésion à de nombreuses lignées cellulaires (épithéliales, endothéliales, kératinocytes, macrophages) (Peacock et al., 1999 ; Lammers et al., 1999 ; Dziewanoswska et al, 1999 ; Kintarak et al., 2004 ; Hébert et al., 2000), mais que ce taux varie en fonction de la souche bactérienne sélectionnée et qu'il dépend aussi du fond génétique du donneur de la lignée cellulaire (Frost et al, 1977 ; Hensen et al., 2000). Cette étape d'adhésion, bien que clairement identifiée sur modèle cellulaire notamment par des études de microscopie, reste difficile à observer sur explants et encore plus sur des prélèvements de tissus infectés. La multitude d'adhésines présentes à la surface de *S. aureus* lui confèrent une forte capacité d'adhésion aux cellules ainsi qu'aux tissus conjonctifs de la matrice interstitielle.

### 2. Internalisation de *S. aureus* aux cellules du tissu mammaire

Suite à l'adhésion, il est probable qu'une partie au moins des staphylocoques soit internalisée au sein des cellules de l'hôte. En effet, la capacité d'internalisation de *S. aureus* dans une variété de cellules de l'hôte a en effet été démontrée. *S. aureus* est aujourd'hui reconnu comme pathogène potentiellement intracellulaire (Almeida et al, 1996 ; Kerro-Dego et al, 2002 ; Sinha et al, 2000 ; 2010 ; 2012). Des études de microscopie à transmission réalisées sur modèles cellulaires ont montré cette capacité de *S. aureus* à internaliser les cellules épithéliales mammaires notamment dans la lignée cellulaire bovine MAC-T où l'internalisation peut être massive (Almeida et al, 1996 ; Brouillette et al, 2003 ; Bayles et al, 1998). Des *S. aureus* isolés de mammites peuvent donc envahir les cellules en culture, et leur taux d'internalisation est généralement corrélé au taux initial d'adhésion (Hensen et al, 2000). A l'heure actuelle, l'internalisation reste cependant controversée dans le cas des mammites car non observée *in vivo*. Les mécanismes mis en jeu lors de l'internalisation de *S. aureus* sont aujourd'hui intensément étudiés et de mieux en mieux caractérisés essentiellement sur modèle cellulaire. La pénétration de *S. aureus* dans les cellules épithéliales mammaires fait intervenir un mécanisme de type zipper, processus d'interaction entre des protéines bactériennes et cellulaires conduisant à la formation de pseudopodes invaginant la bactérie adhérente (Ogawa et al, 1985 ; Almeida et al, 1996 ; Bayles et al, 1998).

L'internalisation de *S. aureus* passe par un mécanisme d'endocytose faisant appel à des récepteurs spécifiques. En effet, les protéines fixant la fibronectine semblent nécessaires (mais pas indispensables) à l'adhésion et elles sont par contre indispensables à l'internalisation (Lammers et al, 1999 ; Sinha and Fraunholz, 2010 ; Fraunholz and Sinha, 2012). Il a clairement été démontré que des souches mutantes de *S. aureus*, délitées de leurs protéines de liaison à la fibronectine (Fnb A et B) perdent la capacité d'internaliser dans les cellules épithéliales mammaires. Les protéines de liaison à la fibronectine de *S. aureus* permettent d'interagir avec la fibronectine cellulaire présente dans le milieu extracellulaire. Cette interaction primaire entre le pathogène et la fibronectine permet à *S. aureus* d'être en interaction avec des récepteurs spécifiques de l'hôte. Ces récepteurs cellulaires sont des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  présentes à la surface de la majorité des cellules eucaryotes. Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  sont des points focaux permettant l'ancrage du cytosquelette cellulaire. En effet, les intégrines sont directement reliées au réseau d'actine participant à l'architecture cellulaire. Cette interaction secondaire entre *S. aureus* – Fibronectine – Intégrines  $\alpha 5\beta 1$  entraîne, par une cascade de signalisation, un remaniement de l'architecture cellulaire conduisant à la formation de pseudopodes et donc à l'invagination par endocytose du pathogène (Sinha and Fraunholz, 2010 ; Fraunholz and Sinha, 2012).

### 3. Vie intracellulaire de *S. aureus* et persistance intramammaire

Le devenir de *S. aureus* et de la cellule infectée va dépendre de la souche impliquée (Krut et al, 2003), mais aussi de la susceptibilité des cellules de l'hôte aux différents facteurs de virulence. La capacité de survie au sein des cellules de l'hôte après son internalisation représente une évolution similaire à celle des pathogènes intracellulaires, favorisant la persistance du pathogène et conférant un aspect chronique à l'infection.

#### a) Effet cytopathique

Des études récentes ont montré que l'invasion de cellules épithéliales (MAC-T et HeLa) par des souches de *S. aureus* d'origine humaine ou animale avait des répercussions sur le cycle cellulaire de la cellule hôte. En effet, l'invasion par *S. aureus* ralentit la prolifération cellulaire et induit un effet cytopathique (Alekseeva et al, 2013). Les auteurs révèlent qu'une viabilité bactérienne semble nécessaire à l'effet cytopathique qui se manifeste par une transition entre la phase G2 et M plus longue. Ce retard semble favoriser la réplication de *S. aureus*, et donc sa propagation au sein de l'hôte (Alekseeva et al, 2013).

#### b) Persistance intracellulaire et « Small Colony Variant »

Une fois internalisées, toutes les bactéries ne vont pas être dégradées sous l'action phagolysosomale mais pourront survivre pour de longues périodes au sein de différentes lignées cellulaires (Lowy et al, 1988 ; Vann et Proctor, 1988 ; Garzoni et al, 2007 ; Tuchscher et al, 2011 ; Sendi et Proctor, 2009).

Dans de nombreux cas et notamment lors de mammites, la persistance des infections est attribuable à la formation de « Small Colony Variant » (=SCV) (Atalla et al, 2010 ; Proctor et al, 1994, Garzoni et al, 2007). Les SCV apparaissent spontanément dans la population de *S. aureus* internalisée et présentent des caractéristiques différentes de la souche parentale : croissance lente, absence de pigmentation, non

hémolytique (Proctor et al, 1994). Les études génomiques réalisées sur les SCV révèlent que dans beaucoup de cas, une mutation dans le locus « agr », un des régulateurs majeurs de la virulence, entraîne une défaillance dans la production de facteurs de virulence sous contrôle du quorum-sensing (Sendi et Proctor, 2009). Outre une virulence atténuée, le phénotype SCV confère une paroi plus épaisse (Bulger et Bulger, 1967) et une surexpression du facteur sigma alternatif  $\sigma_B$ , permettant une meilleure résistance face aux stress environnementaux (Moisan et al, 2006 ; Horsburgh et al, 2002).

Ces observations confirment le fait que *S. aureus* persiste dans les cellules de l'hôte sous la forme de SCV et participe à la formation de réservoir pour des infections récurrentes (Proctor et al, 1995 ; Sendi et Proctor, 2009). Tel un cheval de Troie, dans le cas des mammites, la pathogénicité des SCV est liée à sa capacité à résister aux défenses de l'hôte et aux traitements antibiotiques avec une tendance à reverser vers le phénotype sauvage lorsque les conditions redeviennent favorables, conduisant à la chronicité de l'infection (Proctor et al, 1995 ; Atalla et al, 2008 ; 2010). Atalla et al en 2008 ont ainsi identifié dans leur campagne d'échantillonnage que 50 % des souches de *S. aureus* isolées de mammites chroniques présentent un phénotype SCV.

#### c) Induction de la mort cellulaire

Outre cette capacité de persistance sous forme de SCV, *S. aureus* peut sortir de l'endosome sous l'action notamment de l' $\alpha$ -toxine. Une fois dans le cytoplasme, il peut se répliquer et induire la mort de la cellule infectée pour ensuite se disséminer vers les tissus sous-jacents (Qazi et al, 2001 ; Bayles et al, 1998). Certaines études montrent que la mort cellulaire induite par *S. aureus* est complexe et multifactorielle, mais qu'elle fait majoritairement intervenir un mécanisme caspase-dépendant sous l'action de l' $\alpha$ -toxine et d'autres toxines hémolytiques (Imre et al, 2012 ; Fraunholz et Sinha, 2012 ; Liang et al, 2007 ; 2011). Haslinger-Löffler et al en 2005 identifient que la localisation intracellulaire de *S. aureus* est indispensable à l'induction de la mort cellulaire (Haslinger-Löffler et al, 2005). Les facteurs de virulence requis pour induire une mort apoptotique semblent être sous dépendance de « agr » et du facteur sigma alternatif  $\sigma_B$  (Weeson et al, 1998 ; Qazi et al, 2001 ; Kubica et al, 2008). Cependant *S. aureus* ne semble pas induire un seul type de mort cellulaire, et celle-ci semble dépendante de la souche, de la multiplicité d'infection et du stade de croissance de la souche étudiée (Schwartz et al, 2009 ; Pang et al, 2010 ; Fraunholz et Sinha, 2012). Malgré l'ensemble de ces connaissances, la pathogénèse de *S. aureus* et sa capacité de persistance sous forme de SCV dans les cellules épithéliales mammaires restent mal comprises, notamment par absence de preuve *in vivo*.

#### d) Formation de biofilm dans la glande mammaire

En 2006, Anaya-Lopez et al ont identifié que certaines souches de *S. aureus* isolées de mammites chroniques n'étaient pas capables d'envahir les cellules épithéliales mammaires en culture et en ont conclu que ce critère n'était pas indispensable à la chronicité d'une mammite (Anaya-Lopez et al, 2006). Cependant la découverte des « Small Colony Variant » apporte tout de même une explication cohérente de la persistance et de la chronicité (Anaya-Lopez et al, 2006). Il est tout de même établi que d'autres

critères, à la fois bactériens mais aussi propres à l'hôte, participent à la persistance et au phénomène de chronicité. Parmi ces différents critères, on peut citer le fond génétique de l'hôte pouvant conditionner l'infection bactérienne, mais aussi de nombreux facteurs bactériens. Parmi les propriétés bactériennes, la capacité de *S. aureus* à former des biofilms est souvent citée pour expliquer une capacité de résistance accrue et une persistance. A une phase plus tardive du processus infectieux, *S. aureus* pourrait en effet développer un biofilm. Selon une étude réalisée en 2004, la possession des deux principaux loci, « *ica* » et « *bap* » permettant la formation de biofilm serait associée à une propension à induire une mammite moins sévère mais plus persistante et résistante aux traitements antibiotiques. De plus, de nombreuses souches isolées de mammites sont porteuses des deux loci impliqués dans la formation des biofilms (Cucarella et al, 2004).

Les bactéries environnementales vivent dans l'environnement de la vache (fumier, sol, litière, plantes, eau et la peau de la vache) et se multiplient. Leur élimination est très difficile. Ces bactéries sont souvent considérées comme « opportunistes » c'est-à-dire qu'elles tirent avantage d'une situation qui rend la glande mammaire susceptible à l'infection ce qui favorise une contamination environnementale. Une grande proportion des infections surviennent dans les deux semaines suivant le tarissement et dans les deux semaines qui précèdent le vêlage lorsque le système de défense naturelle de la vache est plus faible. Une mauvaise désinfection des trayons ou l'utilisation d'une canule sale lors d'une infusion intra mammaire est souvent la cause de l'infection. L'absence du bouchon de kératine accroît également le risque d'infection.

Durant la lactation, le risque est plus grand juste après le vêlage. Les bactéries environnementales contaminent le bout des trayons entre les traites puis infectent les quartiers par le reflux de lait engendré par la traite (mauvais ajustement - sifflement) – on parle alors d'un mode de contamination par propulsion. Ces bactéries causent généralement des mammites cliniques – lait anormal, enflure, rougeur, chaleur du quartier infecté et peu ou pas de fièvre. Les principales bactéries environnementales sont les coliformes tels *qu'Escherichia coli* et *Klebsiella spp.* et les streptocoques en général tels que *Streptococcus uberis* et *Streptococcus dysgalactiae*.

#### **IV.1. Caractères bactériologiques d'*Escherichia coli***

*Escherichia coli* est un membre de la famille des Enterobacteriaceae. Les principaux pathotypes chez les animaux de consommation sont les *E. coli* entéro-toxinogène (ETEC) ; *E. coli* entéro-pathogène (EPEC); *E. coli* producteur de toxine Shiga (STEC) ou verotoxinogène (VTEC); et *E. coli* extra-intestinaux (ExPEC) (Fairbrother et Nadeau, 2010).

#### **IV.2. Infection à coliformes**

Les mammites à coliformes sont une cause majeure (30 à 50 %) de maladie au niveau des élevages performants de vaches laitières (Morin, 2009). Les coliformes sont présents dans les fèces et sont des agents ubiquistes dans la ferme laitière. *Escherichia coli* est le coliforme le plus souvent isolé lors de mammite. Une mammite à *E. coli* peut survenir chez n'importe quel mammifère, mais elle est plus fréquente chez les bovins. De plus, cette maladie est plus fréquemment rencontrée chez les vaches qui sont de fortes productrices, qui ont un comptage de cellules somatiques faible et qui sont dans les deux semaines suite à la mise bas. De plus, le risque d'infection mammaire par cet agent augmente avec le nombre de parités (Fairbrother et Nadeau, 2010).

##### **IV.2.1 Mammite à *Escherichia coli***

###### **IV.2.1.1 Voies de transmission**

En ce qui concernant la mammite à *E. coli*, la source d'infection la plus commune est la matière fécale présente dans l'environnement des vaches. La litière organique telle que la paille, les sciures et copeaux

de bois supporte bien la croissance du *E. coli*, surtout lorsque la température est élevée et lorsque la litière est humide (Morin, 2009). Ceci favorise donc la contamination du canal du trayon et augmente l'incidence de la mammite. Quelques études antérieures démontrent que certaines souches d'*E. Coli* provoquant des mammites auraient des caractéristiques semblables à celles des agents de mammite contagieuse. Ces caractéristiques sont la persistance au sein de la glande mammaire, l'apparition de mammites récurrentes dans le même quartier avec un *E. coli* possédant le même génotype et la transmission de l'infection d'un quartier à l'autre (Bradley et Green, 2001).

#### IV.2.1.2 Prévalence

Avec l'emploi de la désinfection du trayon lors de la traite et des antibiotiques au tarissement, l'incidence des cas de mammites contagieuses a diminué, mais les mammites à *E. coli* sont devenues la cause la plus fréquente de mammite en début de lactation (Hill, 1994). L'incidence des mammites dues à *E. coli* varie d'un pays à l'autre, se situant généralement entre 2 et 15%. Par contre, une incidence plus élevée, atteignant 50% a été rapportée dans certains pays (Fairbrother et Nadeau, 2010).

#### IV.2.1.3 Pathogénie

La majorité des infections intramammaires à *E. coli* ont lieu au début ou à la fin du tarissement (Smith et al. 1985 ; Blum et al. 2000). Elles demeurent subcliniques jusqu'au moment de la parturition. Plus souvent, la maladie est rencontrée chez les vaches fortes productrices, durant les deux semaines suivant la parturition et chez les vaches qui ont un comptage de cellules somatiques bas (Gyles et Fairbrother, 2010). Les *E. coli* causant les mammites cliniques à coliformes sont des agents pathogènes opportunistes de l'environnement et il ne semble pas y avoir une association entre le sérotype, le génotype ou les facteurs de virulence présents et la sévérité de la maladie (Wenz et al, 2006). La résistance au sérum est considérée comme étant le seul point en commun entre les différents isolats d'*E. Coli*, mais, même pour ceci, la fréquence rapportée varie entre 59 et 99,5 % (Blum et al, 2008). Entrée dans la glande mammaire La mammite se développe lorsque le canal du trayon de la vache est exposé aux matières fécales ou à un environnement contaminé. Plus souvent, ceci a lieu après la traite, lorsque le canal du trayon est toujours ouvert. Suite au contact direct avec l'environnement contaminé, *E. coli* pénètre au niveau du trayon et s'installe dans le canal et dans les sinus lactifères. L'intensité de la réponse de l'hôte déterminera l'apparition des signes cliniques (Fairbrother et Nadeau, 2010). Multiplication dans la glande mammaire L'adhésion de l'*E. Coli* au niveau de l'épithélium de la glande mammaire n'a pas un rôle important pour la pathogénie de la maladie. Les coliformes ne semblent pas coloniser la glande mammaire, mais plutôt se multiplier dans les sécrétions sans attachement au niveau des cellules de surface (Morin, 2009). Le métabolisme des coliformes doit s'adapter rapidement afin que ceux-ci se multiplient et causent la maladie. Ainsi, la sévérité de la mammite est directement proportionnelle au comptage bactérien dans les sécrétions mammaires (Hogan et Larry Smith, 2003). Deux facteurs de virulences sont importants pour les coliformes à ce stade de l'infection ; la capacité d'utiliser le lactose

comme source d'énergie et la capacité de se multiplier dans des conditions de quasi anaérobiose. Le lactose est le principal carbohydrate dans le lait et l'oxygène est présent en très petite quantité. La réponse de l'hôte face à la présence d'*E. Coli* dans la glande mammaire dépend du stade de la lactation. Les sécrétions provenant d'une glande mammaire tarie ne supportent pas la croissance et la multiplication des coliformes. À ce stade, c'est la faible quantité de fer qui est le facteur limitant. Lors du tarissement, les lactoferrines, agents chélateurs du fer, augmentent, et ce, jusqu'au début de la production du colostrum (Hogan et Larry Smith, 2003). Par contre, en période de parturition ou durant les premières semaines de la lactation, les vaches sont plus susceptibles à développer des signes cliniques plus marqués suite à la multiplication de l'*E. Coli* dans la glande mammaire. Ceci est dû au fait que les vaches sont immuno supprimées et que l'appel des neutrophiles est moins efficace ou que les mécanismes de phagocytose et de mort intracellulaire des bactéries sont fragilisés (Smith, 2009).

Réponse de l'hôte Les neutrophiles sont les cellules les plus importantes pour la défense de l'hôte face à une infection à *E. coli*. Il est essentiel que ces cellules arrivent rapidement au niveau de la lumière de la glande mammaire afin d'avoir une efficacité totale. Ainsi, lorsque la période de lactation est bien établie, les infections mammaires à *E. coli* sont accompagnées d'un minimum de signes cliniques systémiques tels que la fièvre et d'une diminution temporaire de la production laitière. Les signes cliniques sont modérés et la vache guérie par elle-même. Dans cette situation, la réponse inflammatoire est considérée comme étant physiologique à 100 % (Burvenich et al, 2003). Durant la période de parturition ou en début de lactation, plusieurs facteurs permettent au *E. coli* de se multiplier en grande quantité. Les facteurs les mieux connus sont la faible concentration de lactoferrines dans le lait, une réponse tardive des leucocytes polynucléaires, une diminution au niveau de la tension d'oxygène due à la multiplication bactérienne. Ceci engendre ainsi une diminution de l'efficacité de la destruction des *E. coli* dans les phagolysosomes et une transition rapide vers la présence d'une population leucocytes mononucléaires dans la glande mammaire remplaçant les polynucléaires plus efficaces (Fairbrother et Nadeau, 2010). Les *E. coli* se multiplient et meurent dans la glande mammaire libérant ainsi les LPS (endotoxine) de la membrane cellulaire externe. La liaison des LPS avec les cellules de l'hôte initie la production de TNF- $\alpha$  par celles-ci. Le TNF- $\alpha$  est responsable de l'enclenchement de la cascade de l'inflammation qui est causé lors de l'apparition des signes cliniques locaux et systémiques (Hoeben et al, 2000 ; Blum et al, 2000). Les prostaglandines, IL-1, IL-6, IL-8, C5a et l'oxyde nitrique sont d'autres éléments importants dans la réponse inflammatoire (Morin, 2009). Malgré le fait que la concentration de LPS dans le lait soit élevée, celle-ci n'est pas détectable ou très faible dans le plasma (Dosogne et al, 2002). La production des médiateurs de l'inflammation au niveau de la glande mammaire est responsable de l'appel des neutrophiles. Lorsque l'appel de ceux-ci se fait de façon efficace et rapide, les bactéries sont phagocytées et détruites. Si l'appel n'est pas efficace, les bactéries se multiplient et les signes cliniques de mammites apparaissent. La majorité des mammites à *E. coli* produisent des signes cliniques locaux, mais un peu moins de 10 % des cas seront systémiques ou seront accompagnés d'une diminution marquée de production laitière (Smith et al, 1985 ; Bradley et Green, 2000). Évasion de la

défense cellulaire La capacité d'évasion du système immunitaire, plus précisément des neutrophiles, est un facteur de survie important pour les coliformes. La charge bactérienne dans la glande mammaire et la sévérité de la maladie dépendent de la rapidité et de l'efficacité de la réponse des neutrophiles. La susceptibilité d'un coliforme face à la phagocytose dépend de la variabilité au niveau des antigènes de surface exposés. Ainsi, les *E. coli* ayant la capacité de produire une capsule auront plus tendance à engendrer des infections intramammaires de plus longue durée que les souches d'*E. Coli* non capsulées. De plus, la présence de composantes cellulaires autres que la capsule peut avoir un effet sur la phagocytose. Certains *E. coli*, faisant parti des sérogroupes O8 et O9, possèdent des facteurs antiphagocytique qui ne sont pas associés à la capsule. Plusieurs *E. coli* ont la capacité d'exprimer des cytotoxines et des hémolysines, mais la production d'exotoxines ne semble pas être un point critique afin de faciliter l'évasion du système de défense de l'hôte (Hogan et Larry Smith, 2003).

Sensibilité au sérum La résistance face à l'activité bactéricide du sérum est un facteur de virulence commun à plusieurs coliformes en cause lors de mammite. Par contre, ceci n'est pas un prérequis pour la maladie. L'activité bactéricide du sérum est possible grâce au complément. De plus, l'activité du complément est plus importante dans les sécrétions d'une glande mammaire en involution que dans le lait produit en période de lactation. Par contre, la résistance face au sérum ne varie pas chez les coliformes, qu'ils soient prélevés durant le tarissement ou durant la période de lactation. De plus, le pourcentage de coliformes sensibles au sérum en provenance de cas d'infection intra mammaire est similaire au pourcentage de coliformes sensibles présents dans l'environnement de vaches. Ainsi, les coliformes résistants au sérum n'ont pas d'avantage par rapport aux coliformes sensibles au sérum en ce qui concerne les infections intra mammaires (Hogan et Larry Smith, 2003).

---

# Etude expérimentale

**I.1 L'objectif du travail**

Les vaches apportées à l'abattoir étaient accompagnées d'un certificat d'abattage pour diverses raisons, mais les vaches sélectionnées pour la réalisation de notre étude souffraient d'une baisse de la production de lait due à la mammite. Il convient de noter que notre lot d'échantillonnage ne présentait aucun signe clinique, la forme pathologique était subclinique.

Des examens physiques et cliniques ont été effectués avant l'abattage des vaches. La forme clinique de la mastite a été détectée par la présence de signes d'inflammation (rougeur, chaleur et douleur). La mastite subclinique a été diagnostiquée par C.M.T. (Test de mastite en Californie).

101 échantillons de glandes mammaires de vaches laitières ont subi des coupes histologiques pour mettre en évidence les dommages potentiels aux tissus dus aux mastites.

Ces échantillons prélevés immédiatement après l'abattage ont été conservés dans des pots contenant du formol à dix pour cent (10%), puis ils ont été transportés vers le laboratoire de pathologie.

Des analyses bactériologiques étaient effectuées du lait cru des vaches qui présentait un CMT positif, donc atteintes de mammites subcliniques.

L'identification est faite au niveau de l'unité de bactériologie du laboratoire de Giplait de Sidi Bel Abbes, au niveau du laboratoire médical du CHU de Sidi Bel Abbes et au niveau de laboratoire de microbiologie appliquée de la faculté de science de la nature de l'université de Sidi Bel Abbes.

**I.2 Matériel :****I.2.1 Matériel biologique :**

Les produits biologiques sur lequel est effectuée notre étude sont :

- ✓ Le lait cru de vaches atteintes de mammites subclinique ;
- ✓ Les glandes mammaires;
- ✓ Le miel de type multi floral de la région de Sidi Bel Abbés.

**I.2.2 Matériel non biologique :**

Il est représenté par les appareillages de la microbiologie (bec benzène, agitateur, étuve, spectrophotomètre...), Microtome (pour effectuer des coupes), la verrerie, les réactifs, les milieux de cultures et les disques d'antibiotiques utilisés.

**I.3 Les méthodes :****I.3.1 Première partie :**

Test du CMT suivie d'un prélèvement pour identifier les germes à partir du lait cru des vaches atteintes de mammites subclinique (ayant des CMT positif)

**I.3.2 Deuxième partie :**

Isolement de deux bactéries pathogènes « *Staphylococcus aureus* » et « *Escherichia coli* » à partir du lait cru des vaches atteintes de mammites subclinique.

**I.3.3 Troisième partie :**

Etude de l'activité antibactérienne du miel sur deux bactéries isolées et identifier à partir du lait cru des vaches qui ont présenté un test positif du CMT : « *Staphylococcus aureus* » et « *Escherichia coli* ».

**I.3.4 Quatrième partie :**

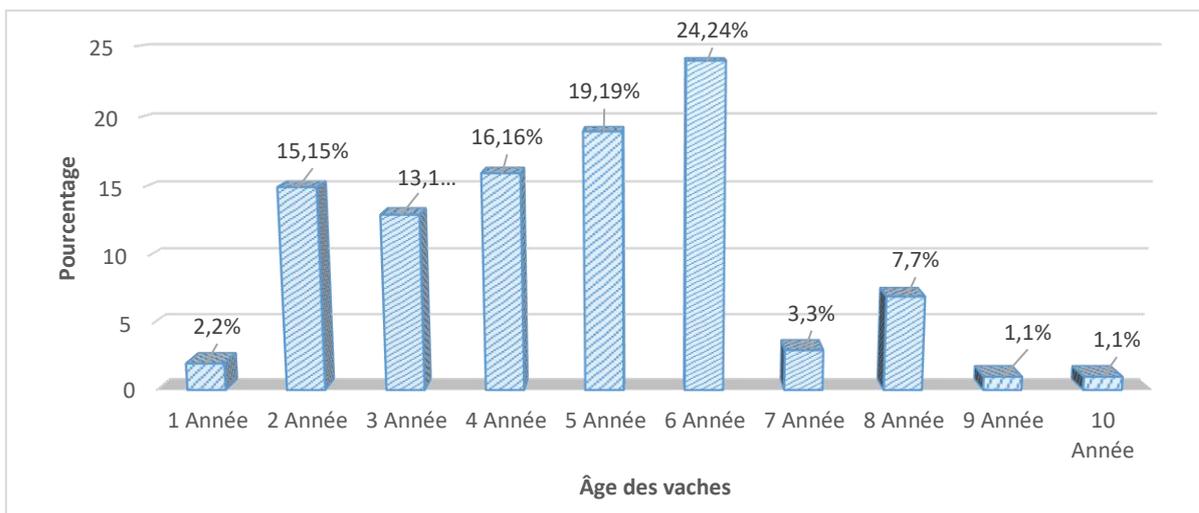
101 échantillons de glandes mammaires de vaches laitières ont subi des coupes histologiques pour mettre en évidence les dommages potentiels aux tissus dus aux mastites. Ces échantillons prélevés immédiatement après l'abattage ont été conservés dans des pots contenant du formol à dix pour cent (10%), puis ils ont été transportés vers le laboratoire de pathologie.

- ❖ Méthode de travail (test CMT, l'identification et isolement des germes, antibiogramme et coupes histologiques (**Voir annexe**)).

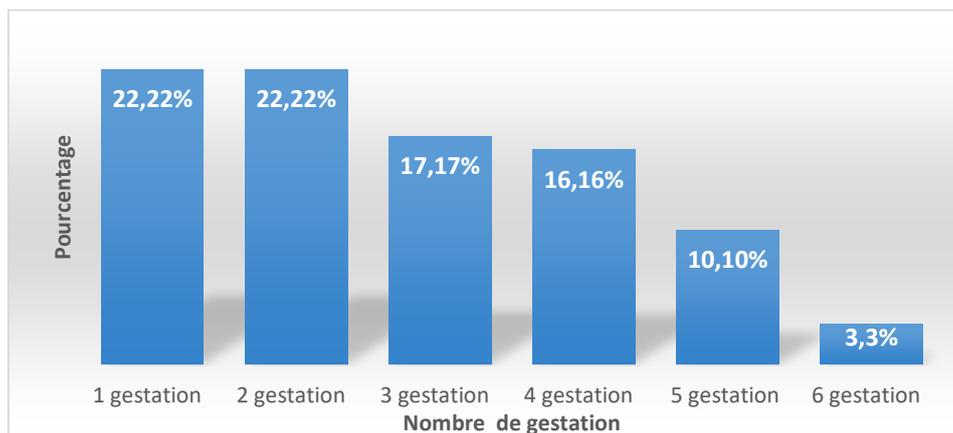
**II.1 Caractéristiques descriptives des vaches atteintes de mammites**

Nos échantillons étaient des vaches laitières (101 vaches) atteintes de mammites destinées à l’abatage.

Nous avons réparti ces vaches selon leur âge, le nombre de gestation, leur race ainsi que le type de traite. Alors nous avons remarqué que le nombre le plus élevé de mammites était enregistré chez les vaches ayant 2 à 6 ans (Fig.4). Les mammites sont plus élevées aussi chez les uni-gestes par rapport au multi-geste, plus le nombre de gestation augmente, le nombre de mammites diminue (Fig. 5). Nous avons remarqué aussi que les races les plus susceptibles aux mammites sont la Pie noir et la race croisée (race importé avec la race locale) (Fig. 6).



**Figure 4 :** Répartition des vaches atteintes selon leur âge.



**Figure 5 :** Répartition des vaches atteintes selon le nombre de gestation

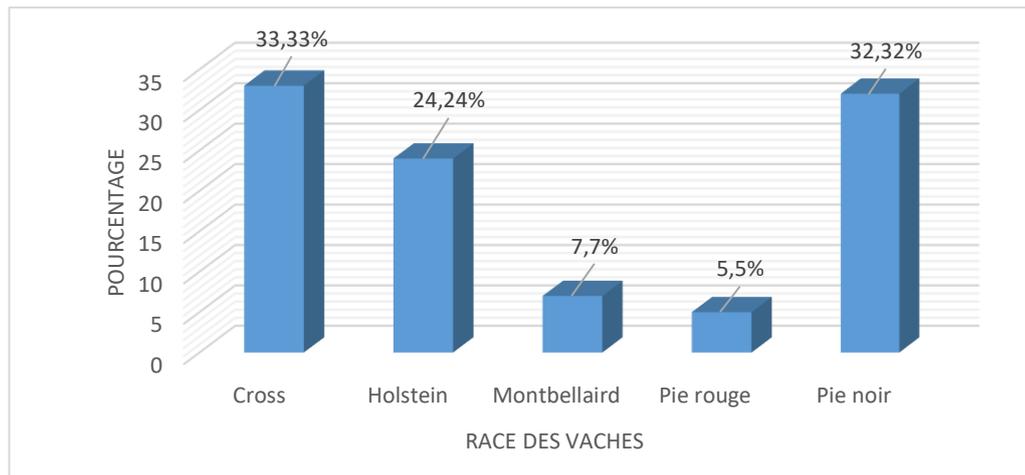


Figure 6 : Répartition des vaches atteintes selon la race.

## II. 2 Description de la propagation de l'infection chez des vaches atteintes de mammites selon le mode de traite

Nous avons constaté après avoir réalisé les examens anti mortem et post mortem que l'infection était plus importante chez les vaches qui subissaient la traite manuelle (32 % saines et 68% affecté), parmi les vaches affectées, chez 16% l'infection touché un seul trayon alors que chez 52% l'infection se propagé à plus d'un seul trayon (2 à 4 trayons) (figure 7). Cependant les vaches qui subissaient la traite mécanique, le taux d'infection était un peu plus bas (42% saines contre 58% affectées) dont 38% l'infection touché un seul trayon tandis que 20% seulement chez lesquelles l'infection s'est propagée à 2 jusqu'à 4 trayons (figure 8).

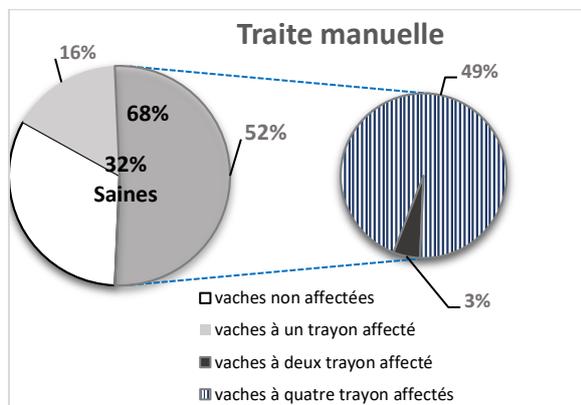


Figure 7 : Fréquence de mammites subclinique

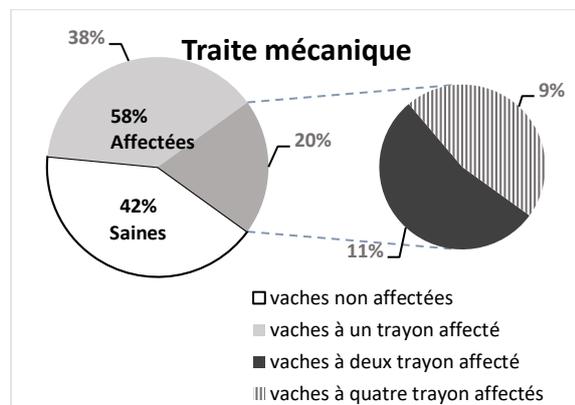


Figure 8 : Fréquence de mammites subclinique chez les vaches laitières subissant la traite mécanique.

**II. 3. Dénombrement de la flore bactérienne du lait cru de vaches suspectes**

Les résultats obtenus concernant la qualité microbiologiques du lait cru de vaches de la wilaya de sidi bel abbès montrent que la totalité de notre échantillon ne répond pas au normes exigées par la législation ceci est dû à la mauvaise hygiène au niveau des fermes.

La contamination par la FAMT informe sur la qualité globale du lait. La majorité de nos échantillons ont présenté un taux qui dépasse les  $10^4$  UFC /ml.

Les colibacilles qui sont des signes d'une contamination fécales sont present dans la totalité de notre échantillonnage. La contamination par les *staphylococcus aureus* est de 56% qui présente un risque très élevé d'une intoxication alimentaire.

**Tableau 6 :** Dénombrement de la flore bactérienne du lait cru des vaches de la wilaya de sidi bel Abbés (Tableau des normes voir annexe)

Échantillon	FMAT	C.Totaux	C.Fécaux	Staph	Levure & moisissure	Strept	Clost
1	235.10	100.10 <sup>3</sup>	12.10 <sup>3</sup>	25	1280 & 940	Abs	Abs
2	170.10 <sup>4</sup>	240.10 <sup>2</sup>	7.10 <sup>3</sup>	20	700 & 1000	Abs	Abs
3	204.10 <sup>4</sup>	172.10 <sup>3</sup>	12.10 <sup>3</sup>	53	930 & 1190	Présence	Abs
4	172.10 <sup>4</sup>	168.10 <sup>3</sup>	Abs	27	1580 & 1440	Présence	Abs
5	272.10 <sup>4</sup>	112.10 <sup>3</sup>	Abs	53	1720 & 1400	Présence	Abs
6	130.10 <sup>4</sup>	240.10 <sup>3</sup>	3.10 <sup>3</sup>	20	220 & 1100	Présence	Abs
7	164.10 <sup>4</sup>	84.10 <sup>3</sup>	6.10 <sup>3</sup>	Abs	610 & 1300	Présence	Abs
8	172.10 <sup>4</sup>	168.10 <sup>3</sup>	19.10 <sup>3</sup>	Abs	610 & 1300	Présence	Abs
9	193.10 <sup>4</sup>	76.10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	Abs	440 & 8600	Présence	Abs
10	250.10 <sup>4</sup>	230.10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	Abs	1000 & 660	Présence	Abs
11	170	240	07	20	700 & 1000	Abs	Abs
12	195.10 <sup>4</sup>	70.10 <sup>3</sup>	Abs	44	1250 & 1100	Présence	Abs
13	169.10 <sup>4</sup>	95.10 <sup>3</sup>	32.10 <sup>3</sup>	32	1000 & 740	Présence	Abs
14	150.10 <sup>4</sup>	80.10 <sup>3</sup>	28.10 <sup>3</sup>	18	1080 & 1880	Présence	Abs
15	80.10 <sup>4</sup>	168.10 <sup>3</sup>	22.10 <sup>3</sup>	58	1320 & 860	Présence	Abs
16	200.10 <sup>4</sup>	116.10 <sup>3</sup>	16.10 <sup>3</sup>	80	1200 & 900	Présence	Abs
17	330.10 <sup>4</sup>	210.10 <sup>3</sup>	40.10	30	90 & 83	Abs	Abs
18	200.10 <sup>4</sup>	20.10 <sup>3</sup>	Abs	30	60 & 115	Abs	Abs
19	100.10 <sup>4</sup>	90.10 <sup>3</sup>	Abs	10	140 & 96	Abs	Abs
20	260.10 <sup>4</sup>	170.10 <sup>3</sup>	13.10 <sup>3</sup>	90	45 & 80	Abs	Abs
21	160.10 <sup>4</sup>	200.10 <sup>3</sup>	60.10 <sup>3</sup>	70	80 & 70	Abs	Abs
22	18.10 <sup>4</sup>	250.10 <sup>3</sup>	45.10 <sup>3</sup>	30	160 & 94	Abs	Abs
23	220.10 <sup>4</sup>	120.10 <sup>3</sup>	35.10 <sup>3</sup>	40	94 & 108	Présence	Abs
24	220.10 <sup>4</sup>	160.10 <sup>3</sup>	25.10 <sup>3</sup>	15	160 & 152	Abs	Abs
25	240.10 <sup>4</sup>	120.10 <sup>3</sup>	30.10 <sup>3</sup>	60	75 & 65	Abs	Abs

Nous avons devisé nos résultats en deux tableaux en fonction des deux types de traite, manuelle et mécanique. Même types de germes détectés pour les deux modes de traite. (Tableau 7 & 8)

**Tableau 7 :** Flore bactérienne du lait cru des vaches laitières subissant une traite manuelle

Échantillon	FMAT	C.Totaux	C.Fécaux	Staph	Levure & moisissure	Strept	Clost
1	235.10	100.10 <sup>3</sup>	12.10 <sup>3</sup>	25	1280 & 940	Absence	Absence
2	170.10 <sup>4</sup>	240.10 <sup>2</sup>	7.10 <sup>3</sup>	20	700 & 1000	Absence	Absence
3	204.10 <sup>4</sup>	172.10 <sup>3</sup>	12.10 <sup>3</sup>	53	930 & 1190	Présence	Absence
4	172.10 <sup>4</sup>	168.10 <sup>3</sup>	Absence	27	1580 & 1440	Présence	Absence
5	272.10 <sup>4</sup>	112.10 <sup>3</sup>	Absence	53	1720 & 1400	Présence	Absence
6	130.10 <sup>4</sup>	240.10 <sup>3</sup>	3.10 <sup>3</sup>	20	220 & 1100	Présence	Absence
7	164.10 <sup>4</sup>	84.10 <sup>3</sup>	6.10 <sup>3</sup>	Absence	610 & 1300	Présence	Absence
8	172.10 <sup>4</sup>	168.10 <sup>3</sup>	19.10 <sup>3</sup>	Absence	610 & 1300	Présence	Absence
9	193.10 <sup>4</sup>	76.10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	Absence	440 & 8600	Présence	Absence
10	250.10 <sup>4</sup>	230.10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	Absence	1000 & 660	Présence	Absence

**Tableau 8 :** Flore bactérienne du lait cru des vaches laitières subissant une traite mécanique

Échantillon	FMAT	C.Totaux	C.Fécaux	Staph	Levure & moisissure	Strept	Clost
1	170	240	07	20	700 & 1000	Abs	Absence
2	195.10 <sup>4</sup>	70.10 <sup>3</sup>	Absence	44	1250 & 1100	Présence	Absence
3	169.10 <sup>4</sup>	95.10 <sup>3</sup>	32.10 <sup>3</sup>	32	1000 & 740	Présence	Absence
4	150.10 <sup>4</sup>	80.10 <sup>3</sup>	28.10 <sup>3</sup>	18	1080 & 1880	Présence	Absence
5	80.10 <sup>4</sup>	168.10 <sup>3</sup>	22.10 <sup>3</sup>	58	1320 & 860	Présence	Absence
6	200.10 <sup>4</sup>	116.10 <sup>3</sup>	16.10 <sup>3</sup>	80	1200 & 900	Présence	Absence
7	330.10 <sup>4</sup>	210.10 <sup>3</sup>	40.10	30	90 & 83	Absence	Absence
8	200.10 <sup>4</sup>	20.10 <sup>3</sup>	Abs	30	60 & 115	Absence	Absence
9	100.10 <sup>4</sup>	90.10 <sup>3</sup>	Abs	10	140 & 96	Absence	Absence
10	260.10 <sup>4</sup>	170.10 <sup>3</sup>	13.10 <sup>3</sup>	90	45 & 80	Absence	Absence

**II.4. Identification et isolement d'une souche bactérienne responsable de mammites**

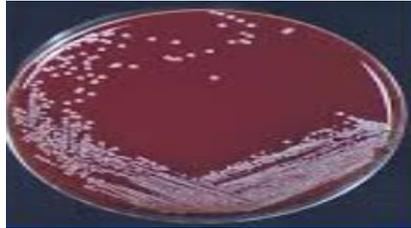
(À partir du lait des vaches à CMT positif).

**A. Les Cocci à gram positif :**

a. Examen macroscopique :

➤ *Staphylococcus* blanc :

Elle se distingue par sa présence sur la peau de l'animal car elle fait partie de la flore commensale. Sur gélose, les colonies apparaissent blanches, lisses et à bord réguliers, elle présente une coagulase négative.



**Figure 9 :** *Staphylococcus* à coagulase négative.

(Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

➤ *Staphylococcus aureus* :

L'observation à l'œil nu montre la présence des colonies lisses, luisantes et bombées à contour régulier.



**Figure 10 :** Aspect macroscopique de *S aureus* sur milieu Chapman.

(Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

Sur le milieu Chapman, les staphylococcus forment des colonies opaques entourées d'un halo jaune dû à l'utilisation du mannitol avec acidification du milieu (virage de l'indicateur « le rouge de phénol » du rouge au jaune).

**b. Examen microscopique :**

• Examen après coloration de Gram :

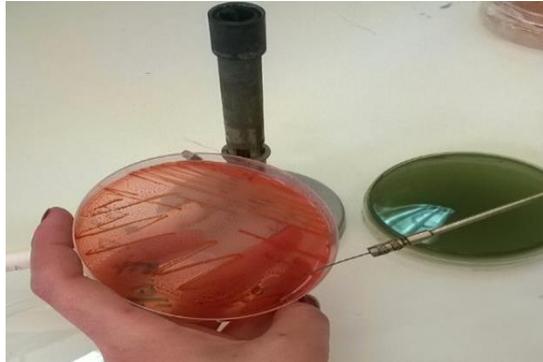
Les staphylococcus aureus sont des cocci à gram<sup>+</sup>



**Figure 11 :** Coloration de Gram de *Staphylococcus aureus*(x100) (Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

**B. Identification de bactéries Bacille à Gram négatif :****➤ Escherichia coli :****a. Examen macroscopique :**

*E. coli* présente un aspect jaune orangé au saumon sur milieu Hektoen.



**Figure 12 :** Aspect macroscopique d'*E.coli* sur milieu Hektoen.

(Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

**b. Examen microscopique :****• Examen après coloration de Gram :**

Pour le cas d'*E.coli*, les bacilles sont courts à gram négatif, disposés en chaînette et isolés.



**Figure 13 :** Coloration de Gram d'*Escherichia.coli* (x100)

(Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

**II.5. Evaluation du pouvoir antibactérien du miel sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.**

Dans cette partie nous allons présenter le résultat obtenu de l'effet du miel sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

**II.5.1 Evaluation du pouvoir antibactérien du miel sur *Staphylococcus aureus***

**A. Antibiogrammes contenant des disques d'antibiotique**

**Tableau 9:** Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*

Antibiotiques	Diamètre d'inhibition (mm)
CN	0
AMC	0
SXT	0
GEN	16



**Figure 14 :** Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*  
(Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

**B. Effet antiseptique du miel sur *Staphylococcus aureus***

**Tableau 10 :** Effet du miel sur *Staphylococcus aureus*

Disques du miel	Diamètre d'inhibition (mm)
1	22
2	25
3	25
4	25
5	22



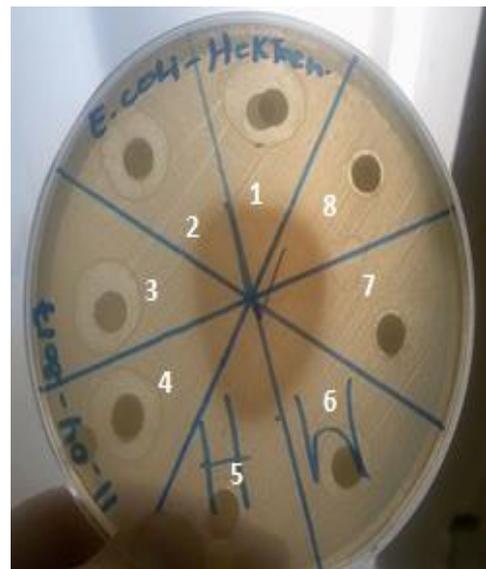
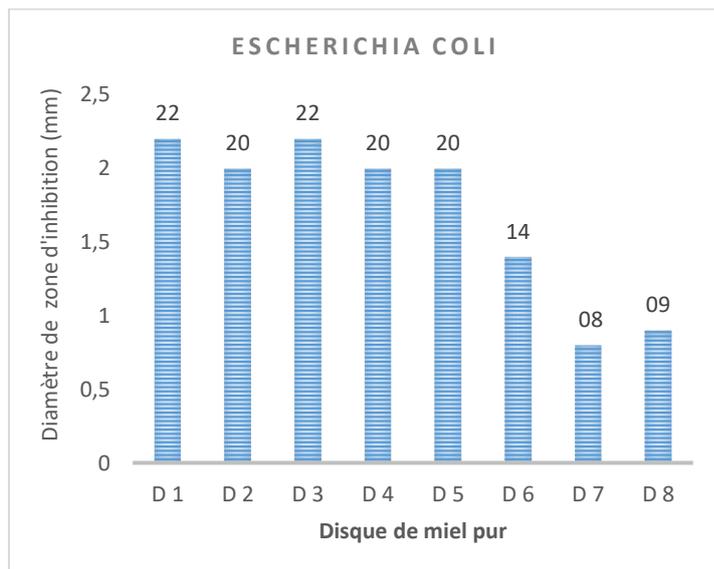
**Figure 15 :** Effet de miel sur *Staphylococcus aureus*.  
(Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés).

Les résultats montrent que le miel a un effet antibactérien très satisfaisant, les diamètres d'inhibition étaient de 25mm. Cependant à l'antibiotique Gentamicine considéré comme le plus fiable envers *Staphylococcus aureus*, la zone d'inhibition était que de 16 mm.

**II.5.2 Evaluation du pouvoir antibactérien du miel pur sur *Escherichia coli***

**A. Effet antibactérien du miel pur sur *Escherichia coli***

Nous avons testé le miel pur pour évaluer son effet antiseptique sur la souche bactérienne *Escherichia coli*. Les mesures des diamètres d'inhibition a permis de déterminer l'activité antibactérienne du miel pur. Les résultats ont montré une importante sensibilité avec des zones d'inhibitions allant de 08 mm jusqu'à 22 mm. (Figure 16) (Figure 17).

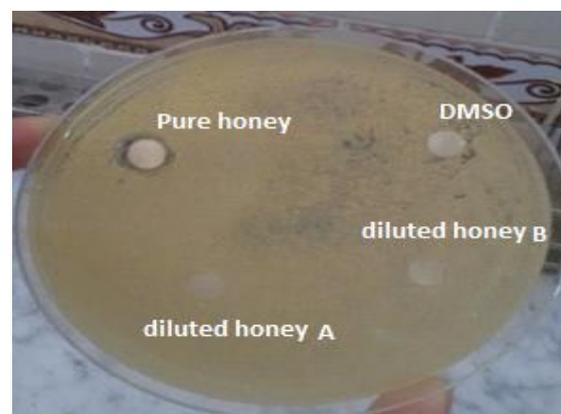
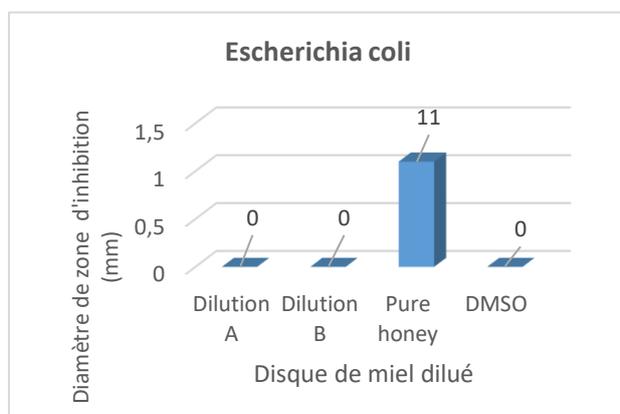


**Figure 16 :** Effet de miel pur sur l'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli*

**Figure 17:** Effet de miel pur sur *Escherichia coli* (Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

**B. Effet antibactérien du miel dilué sur *Escherichia coli***

En testant l'activité antimicrobienne du miel dilué ( $10^{-1}$  &  $10^{-2}$ ), nous avons constaté que les dilutions n'ont pas d'effet sur *Escherichia coli*. Alors que le miel pur présente une activité inhibitrice remarquable. Ceci peut être dû à la dilution de la substance active existante dans le miel mais la raison la plus sûre c'est que la dilution démunie l'acidité du miel donc à un pH plus bas, le miel perd son pouvoir antibactérien. (Figure 186) (Figure 19). Ceci concorde avec une étude réalisée par Jason *et al.*, en 2004, où il ont prouvé que l'acidité du miel non dilué est un facteur anti bactérien, mais lorsque le miel est dilué (sur la peau par exemple), le pH deviens plus basique, à ce moment , l'effet inhibiteur dépendra de l'espèce bactérienne.



**Figure 18 :** Activité antimicrobienne de différentes dilutions et les témoins sur *Escherichia coli*.

**Figure 19:** Effet de miel dilué sur *Escherichia coli* (Prise au laboratoire d'hygiène du CHU de Sidi Bel Abbés)

## II.6 Caractéristiques histologiques

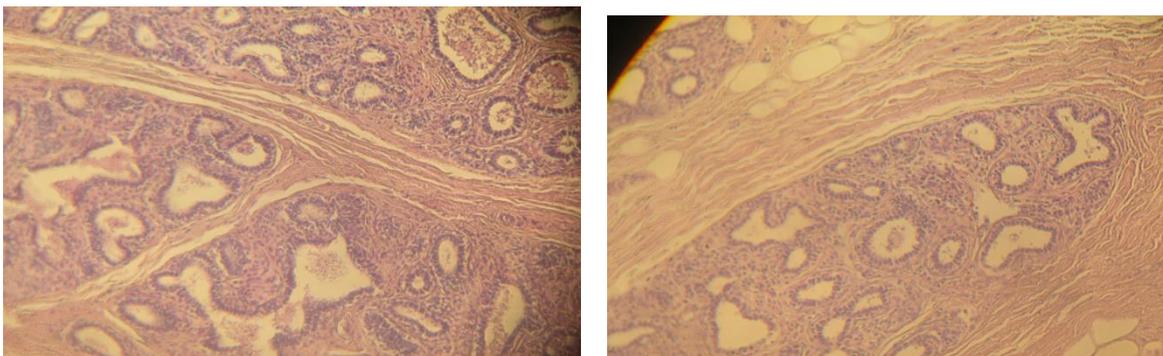
Les analyses histologiques nous ont montré que parmi nos 101 vaches atteintes de mammites, 36 vaches (36.36%) avaient des tissus structurellement normaux, des alvéoles en activités avec de grandes acines et des cellules avec des contours normaux (Fig. 20). D'autres échantillons ont présentés des images d'une mamelle en fin d'activité, se manifestant par des cellules basales et cubiques (Fig. 21).

Cependant 65 vaches (65.65%) ont montré des lésions inflammatoires différentes qui se manifeste par la disparition de la lumière alvéolaire, des fibroses, une destruction complète du parenchyme et un envahissement de cellules sanguines (Fig. 22, 23,24).

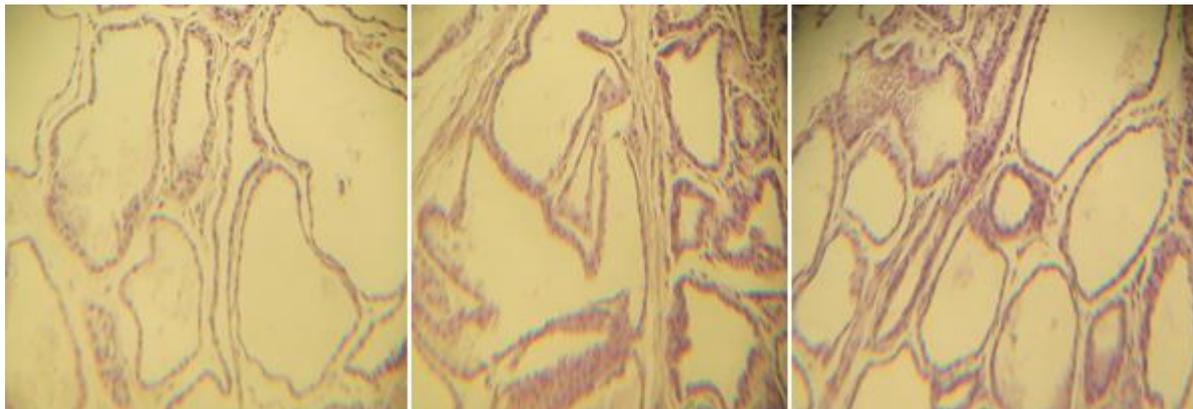
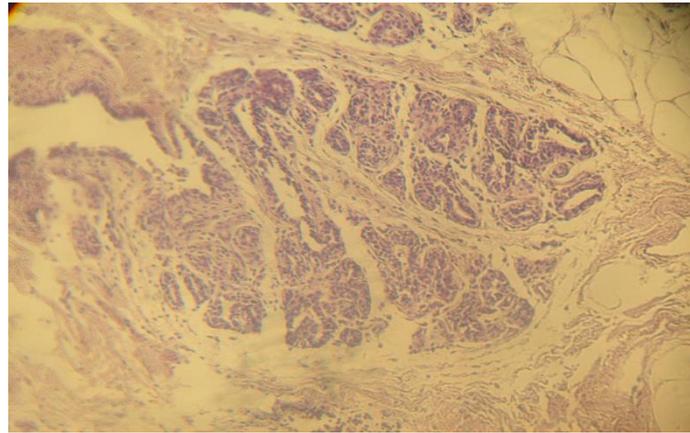
Les lésions des tissus mammaires réduisent le nombre et l'activité des cellules épithéliales, et par conséquent, contribuent à la diminution de la production laitière. Ces lésions mammaires sont généralement induites par un phénomène d'apoptose ou par une nécrose cellulaire importante. Ces lésions des tissus peuvent être causées par des bactéries qui sont capables d'envahir et de se multiplier dans des cellules épithéliales mammaires de la vache avant de provoquer la mort cellulaire. Certaines bactéries secrètent des toxines qui détruisent les membranes cellulaires et endommagent les tissus producteurs de lait. Comme défense il y a la migration des cellules immunitaires dans la glande mammaires et l'effondrement de la barrière sang lait ainsi les polynucléaires neutrophiles libèrent des enzymes protéolytiques et provoquent des dommages intenses aux tissus mammaires.

Lorsque l'infection persiste et que les canaux sont bloqués, il y a augmentation du lait dans les alvéoles, la pression augmente, de ce fait, les cellules sécrétoires perdent leur capacité à synthétiser et les cellules s'atrophient.

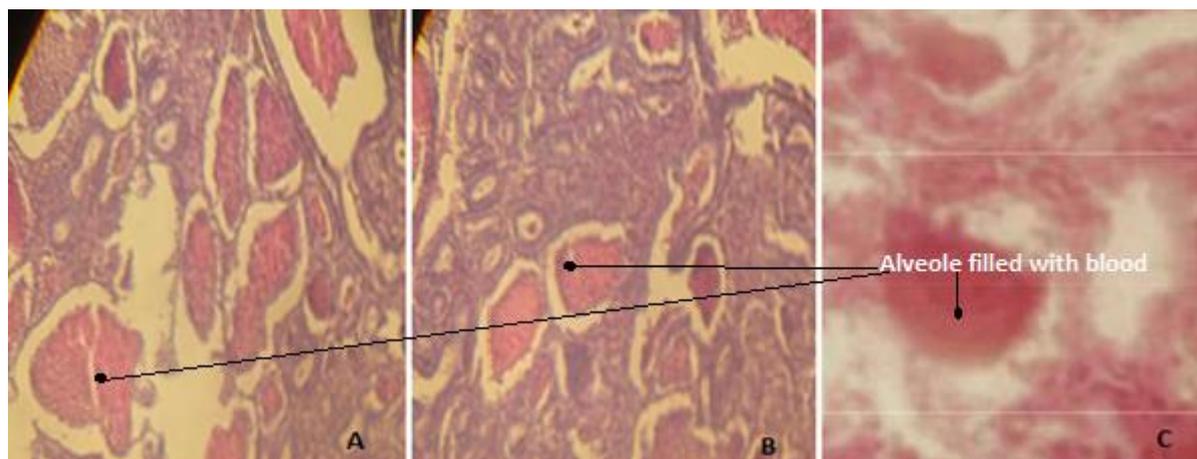
Parmi les bactéries qui ont causé ces mammites nous avons isolé la *Staphylococcus aureus*. D'après plusieurs travaux (Trinidad et al, 1990),(Mehrzaad et al, 2005), les glandes mammaires infectées par *Staphylococcus aureus*, montrant une augmentation du tissu conjonctif intercellulaire et une réduction des cellules épithéliales et de la lumière alvéolaire. Ces mêmes travaux ont rapporté aussi que les protéases du lait de mastite éliminent la caséine, la gélatine, le collagène, l'hémoglobine, les protéines de la membrane de la glande mammaire et la lactoferrine, ce qui indique que les protéases du lait de mastite ont un large éventail d'activités.



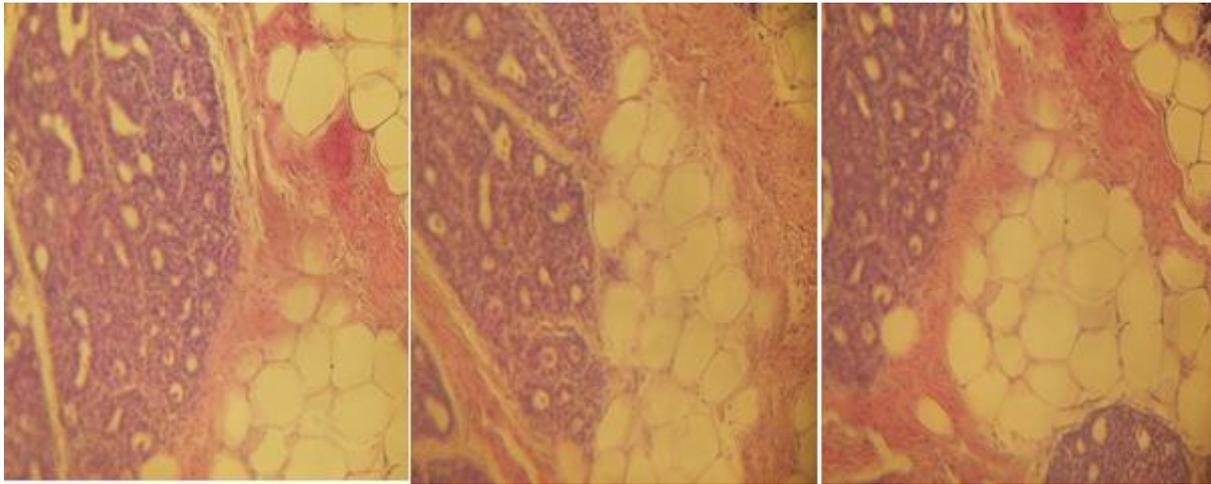
**Figure 20** : Acinus mammaires en activité, mamelle en lactation (A : Grx100, B & C : Grx40).  
(Prise au laboratoire de pathologie du CHU de Sidi Bel Abbés)



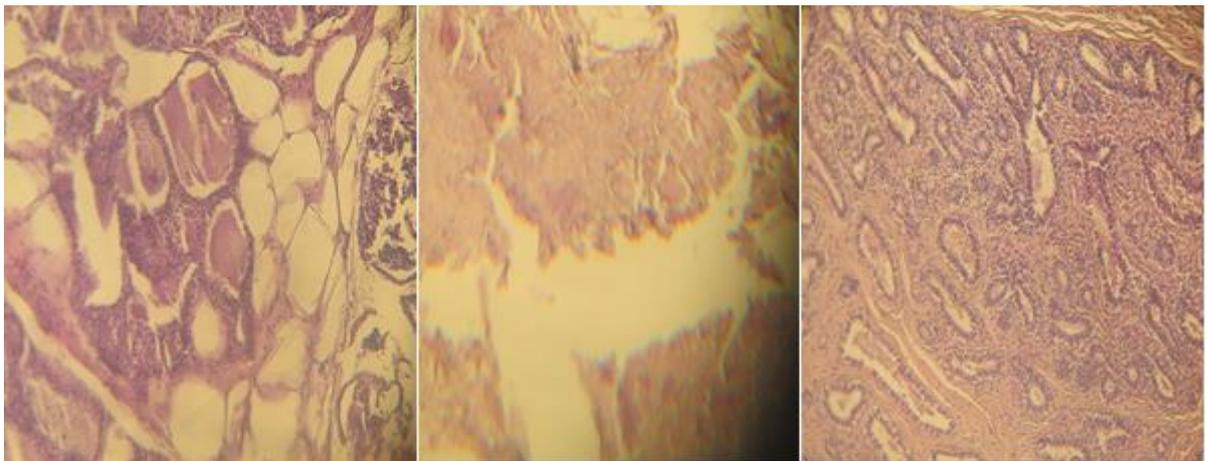
**Figure 21** : Mamelles en fin d'activité, des cellules en forme cubiques, alvéoles distendus, acinus avec lumière large (Gr x40) (Prise au laboratoire de pathologie du CHU de Sidi Bel Abbés).



**Figure 22** : Réaction inflammatoire intense, invasion de polynucléaire, alvéoles remplies de sang (A&B : Grx40, C : Grx100) (Prise au laboratoire de pathologie du CHU de Sidi Bel Abbés).



**Figure 23** : Invasion de sang dans les conduites alvéolaire, congestion, mamelle en inter lactation (Gr x40) (Prise au laboratoire de pathologie du CHU de Sidi Bel Abbés).



**Figure 24** : perte de structure, destruction alvéolaire et un vaste effacement alvéolo-lobulaire (Grx40) (Prise au laboratoire de pathologie du CHU de Sidi Bel Abbés).

## Conclusion

---

Les résultats de notre étude ont montré que sur un cheptel de 101 vaches atteinte de mammites le nombre le plus important était chez les vaches entre la tranche d'âge allant de 2 à 6 années. Nous avons noté aussi que l'atteinte de mammité était plus importante chez les vaches ayant seulement une à deux gestations. Concernant les races, les plus concernées des mastites étaient les races croisées (issu d'un accouplement d'une race locale et une race importé) et la race importée Pie Noir. L'observation des coupes histologiques a montré que parmi les 101 vaches réformées à l'abattoir à cause d'une diminution dans la production du lait, 36.36% vaches avaient des structures tissulaires qui ne présentent aucune anomalie, des alvéoles en activités avec de grandes acines, des cellules avec des contours normaux et parmi eux il existait des échantillons dont les structures tissulaires représentées des cellules basales et cubiques d'une mamelle en fin d'activité. Cependant 65.65% vaches ont montré des lésions inflammatoires différentes qui se manifesté par la disparition de la lumière alvéolaire, des fibroses, une destruction complète du parenchyme et un envahissement de cellules sanguines, ce qui conduis la cellule mammaire à une mort cellulaire. Notre étude à montrer que l'infection est plus importante chez les éleveurs qui pratiquent la traite manuelle (68% de vaches affectées) par rapport à ceux qui utilisent les machines pour la traite (58% de vaches affectées). L'utilisation des machines limitent les manipulations des trayons, en conséquence l'infection ne se propage pas aussi vite que dans la traite manuelle où la transmission se fait par les mains affectées des trayeurs.

Les tests réalisés afin de détecter l'effet du miel sur les deux souches isolées à partir du lait « *Staphylococcus aureus* » et « *Escherichia coli* » ont montré que le miel a un effet remarquable sur l'inhibition de croissance bactérienne, les diamètres des zones d'inhibition étaient de 25mm pour *Staphylococcus aureus*, et 22mm pour *Escherichia coli*. Pourtant, les résultats étaient non satisfaisants avec du miel dilué, cela peut s'expliquer soit que la substance active existante dans le miel est diluée, ou bien que le miel étant un produit acide, son effet bactéricide est dû probablement à son acidité, puisque la dilution du miel diminue son pH, donc son acidité est plus faible, en conséquence son effet qui est dû à son acidité disparaît.

Comme recommandations, le plus important est de sensibiliser les éleveurs envers le problème des mammites subcliniques, en leur affirmant leurs rôles primordiaux afin de les éviter.

Nous proposons les points suivants :

- 1- Maintenir l'environnement de l'étable propre et convenable pour la vache;
- 2- Faire un suivi régulier de l'état de santé du pis;
- 3- Avoir un contrôle périodique de chaque vache ;
- 4- Bien maîtrisé les méthodes de traite et si la traite est mécanique, bien entretenir son équipement;
- 5- Suivre dans le temps le comportement des vaches en tenant un registre ;
- 6- Une visite régulière et gratuite du vétérinaire.

## Références bibliographiques

---

1. Aarestrup, F. M., H. D. Larsen, N. H. Eriksen, C. S. Elsberg, and N. E. Jensen. 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS* 107(4):425-430.
2. Abdeldjalil M.C. (2005). Suivi sanitaire et zootechnique au niveau d'élevages de vaches laitières. Mémoire de Magister en médecine vétérinaire. Département des sciences vétérinaires. Université de Constantine. pp: 2-23.
3. Adda J., Gripon J. C. et Vassel L. (1982).The chemistry of flavor and texturent generation in cheese. *Food chemistry* . pp : 9,115 - 129. Académie des Technologies, Académie d'Agriculture de France AAF. (2004). Rapport : Progrès technologiques au sein des industries alimentaires. Impact sur la qualité des produits. La filière laitière.
4. Afif A., Faid M. et Najimi M. (2008). Qualité microbiologique du lait cru produit dans la région de Tadla au Maroc. *Reviews in Biology and Biotechnology* Vol 7. N°1. pp: 2-7.
5. AFNOR (1980).Recueil des normes françaises. Laits et produits laitiers.
6. AFNOR (1985) Contrôle de la qualité des produits laitiers –Analyses physiques et chimiques, 3ème édition.
7. ALAIS, C. Science du lait. Sépaic, Paris 1984.
8. Alekseeva, L., L. Rault, S. Almeida, P. Legembre, V. Edmond, V. Azevedo, A. Miyoshi, S. Even, F. Taieb, Y. rlot-Bonnemains, Le Loir Y. and N. Berkova. 2013. *Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency. *PLoS. One*. 8(5):e63279.
9. Alliot, A.; Dupas, J.C.; Gourreau, J.M.; Leroux, C.; Romand, P.; Segaud, J.; Vuillemin, G. Pseudo-variole extensive, vive l'hygiène ! *La semaine Vétérinaire*. 13 janvier 1990,559 ; 18-19
10. Almeida, R. A., D. A. Luther, S. J. Kumar, L. F. Calvino, M. S. Bronze, and S. P. Oliver. 1996a. Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and to extracellular matrix proteins. *Zentralbl. Veterinarmed. B*. 43(7) :385-392.
11. Almeida, R. A., K. R. Matthews, E. Cifrian, A. J. Guidry, and S. P. Oliver. 1996b. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 79(6):1021-1026.
12. Anderson JC, Burrows M R, Bramley AJ (1977) Bacterial adherence in mastitis caused by *Escherichia coli*. 14:618–28.
13. Aslani, M.R.; Khodakaram, A.; Rezakhani, A. An atypical case of actinobacillosis in a cow. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 1995; 42(8) : 485-488.
14. Assie B Descottes B, (2010) Le miel comme agent cicatrisant : Thèse d'exercice. Médecine, Toulouse p115.

## Références bibliographiques

---

15. Atalla, H., C. Gyles, and B. Mallard. 2010. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (S. aureus SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 143(2-4):319-328.
16. Atalla, H., C. Gyles, and B. Mallard. 2011. *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim. Health Res. Rev.* 12(1):33-45.
17. Avril JL, Denis F, Monteil M, (2000). *Bactériologie Clinique*. 3ème édition ellipses; (29): 170-181.
18. Avril JL, Denis F, Monteil M,(1992). *Bactériologie Clinique*. 2ème édition DoinParis: pp 9-13, 16-20,155-158.
19. Barkema, H. W., Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks. 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J. Dairy Sci.* 89(6):1877-1895.
20. Bayles, K. W., C. A. Wesson, L. E. Liou, L. K. Fox, G. A. Bohach, and W. R. Trumble. 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 66(1):336-342.
21. Ben-Mahdi MH, Ouslimani S, 2009. Mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérois. *European Journal of Scientific Research*, 36 (3), 357-362.
22. Biri, M. (2002). *LES GRANDS LIVRES DES ABEILLES*. Paris. Ed: Vecchi. p79-230.
23. Blum, S., Heller, E.D., Krifucks, O., Sela, S., Hammer-Muntz, O., Leitner, G., 2008. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. *Vet. Microbiol.* 132, 135– 148.
24. Boualem W. et Cheurfa Y. (2006). Etude de la matière grasse du lait cru cas de Constantine et Sétif . Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en nutrition. Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agroalimentaires. Université de Constantine. pp :40-47
25. 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. Département des Sciences Vétérinaires. Université de Constantine. pp :156-188.
26. Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A., Duchateau, L.,2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34,521–564.
27. Cauty Isabelle et Jean-Marie Perreau (2009). *La conduite du troupeau laiteir*, édition France Agricole Eds, (288 page).
28. Cayot P. et Lorient D. (1998). *Structures et Technofonctions des Protéines du Lait*. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris.
29. Charron G. (1986). *Les produits laitiers Vol1 les bases de la production*. Edition Tec et Doc. 347p.

## Références bibliographiques

---

30. Chiapello, H., I. Bourgain, F. Sourivong, G. Heuclin, A. Gendrault-Jacquemard, M. A. Petit, and K. M. El. 2005. Systematic determination of the mosaic structure of bacterial genomes: species backbone versus strain-specific loops. *BMC. Bioinformatics.* 6:171.
31. Chilliard Y. et Lamberet G. (1984). La lipolyse dans le lait : les différents types, mécanismes, facteurs de variations, signification pratique. *Le lait* 64.pp : 544-578.
32. Coulon J. B., Chilliard Y., Rémond B., 1991. Effet du stade physiologique et de la saison sur la composition chimique du lait de vache et ses caractéristiques technologiques. *INRA Prod. Anim,* 4, 219-228.
33. Dadoune J.P. *Biologie de la reproduction humaine.* Ed. Ellipses, Paris, 2006.
34. De Buyser M.L., A. Brisabois, E. Espié, G. Delmas and B. Dufour. 2005. Implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire en France de 1988 à 2003. *Bull. Epidemiol.* 16.
35. Dehkal G. (1982). Incidence du temps de réfrigération sur la microflore du lait cru. Mémoire d'ingénieur d'état en industries agro-alimentaires. Institut des sciences biologiques. Université de Constantine.
36. Denis, F. (2007). Bactériologie médicale : Technique usuelles. 4ème Edition. p 295.
37. Denis, F. Dabernath. Monteil, H. Avril, J L. (1998) Bactériologie Clinique. Edition marketing. Paris. p 144-145.
38. Devriese L.A., Vandamme P., Pot B., Vanrobaeys M., Kersters K. et Haesebrouck F. (1998). Differentiation between *Streptococcus gallolyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* from the intestinal tracts of ruminants. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38.pp : 3520-3523.
39. Dingwell R T, Leslie K E, Schukenn Y H, Sargeant J M and Timms L (2003) Evaluation of the California Mastitis Test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows , *Journal Canadian Veterinary*, 44, 413-416.
40. Dosogne, H., Meyer, E., Sturk, A., van Loon, J., Massart-Leën, A.M., Burvenich, C., 2002. Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis. *Inflamm. Res.* 51, 201–205.
41. Easterday Bc, Simon J, Hanson Rp. (1958).The use of the modified Whiteside test as a screen test for bovine mastitis. *J Am Vet Med Assoc.* Nov 1;133(9):470–473.
42. Fairbrother JM and Nadeau E, (2010) Colibacillosis. In *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock.* Lefevre PC, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G, eds. Lavoisier. Vol. 2, Chapter 74: 917-945
43. Fairbrother, J. M., E. Nadeau, and C. L. Gyles. 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res. Rev.* 6(1):17-39.

## Références bibliographiques

---

44. Fioramonti, J., V. Theodorou, and L. Bueno. 2003. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17(5):711-724.
45. Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V. 1997. Finestructure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119:261-269.
46. Fraunholz, M., and B. Sinha. 2012. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2:43.
47. Frazee, B. W., and D. D. Price. 2006. Images in emergency medicine. Extensive deep venous thrombosis with dilated collaterals and confirmatory emergency department ultrasound. *Ann. Emerg. Med.* 47(3):292-308.
48. Frost A J, Brooker B E, (1986) Hyperacute *Escherichia Coli* mastitis of cattle in the immediate post -partum period. *Aust. Vet. J.*, 63: 327-331.
49. Goerke, C., R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B. M. Broker, J. Doskar, and C. Wolz. 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J. Bacteriol.* 191(11):3462-3468.
50. Gourreau, J.M. *Accidents et maladies du trayon.* Paris : Editions France Agricole, Paris, 1995, 287p
51. Gourreau, J.M. La thélite nodulaire tuberculoïde. *La Revue de L'Eleveur.* Mai 2, 1995, 15 : 28-29
52. Gourreau, J.M.; Moussa, A.; Dubois, A.; Hermitte, P.; Delmache, P.; Fedida, M.; Guerrin, R. Epizootie de thélite ulcéralive herpétique en Haute-Marne. *Point Vétérinaire.* 1989; 21(123) : 633-635
53. Gourreau, J.M.; Muller, M. Dermatophilose bovine dans le Poitou. *Bulletin des GTV.* 2000; 8 : 169-170
54. Goy D., Häni JP. , Wechsler D. et Jakob E. (2005). Valeur de la teneur en caséine du lait de fromagerie. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions Gruyère N°27.
55. Gripon JC., Desmazeaud MJ., Le Bars D. et Bergère JL. (1975). Étude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Influence de la présure commerciale. *Le Lait* 55.pp: 502-516.
56. Guinane, C. M., N. L. Ben Zakour, M. A. Tormo-Mas, L. A. Weinert, B. V. Lowder, R. A. Cartwright, D. S. Smyth, C. J. Smyth, J. A. Lindsay, K. A. Gould, A. Witney, J. Hinds, J. P. Bollback, A. Rambaut, J. R. Penades, and J. R. Fitzgerald. 2010. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* 2:454-466.

## Références bibliographiques

---

57. Guy, J.S.; Potgieter, L.N.; McCracken, M.; Martin, W. Isolation of bovine herpesvirus-1 from vesicular lesions of the bovine udder. *American Journal of Veterinary Research*. 1984; 45(4) : 783-785
58. Haslinger-Löffler, B., B. C. Kahl, M. Grundmeier, K. Strangfeld, B. Wagner, U. Fischer, A. L. Cheung, G. Peters, K. Schulze-Osthoff, and B. Sinha. 2005. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. *Cell Microbiol*. 7(8):1087-1097.
59. Heilmann, C. 2011. Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv. Exp. Med. Biol*. 715:105-123.
60. Hennekinne, J.A., Kerouanton, A., Brisabois, A., De Buyser, M.L., 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol*. 94:321–329.
61. Heuchel V., Chatelin Y.M., Breau S., Sobolewski F., Blancard N., Baraton Y., Ayerbe A. (2003). Lipolyse du lait de vache et qualité organoleptique des produits laitiers. *Renc. Tech. Ruminant* n°10, pp : 223-226.
62. Hogan, J., Larry Smith, K., 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res*. 34, 507–519.
63. Horsburgh, M. J., J. L. Aish, I. J. White, L. Shaw, J. K. Lithgow, and S. J. Foster. 2002. sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol*. 184(19):5457-5467.
64. Hurtaud C., Buchin S., Matin B., Verdier-Metz I., Peyraud J.L et Noël Y. (2001). La qualité des laits et ses conséquences sur la qualité des produits de transformation : quelques techniques de mesure dans les essais zootechniques. *Renc. Rech. Ruminants*, n°8, pp: 35-42.
65. Institut de l'élevage. (2009). *Traite des vaches laitière. Matériel. Installation. Entretien*. 1ere Edition France Agricole. Produire mieux. pp :55-506.
66. Isigidi, B., Devriese, L., Godard, C., Hoof van, J., 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett. Appl. Microbiol*. 11:145-147.
67. Jakob E, Winkler H, et Haldemann J. (2009). Critères Microbiologiques Pour La Fabrication Du Fromage. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions N° 77. F. pp : 5-31.
68. Jason H, Demera , Esther R., Angert (2004). Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phyto geographic regions of Costa Rica. *Apidologie* 35: 411–417.
69. Jean-prost, P. (1987). *Apiculture*. Paris .Ed: baillière.J.b .p361.
70. Jegou-Penouil, M.H.; Serpier, H.; Leborgne, G.; Cambie, M.P.; Ploton, D.; Brodart, V.; Brugere-Picoux, J.; Kalis, B. Un poxvirus dans les Ardennes. *Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France*. 1997; 81(1) : 37-44

## Références bibliographiques

---

71. Joubert, L.; Prave, M.; Chomel, B.; Duclos, P. Les poxviroses animales : étude générale. Revue de Médecine Vétérinaire. 1983; 134(1) : 45-54 186
72. Kirat, 2007. Les conditions d'émergence d'un système d'élevage spécialisé en engraissement et ses conséquences sur la redynamisation de l'exploitation agricole et la filière des viandes rouges bovines - Cas de la Wilaya de Jijel en Algérie. Montpellier (France): CIHEAM-IAMM.13p.
73. Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. iag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, and J. Potempa. 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. PLoS. One. 3(1):e1409.
74. Larpent J.P. (1990). Lait et produits laitiers non fermentés. Dans Microbiologie alimentaire. ( Bourgeois C.M., Mescle J.F.et Zucca J.) Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Edition Tec et Doc. Lavoisier. pp : 201-215.
75. Le Loir Y. and M. Gautier. 2010. Monographie de microbiologie : *Staphylococcus aureus*. Lavoisier. Tec&Doc.
76. Le Marechal, C., J. Jardin, G. Jan, S. Even, C. Pulido, J. M. Guibert, D. Hernandez, P. Francois, J. Schrenzel, D. Demon, E. Meyer, N. Berkova, R. Thiery, E. Vautor, and Le Loir Y. 2011a. *Staphylococcus aureus* seroproteomes discriminate ruminant isolates causing mild or severe mastitis. Vet. Res. 42(1):35.
77. Le Minor L. et Richard C. (1993). Méthodes de laboratoire pour l'identification des entérobactéries. Institut Pasteur.
78. Letchworth, G.J.; LaDue, R. Bovine herpes mammillitis in 2 New York dairy herds. Journal of the American Veterinary Medical Association. 1982; 180(8) : 902-907
79. Lowy, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339(8):520-532.
80. Lowy, F. D. 2000. Is *Staphylococcus aureus* an intracellular pathogen? Trends Microbiol. 8(8):341-343.
81. Lowy, F. D. 2011. How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. N. Engl. J. Med. 364(21):1987-1990.
82. Martin, J.R.; Harvey, D.; Montpetit, C. La mammilite herpétique bovine au Québec. Canadian Veterinary Journal. 1987 Aug; 28(8) : 529-532
83. Mathieu J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris.
84. Mehrzad, J., C. Desrosiers, K. Lauzon, G. Robitaille, X. Zhao and P. Lacasse, 2005. Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. J. Dairy Sci., 88: 211-222.

## Références bibliographiques

---

85. Mehrzad, J., C. Desrosiers, K. Lauzon, G. Robitaille, X. Zhao and P. Lacasse, 2005. Proteases involved in mammary tissue damage during endotoxin-induced mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 88: 211-222.
86. Mennane Z., Ouhssine M., Khedid K. et Elyachioui M. (2007). Hygienic quality of raw cow's milk feeding from waste in two regions in Morocco. *International journal of agriculture and biology*. Vol.9, n°1. pp: 46-48.
87. Moisan, H., E. Brouillette, C. L. Jacob, P. Langlois-Begin, S. Michaud, and F. Malouin. 2006. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* 188(1):64-76.
88. Mostefa M, Bensaci Bachacha M, Boudeghe A. (2010). Etude de l'effet antimicrobien de trois échantillons de miel naturel récoltés du territoire algérien. *Annales des Sciences et Technologie* Vol. 2,
89. Moussa, A.; Espinasse, J.; Fedida, M.; Lamblin, J.; Valentin, F.; Colnacapp, A.; Vigouroux, A.; Zanchetta, J.M. Diagnostic clinique et virologique du pseudo-cowpox (paravaccinose). Etude sur des troupeaux de trois départements français. *Recueil de Médecine Vétérinaire*. 1983; 159(12) : 1091-1095
90. Novick, R. P. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 49(2):93-105.
91. Ogawa, S. K., E. R. Yurberg, V. B. Hatcher, M. A. Levitt, and F. D. Lowy. 1985. Bacterial adherence to human endothelial cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 50(1):218-224.
92. Olivieri VP. (1982). Bacterial indicators of pollution. Dans: Pipes.WO: Bacterial indicators of pollution, edit CRC Press, pp: 21-41.
93. Ounine, K., Rhoutaïsse, A. and El Halou, N.E. (2004). Caractérisation bactériologique du lait cru produit dans les étables de la région du Gharb. *Al awamia*, 109- 110. pp : 187-204.
94. Oviedo-Boyso J, JJ. Valdez-Alarcón, M. Cajero-Juárez, A. Ochoa-Zarzosa, JE. López-Meza, A. Bravo-Patiño, VM. Baizabal-Aguirre. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect.* 54(4):399-409.
95. Perrin-Coullioud I. 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. Résultats d'une enquête régionale. Volume 1, tome 142. pp :39
96. Petransxiene D. et Lapied L. (1981). Qualité bactériologique du lait et produits laitiers. Analyses et tests. Edition Tec.& Doc, Paris.
97. Plan d'action Ecoantibio 2012-2017. objectif de réduire les risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire, pour la période 2017-2021. [Gouvernement.fr](http://Gouvernement.fr).

## Références bibliographiques

---

98. Poutrel, B., Lerondelle, C., 1978. Induced staphylococcal infections in the bovine mammary gland. Influence of the month of lactation and other factors related to the cow. *Ann. Rech. Vet.* 9(1):119-128.
99. Qazi, S. N., E. Counil, J. Morrissey, C. E. Rees, A. Cockayne, K. Winzer, W. C. Chan, P. Williams, and P. J. Hill. 2001. agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect. Immun.* 69(11):7074-7082.
100. Qazi, S. N., S. E. Harrison, T. Self, P. Williams, and P. J. Hill. 2004. Real-time monitoring of intracellular *Staphylococcus aureus* replication. *J. Bacteriol.* 186(4):1065-1077.
101. Rahal K, Ameur A , Bouyoucef A et Kaidi R 2009 Epidémiologie des mammites chez les bovins laitiers, dans la région de la Mitidja, 7ème Journées des sciences vétérinaires , les maladies infectieuses des bovins,18,19 Avril ,Algérie. Ecole Nationale Vétérinaire, El Harrach.
102. Roudaut H. et Lefrancq E. (2005). Alimentation théorique. Edition Sciences des Aliments.
103. Roudj S., Belkheir K., Zadi Karam H. et Karam N.E. (2009). Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du sud ouest algérien. *European journal of scientific research.* Vol.34 n°2, pp:218-227.
104. Rupp, R., and D. Boichard. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 34(5):671-688.
105. Sargeant J M, Morgan A , Scott H , Leslie K E , Ireland M J and Bashiri A (1998) Clinical Mastitis in dairy Cattle in Ontario, Frequency of occurrence and bacteriological isolates, *Canadian Veterinary Journal*, 39: 33-38.
106. Scott, D.W. *Color atlas of farm animal dermatology.* Ames : Blackwell Publishing, 2007, 252p
107. Scott, D.W. *Large animal dermatology.* Philadelphia : W.B. Compagny, 1988, 487p
108. Seegers H., C. Fourichon and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475-491.
109. Sendi, P., and R. A. Proctor. 2009. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* 17(2):54-58.
110. Sentsui, H.; Murakami, K.; Inoshima, Y.; Shibahara, T.; Yokomizo, Y. Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon- gamma. *Veterinary Microbiology.* 1999; 70(3/4) : 143-152
111. Smith, K.L., Todhunter, D.A., Schoenberger, P.S., 1985. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J. Dairy Sci.* 68, 402–417.
112. Tan, H. H., Y. K. Tay, and C. L. Goh. 1998. Bacterial skin infections at a tertiary dermatological centre. *Singapore Med. J.* 39(8):353-356.
113. Thiry, E.; Lemiare, M.; Schynts, F.; Vanderheijden, N.; Meyer, G.; Dispas, M.; Pastoret, P.P. La Rhinotrachéite Infectieuse Bovine : caractéristiques du virus, l'infection et ses manifestations cliniques. *Bulletin des GTV.* 1997; 4 : 7-15

## Références bibliographiques

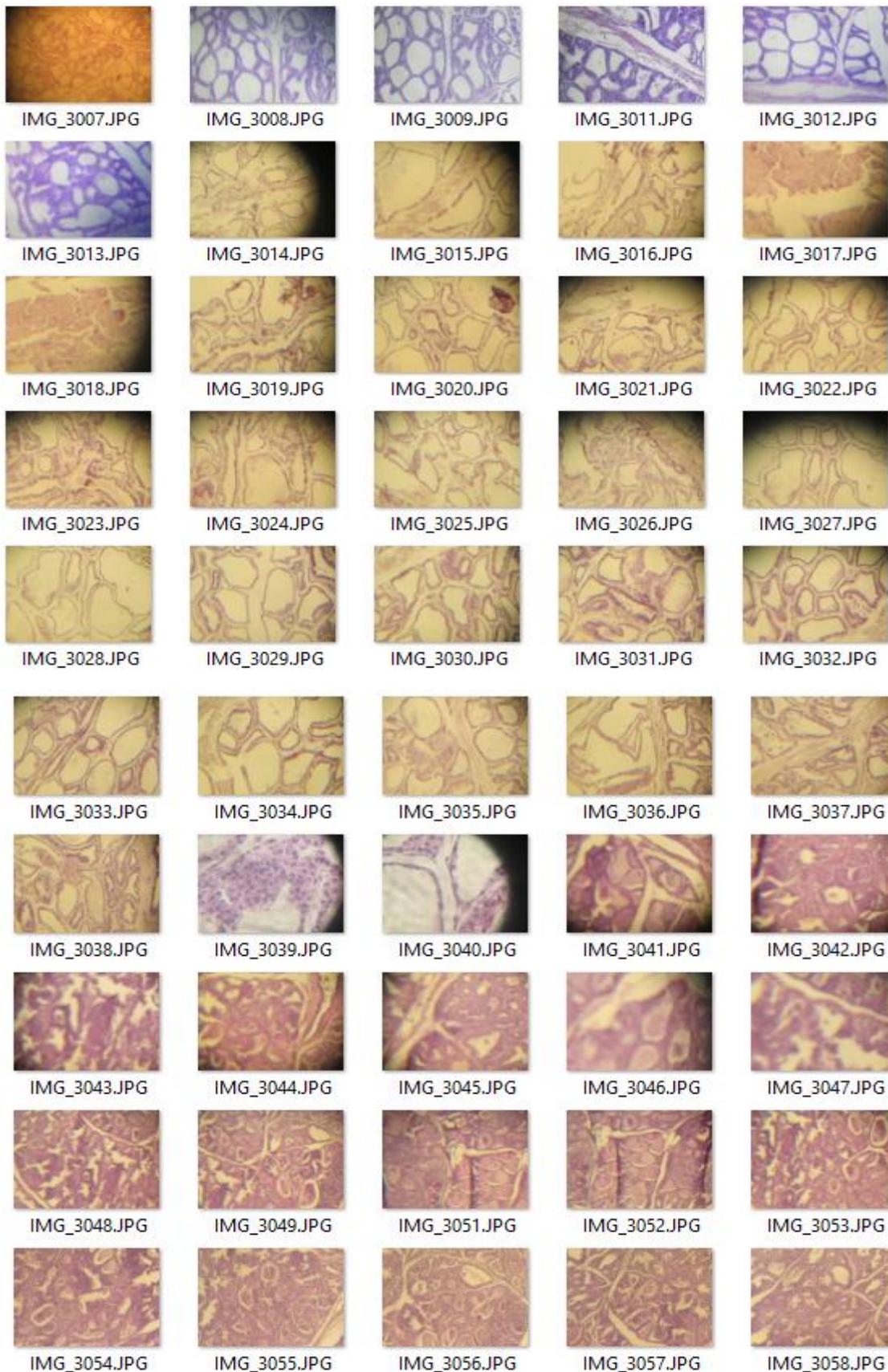
---

114. Toureau V., Bagieu V. et Le Bastard A-M. (2004). Une priorité pour la recherche :la qualité de nos aliments. Les recherches sur la qualité du fromage. INRA mission communication.
115. Trinidad, P., S.C. Nickerson and R.W. Adkinson, 1990. Histopathology of staphylococcal mastitis in unbred dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, 73: 639-647.
116. Varnam A.H. et Sutherland P. (2001). *Milk and Milk Products: Technology, Chemistry, and Microbiology*. Volume 1 Food products series. An Aspen Publication. New York. pp: 35-37.
117. VIGNOLA C.L., (2002) *Science et technologie du lait –Transformation du lait*, École polytechnique de Montréal, ISBN: 29-34 (600 pages).
118. Wellenberg, G.J.; Brusckhe, C.J. ; Wisselink, H.J. ; Barkema, H.W. ; Van Oirschot, J.T. Simultaneous intramammary and intranasal inoculation of lactating cows with Bovine Herpesvirus 4 induce subclinical mastitis. *Veterinary Microbiology*. 2002 April 22; 86(1-2) : 115-129
119. Wesson, C. A., L. E. Liou, K. M. Todd, G. A. Bohach, W. R. Trumble, and K. W. Bayles. 1998. Staphylococcus aureus Agr and Sar global regulators influence internalization and induction of apoptosis. *Infect. Immun.* 66(11):5238-5243.
120. Wolter R. (1988). *Alimentation de la vache laitière*. 3ème édition. Editions France Agricole. Paris.
121. Yamasaki, O., J. Kaneko, S. Morizane, H. Akiyama, J. Arata, S. Narita, J. Chiba, Y. Kamio, and K. Iwatsuki. 2005a. The association between Staphylococcus aureus strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clin. Infect. Dis.* 40(3) :381-385.
122. Prékarski Andrée. (2011) : *Pratique clinique en Bactériologie, Mycologie et Parasitologie*. p40.
123. CUQ.P. et AGBA K.C., 1977. Les organes génitaux de la femelle. *Rev. E/ev. Méd. Vét. Pays trop.* 28 :331-349.
124. Guiraud J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire* .Edition Dunod, Paris. 651-662.
125. Craplet C., Thibier M. 1973. *La Vache Laitière : Reproduction, Génétique, Alimentation, Habitat, Grandes Maladies*, Vol. 5, 2nd edn. Vigot Frères, Paris.
126. Vesseyre.R.1979.*Technologie du lait : constitution. récolte, traitement et transformation du lait*. Edition : la maison rustique.

## Annexes

---

### Annexe 1 : Les coupes histologiques des glandes mammaires effectuées pendant l'expérimentation :



## Annexes

---



IMG\_3059.JPG



IMG\_3060.JPG



IMG\_3061.JPG



IMG\_3062.JPG



IMG\_3063.JPG



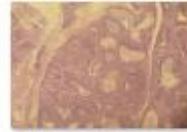
IMG\_3064.JPG



IMG\_3065.JPG



IMG\_3066.JPG



IMG\_3067.JPG



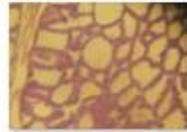
IMG\_3068.JPG



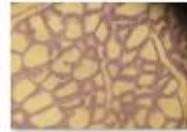
IMG\_3069.JPG



IMG\_3070.JPG



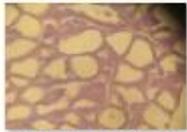
IMG\_3071.JPG



IMG\_3072.JPG



IMG\_3073.JPG



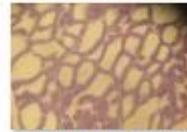
IMG\_3074.JPG



IMG\_3075.JPG



IMG\_3076.JPG



IMG\_3077.JPG



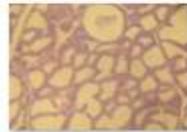
IMG\_3078.JPG



IMG\_3079.JPG



IMG\_3080.JPG



IMG\_3081.JPG



IMG\_3082.JPG



IMG\_3083.JPG



IMG\_3084.JPG



IMG\_3085.JPG



IMG\_3086.JPG



IMG\_3087.JPG



IMG\_3088.JPG



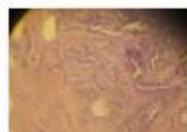
IMG\_3089.JPG



IMG\_3090.JPG



IMG\_3091.JPG



IMG\_3092.JPG



IMG\_3093.JPG



IMG\_3094.JPG



IMG\_3095.JPG



IMG\_3096.JPG



IMG\_3097.JPG



IMG\_3098.JPG



IMG\_3099.JPG



IMG\_3100.JPG



IMG\_3101.JPG



IMG\_3102.JPG



IMG\_3103.JPG



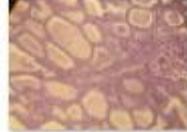
IMG\_3104.JPG



IMG\_3105.JPG



IMG\_3106.JPG



IMG\_3107.JPG



IMG\_3108.JPG

## Annexes

---



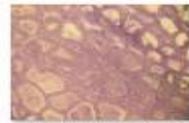
IMG\_3109.JPG



IMG\_3110.JPG



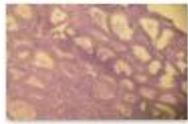
IMG\_3111.JPG



IMG\_3112.JPG



IMG\_3113.JPG



IMG\_3114.JPG



IMG\_3115.JPG



IMG\_3116.JPG



IMG\_3117.JPG



IMG\_3118.JPG



IMG\_3119.JPG



IMG\_3120.JPG



IMG\_3121.JPG



IMG\_3122.JPG



IMG\_3123.JPG



IMG\_3124.JPG



IMG\_3125.JPG



IMG\_3126.JPG



IMG\_3127.JPG



IMG\_3128.JPG



IMG\_3129.JPG



IMG\_3130.JPG



IMG\_3131.JPG



IMG\_3132.JPG



IMG\_3133.JPG



IMG\_3134.JPG



IMG\_3135.JPG



IMG\_3136.JPG



IMG\_3137.JPG



IMG\_3138.JPG



IMG\_3139.JPG



IMG\_3140.JPG



IMG\_3141.JPG



IMG\_3142.JPG



IMG\_3143.JPG



IMG\_3144.JPG



IMG\_3145.JPG



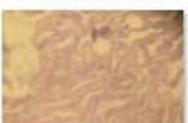
IMG\_3146.JPG



IMG\_3147.JPG



IMG\_3148.JPG



IMG\_3149.JPG



IMG\_3150.JPG



IMG\_3151.JPG



IMG\_3152.JPG



IMG\_3153.JPG



IMG\_3154.JPG



IMG\_3155.JPG



IMG\_3156.JPG



IMG\_3157.JPG



IMG\_3158.JPG

## Annexes

---



IMG\_3159.JPG



IMG\_3160.JPG



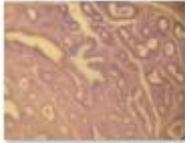
IMG\_3161.JPG



IMG\_3162.JPG



IMG\_3163.JPG



IMG\_3164.JPG



IMG\_3165.JPG



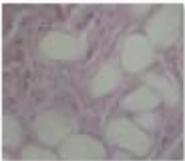
IMG\_3166.JPG



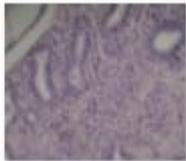
IMG\_3167.JPG



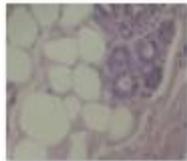
IMG\_3168.JPG



IMG\_3169.JPG



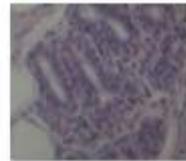
IMG\_3170.JPG



IMG\_3171.JPG



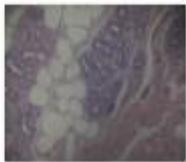
IMG\_3172.JPG



IMG\_3173.JPG



IMG\_3174.JPG



IMG\_3175.JPG



IMG\_3176.JPG



IMG\_3177.JPG



IMG\_3178.JPG



IMG\_3179.JPG



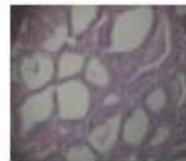
IMG\_3180.JPG



IMG\_3181.JPG



IMG\_3182.JPG



IMG\_3183.JPG



IMG\_3184.JPG



IMG\_3185.JPG



IMG\_3186.JPG



IMG\_3187.JPG



IMG\_3188.JPG



IMG\_3189.JPG



IMG\_3190.JPG



IMG\_3191.JPG



IMG\_3192.JPG



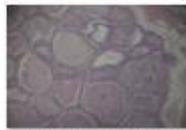
IMG\_3193.JPG

# Annexes

---



IMG\_3194.JPG



IMG\_3195.JPG



IMG\_3196.JPG



IMG\_3197.JPG



IMG\_3198.JPG



IMG\_3199.JPG



IMG\_3200.JPG



IMG\_3201.JPG



IMG\_3202.JPG



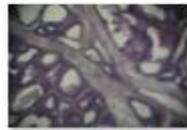
IMG\_3203.JPG



IMG\_3204.JPG



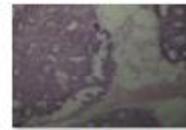
IMG\_3205.JPG



IMG\_3206.JPG



IMG\_3207.JPG



IMG\_3208.JPG



IMG\_3209.JPG



IMG\_3210.JPG



IMG\_3211.JPG



IMG\_3212.JPG



IMG\_3213.JPG



IMG\_3214.JPG



IMG\_3215.JPG



IMG\_3216.JPG



IMG\_3217.JPG



IMG\_3218.JPG



IMG\_3221.JPG



IMG\_3222.JPG



IMG\_3223.JPG



IMG\_3224.JPG



IMG\_3225.JPG



IMG\_3226.JPG



IMG\_3227.JPG



IMG\_3228.JPG



IMG\_3229.JPG



IMG\_3230.JPG



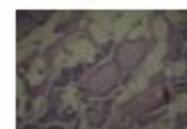
IMG\_3231.JPG



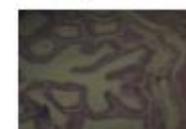
IMG\_3232.JPG



IMG\_3233.JPG



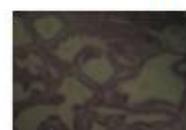
IMG\_3234.JPG



IMG\_3235.JPG



IMG\_3236.JPG



IMG\_3237.JPG



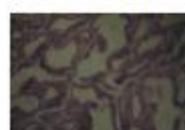
IMG\_3238.JPG



IMG\_3239.JPG



IMG\_3240.JPG



IMG\_3241.JPG



IMG\_3242.JPG



IMG\_3243.JPG



IMG\_3244.JPG



IMG\_3245.JPG

## Annexes

---



IMG\_3226.JPG



IMG\_3227.JPG



IMG\_3228.JPG



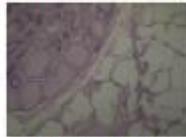
IMG\_3229.JPG



IMG\_3230.JPG



IMG\_3231.JPG



IMG\_3232.JPG



IMG\_3233.JPG



IMG\_3234.JPG



IMG\_3235.JPG



IMG\_3236.JPG



IMG\_3237.JPG



IMG\_3238.JPG



IMG\_3239.JPG



IMG\_3240.JPG



IMG\_3241.JPG



IMG\_3242.JPG



IMG\_3243.JPG



IMG\_3244.JPG



IMG\_3245.JPG



IMG\_3246.JPG



IMG\_3247.JPG



IMG\_3248.JPG



IMG\_3249.JPG



IMG\_3250.JPG



IMG\_3253.JPG



IMG\_3254.JPG



IMG\_3255.JPG



IMG\_3256.JPG



IMG\_3257.JPG



IMG\_3258.JPG



IMG\_3259.JPG



IMG\_3260.JPG



IMG\_3261.JPG



IMG\_3262.JPG



IMG\_3263.JPG



IMG\_3266.JPG



IMG\_3267.JPG



IMG\_3268.JPG



IMG\_3269.JPG



IMG\_3270.JPG



IMG\_3271.JPG



IMG\_3272.JPG



IMG\_3273.JPG



IMG\_3274.JPG



IMG\_3275.JPG



IMG\_3276.JPG



IMG\_3277.JPG



IMG\_3278.JPG



IMG\_3279.JPG

### **Annexe 2 : Les techniques d'analyses**

#### **1- Méthodes et Techniques de prélèvement du pus après ouverture du trayon :** (après abatage de la vache

Le pus est prélevé à l'aide d'un écouvillon en passant sur une surface de 1cm<sup>2</sup> de la mamelle, dans un mouvement en zigzag combiné à une rotation.

Le prélèvement doit s'effectuer sur deux écouvillons, l'un pour permettre l'examen direct et l'autre pour la culture.

#### **Transport :**

Le transport vers le laboratoire doit être le plus rapide possible dans un milieu de transport.

#### **2- Examen cytobactériologique du pus :**

L'examen cytobactériologique étudie un échantillon de pus superficiels ou profonds afin de déterminer s'il révèle ou non une infection et quel est le germe en cause.

##### **a. Examen macroscopique :**

C'est un examen qui sert à l'étude de la couleur, la consistance et de l'odeur du pus à l'œil nu et qui peut donner des informations importantes :

##### **Couleur :**

- ✓ Un pus jaune, épais et bien lié oriente vers le *Staphylocoque* ;
- ✓ Un pus clair, séreux et blanchâtre oriente vers le *Streptocoque* ;
- ✓ Un pus verdâtre ou bleuâtre d'odeur aromatique oriente vers le bacille pyocyanique ;
- ✓ Un pus grisâtre et généralement fétide oriente vers les germes anaérobiques ;

##### **Consistance :**

Peut aller d'un liquide trouble jusqu'à une matière épaisse et collante (Prékarski. A, 2011).

##### **Odeur :**

Une odeur fétide, est l'une des caractéristiques principales de l'infection anaérobie ou mixte aérobie-anaérobie.

##### **b. Examen microscopique :**

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne.

Elle comprend :

- L'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes).
- L'examen après coloration (le plus souvent sur frottis séchés et fixés).

##### **L'examen à l'état frais :**

###### **\* Principe :**

## Annexes

---

L'examen à l'état frais permet l'observation de la morphologie des bactéries, leur mode de regroupement et leur mobilité. Ceci est valable en absence de toute fixation ou de coloration. On observe aussi la présence des leucocytes, des globules rouges et même des levures (Prékarski. A, 2011).

### \* **Technique :**

- L'écouvillon qui contient le prélèvement est imbibé dans un 1 ml d'eau physiologique stérile, agiter l'écouvillon à l'aide d'un agitateur.
- Déposer une goutte de la suspension sur une lame.
- Recouvrir la lame par une lamelle, observation au microscope optique à l'objectif (Gx40).

### \* **Lecture :**

On peut observer sous microscope photonique les éléments organisés suivants :

- ✓ **Leucocytes :** La pénétration des germes dans le corps stimule le système immunitaire d'où l'intervention des leucocytes ;

Le pus est également le résultat d'une réponse immunitaire cellulaire. Donc c'est très normal qu'il contient une très grande quantité de globules blancs sains ou lysés. Sa présence signifie une infection ;

- ✓ **Hématies :** La présence des hématies signifie une mauvaise condition de prélèvement ;
- ✓ **Germes :** On peut aussi observer dans le pus.
  - des Cocci de petites tailles, groupées en amas ou en chainettes et généralement immobiles.
  - des bacilles, mobiles ou immobiles.
  - des levures : germes immobiles de grandes tailles présentant un bourgeonnement.

### **L'examen après coloration :**

Si la plupart des bactéries peuvent être observés en suspension aqueuse, cette observation est grandement facilitée par l'application de colorants (Prékarski. A, 2011). Les colorations, réalisées sur des frottis séchés et fixés, sont :

- ✓ Coloration simple au bleu de méthylène :

### \* **Principe :**

Elle permet d'étudier les éléments cellulaires, la forme des bactéries (bacilles ou Cocci), leur disposition (chainette, grappe, isolée) et la présence de levures.

### \* **Technique :**

#### ➤ **Préparation du frottis :**

Déposer sur une lame propre 1 à 2 gouttes de prélèvement bien homogène à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puis on étale bien la goutte par un mouvement régulier et circulaire, on laisse sécher à l'air à température ambiante.

#### ➤ **Coloration :**

- Recouvrir le frottis avec le bleu de méthylène ;
- Laisser agir 5 à 10 min selon la concentration du colorant ;

## Annexes

---

- Rincer à l'eau de robinet et sécher la lame ;
- Ajouter une goutte d'huile à immersion puis observer au microscope optique à (Gx100).
- **Lecture** : Toutes les structures colorables sont bleues.

### 4.2.2.2 Coloration de Gram :

Une coloration différentielle permettant la division des bactéries en deux groupes Gram<sup>(+)</sup>, Gram<sup>(-)</sup>.

#### \* **Principe** :

Cette coloration permet une meilleure appréciation de l'aspect morphologique des bactéries, la coloration différentielle de Gram repose sur la composition des parois bactériennes en peptidoglycane et acides téchoïques (Prékarski. A, 2011).

#### \* **Technique** :

Préparation de frottis :

- Déposer au centre d'une lame propre une goutte d'eau physiologique.
- Prélever une petite colonie bien isolée et de la déposer sur la goutte puis l'étaler par mouvement circulaire.
- Fixer à la chaleur.
- Les différentes étapes de la coloration de Gram.

#### \* **Lecture** :

\* Les bactéries colorées en violet ont gardé leur coloration primaire grâce à leur paroi épaisse et pauvre en lipide, qui ne laisse pas l'alcool passer. Ce sont des bactéries à Gram positif.

\* Les bactéries colorées en rose ont perdu leur première coloration à cause de leur paroi riche en lipide, qui laisse diffuser l'alcool. Celui-ci à son tour décolore le contenu intracellulaire.

Ce sont des bactéries à Gram négatif.

### 3 Examen bactériologique :

#### \* **Principe**

Il permet la recherche et l'identification des différentes espèces bactériennes (Prékarski. A, 2011) (Varnam A.H, 2001).

#### -**Préparation de prélèvement** :

a) Enrichissement de prélèvement :

- ✓ Le pus : En introduisant chaque écouvillons dans un bouillant nutritif puis en l'incubant à 37°C / 24h pour favoriser la croissance des bactéries très faibles ou fragiles.
- ✓ Le lait : Introduire 1 ml de lait dans 9 ml de TSE (Tryptone Sel) pour avoir une dilution 10<sup>-1</sup>, ensuite on effectue des dilutions à partir de la première pour avoir les dilutions 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>...

b) Ensemencement du prélèvement sur milieu gélosé :

- Ensemencement à l'aide d'une pipette pasteur stérile la surface en stries serrés.

# Annexes

---

## **3-1 Identification des bactéries :**

En cas de culture bactérienne positive, on procède à leur identification par une étude biochimique et d'autres tests spécifiques.

### **\* Préparation de la suspension bactérienne :**

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur un milieu d'isolement, prélever à l'aide d'une pipette pasteur stérile quelques colonies parfaitement identiques.
- Décharger la pipette dans 10 ml d'eau physiologique stérile.
- Homogénéiser la suspension bactérienne.

### **□ Identification des bacilles à Gram négatif :**

Tests biochimiques classiques :

#### a) Recherche des enzymes respiratoires :

##### **Test d'oxydase :**

##### **\* Principe :**

Ce test permet la détection de « la phénylène diamine oxydase » ou « le cytochrome oxydase » ; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction (capable d'oxyder un réactif : le N-diméthyl paraphénylène diamine). Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air (Prékarski. A, 2011) (Varnam A.H, 2001).

##### **\* Technique :**

Le réactif peut se trouver sous deux formes :

- Soit en solution : sur une lame de verre, déposer un carré filtre et imbiber dans une solution fraîchement préparée de réactif.
- Soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif.

Dans les deux cas, écraser avec une effilure de pipette pasteur une colonie d'un germe à étudier sur ce papier.

##### **\* Lecture :**

- Oxydase positif : l'apparition d'une coloration rose-violet ;
- Oxydase négatif : incolore.

#### b) Mise en évidence du nitrate réductase (NR) :

**\* Principe :** L'utilisation du bouillon nitraté, permet la recherche d'un nitrate réductase, après la réduction du nitrate en nitrite, selon la réaction :



##### **\* Technique :**

- Ensemencer quelques gouttes d'inoculum dans le tube de bouillon nitraté ;
- Incuber à 35°C pendant 18 à 24 heures ;
- Après l'incubation, on ajoute 5 gouttes du réactif GRIESS : NRI, puis 5 gouttes du réactif GRIESS : NR II.

## Annexes

---

▪

### \* Lecture :

- S'il apparaît une coloration rouge cela signifie que le nitrate a été réduit en nitrite, la souche est dite NR positive ;
- Si le milieu reste incolore, on ajoute la poudre de Zinc, agiter, incliner le tube et laisser agir 5 minutes ;
- Si le milieu devient rouge, ce signifie que le nitrate n'a pas pu être réduit, la bactérie est NR négative ;
- Si le milieu reste incolore, il reste plus de nitrate, la bactérie est NR positive.

### c) Métabolisme glucidique :

⇒ Etude d'utilisation des trois sucre (Glucose-Saccharose-Lactose) sur milieu TSI :

### \* Principe :

Le milieu TSI apporte de façon simple de nombreux renseignements taxonomiques :

- Fermentation des trois sucres (Glu, Sac, Lac) ; ce qui entraîne une acidification du milieu, d'où le virage au jaune de l'indicateur du PH (rouge de phénol) ;
- La production de gaz : qui se manifeste par l'apparition des bulles d'air dans la gélose ;
- Production de H<sub>2</sub>S à partir du thiosulfate, en présence de sodium et de fer (III) dans le milieu.

### \* Technique :

- Ensemencer la pente par les stries et le culot par une piqure centrale et laisser le tube légèrement ouvert. Incuber à 35°C pendant 18 à 24 heures.

### Lecture

- **La pente :** - Couleur jaune : Lactose positif/Saccharose positif.  
- Couleur rouge : Lactose négatif/Saccharose négatif.
- **Culot :** - Couleur jaune : Glucose positif.  
- Couleur rouge : Glucose négatif.
- **Poche d'aire :** - Pas de poche : gaz négatif.  
- Noircissement du milieu : Production d'H<sub>2</sub>S.

⇒ L'utilisation de citrate :

- \* **Principe :** Le milieu citrate de Simmons est un milieu solide en pente, de couleur initiale verte. Il permet d'affirmer en cas de résultat positif (culture et virage de l'indicateur) l'utilisation du citrate comme seule source de carbone, dont la bactérie n'a pas besoin de facteurs de croissance, et cela entraîne une alcalinisation du milieu selon la réaction suivante [46] :



## Annexes

### \* Technique:

- Ensemencer la pente du milieu à l'aide d'une pipette pasteur chargée d'une suspension bactérienne par des stries longitudinales, ou en zigzag sur la partie inférieure. La partie supérieure servira de témoin. Ne pas visser le bouchon à fond pour permettre au CO<sub>2</sub> résultant de la décarboxylation de citrate de s'échapper. Incuber dans l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

### \* Lecture:

- Bactéries citrates perméases positives : virage du l'indicateur coloré de vert au bleu.
- Bactéries citrates perméases négatives : pas de changement de la couleur du milieu.

⇒ Dégradation de Mannitol sur un milieu mannitol mobilité :



Virage du milieu au jaune : mannitol(+)  
Positif

Garde sa couleur : Mannitol(-).  
Négatif

- ✓ Les bactéries immobiles croissent uniquement au long de la piqûre d'ensemencement
- ✓ Les bactéries mobiles diffuses à partir de la ligne d'ensemencement en créant un tourbillon.

### Résultats du Mannitol- mobilité

### \* Principe :

Le mannitol est le produit dérivé de D-mannose, sa dégradation est comparable à celle du glucose et conduit à la formation d'acides à chaîne très courtes. Le milieu mannitol permet d'étudier la dégradation du mannitol et la mobilité des germes bactériens.

### \* Technique :

A partir d'une suspension bactérienne, ensemencer le milieu jusqu'au fond du tube par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur.

⇒ Recherche d'enzyme intervenant dans le métabolisme glucidique :

### 1- La $\beta$ -gluctosidase ou test ONPG (Ortho Nitro Phényle $\beta$ -galactopyranosidase) :

### \* Principe :

Le  $\beta$ -galactosidase est une enzyme intracellulaire qui dégrade le lactose et le galactose.

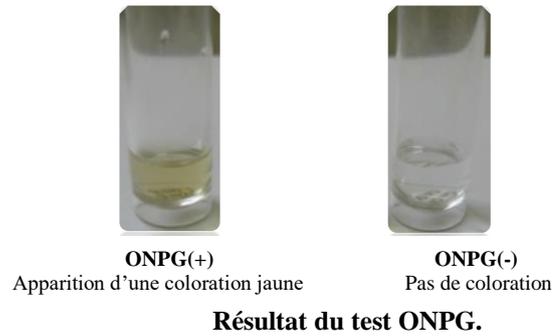
Une solution d'orhtonitrophenal- $\beta$ -galacto-pyranoside (disques ONPG) est incolore.

Cette molécule une fois dégradée par le  $\beta$ -galactosidase libère l'orhtonitrophenal qui donne la couleur jaune à la solution.

- \* **Technique :** Un disque imprégné d'ONPG est introduit dans un tube à essai contenant 0,5ml de la suspension bactérienne déjà préparée.

-incuber le tube dans l'étuve à 37°C durant 24h.

## \* Lecture



## 2- Détermination de la voie fermentaire :

### \* Principe :

Le milieu utilisé pour la détermination de la voie fermentaire est le milieu Clarck et Lubs qui permet l'étude de deux caractères (Prékarski. A, 2011) (Varnam A.H, 2001) :

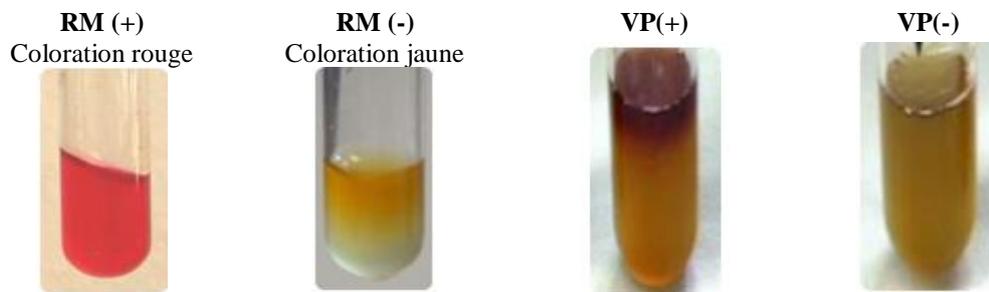
- ⇒ La fermentation d'acide mixte est mise en évidence par la réaction de Rouge de Méthyle (RM)
- ⇒ La fermentation de butylène glycolique est mise en évidence par la réaction de Voges Poskauer(VP).

### \* Technique :

Le milieu Clarck et Lubs est ensemencé à partir d'une suspension bactérienne et incubé à 37°C durant 24 heures.

Après incubation, on répartit le milieu dans deux tubes :

- ⇒ Dans le premier tube on ajoute quelques gouttes de RM.
- ⇒ Dans le deuxième tube on ajoute 10 gouttes de chaque réactif de VP (I) et VP(II).



**Test de détermination de la voie fermentaire**

## Annexes

---

### a) Métabolisme protidique :

⇒ Recherche de L'uréase, du tryptophane désaminase (TDA) et tryptophanase (Indole) :

#### \*Principe :

Le milieu urée-indole est un milieu synthétique, non nutritif, permet la recherche de trois activités enzymatiques :

- L'uréase : qui est une enzyme hydrolysant l'urée (molécule riche en azote) en ions ammonium et en carbonate.
- Le tryptophane désaminase : agit sur le tryptophane en donnant de l'acide indole pyruvique et de l'ammoniac, la réaction est lisible après addition du réactif de TDA (Prékarski. A, 2011) (Varnam A.H, 2001).

**Tryptophane + H<sub>2</sub>O** → **Acide indole - pyruvique + ammoniac.**

- La tryptophanase est un complexe multienzymatique qui permet aux micro-organismes de produire de l'indole à partir du tryptophane, après addition du réactif de kovacs.
- **Tryptophane + H<sub>2</sub>O** → **Indole + acide pyruvique ammoniac.**

#### \* Technique :

- Distribuer stérilement 1ml du milieu (urée-indole) dans deux tubes stériles T2, T3.
- Ensemencer chaque tube à partir de l'inoculum.
- Incuber à 35°C durant 18 à 24 heures.

#### \* Lecture :

**Uréease positif** : virage du milieu au rouge violet ou rose rouge.

**Indole** : ajouter dans le tube (T3) quelques gouttes de réactif de kovacs.

- ✓ **Indole positif** : anneau rouge en surface.
- ✓ **Indole négatif** : anneau brunâtre.

⇒ Tryptophane désaminase : ajouter quelques gouttes de réactifs de perchlorure de fer dans le tube (T2).

- ✓ **Réaction positif** : coloration brun-rouge.
- ✓ **Réaction négatif** : coloration jaune –orange.

⇒ Recherche des décarboxylases LDC, ODC, ADH :

#### \* Principe :

Ce sont des enzymes catalysant la décarboxylation ou la dihydrolyation d'acides aminés, avec production d'une amine et de dioxyde de carbone.

En utilisant des milieux synthétiques contenant les acides aminés (Lysine, Ornithine, Arginine), du glucose et un indicateur de PH de couleur initiale violet (Prékarski. A, 2011) (Varnam A.H, 2001).

#### Technique :

- Répartir 1ml de chacun des milieux contenant les acides aminés dans des tubes stériles, ainsi qu'un témoin qui ne contient que du glucose ;
- Ajouter dans chaque tube quelques gouttes de l'inoculum.

## Annexes

- Recouvrir la surface des milieux avec l'huile de vaseline stérile.
- Incuber à 35C° durant 18 à 24 heures.

### \* Lecture :

- Dans un premier temps, les bactéries fermentent le glucose entraînant l'acidification des milieux (virage du violet au jaune de l'indicateur de PH) ;
- Dans un second temps, lorsque les bactéries possèdent l'enzyme, les métabolites aminés formés à partir des aminoacides, alcalinisent les milieux et font virer l'indicateur de PH au violet.

- ✓ Virage au violet (alcalin) : résultat positif.
- ✓ Virage au jaune (acide) : résultat négatif.
- ✓ Le témoin doit être acidifié.

b) Système API « Analytical Profile Index » :

### \* Principe :

C'est une version miniaturisée des tests biochimiques classiques destinée à l'identification des Entérobactériaceae et autres bacilles à Gram négatif. Ce système regroupe 20 tests biochimiques réalisés dans des micro-tubes contenant des substrats déshydratés. Ces substrats sont mis en solution grâce à l'addition d'une suspension de la bactérie à identifier (Prékarski, A, 2011) (Varnam A.H, 2001).

Cupule

Microtube contenant le milieu déshydraté

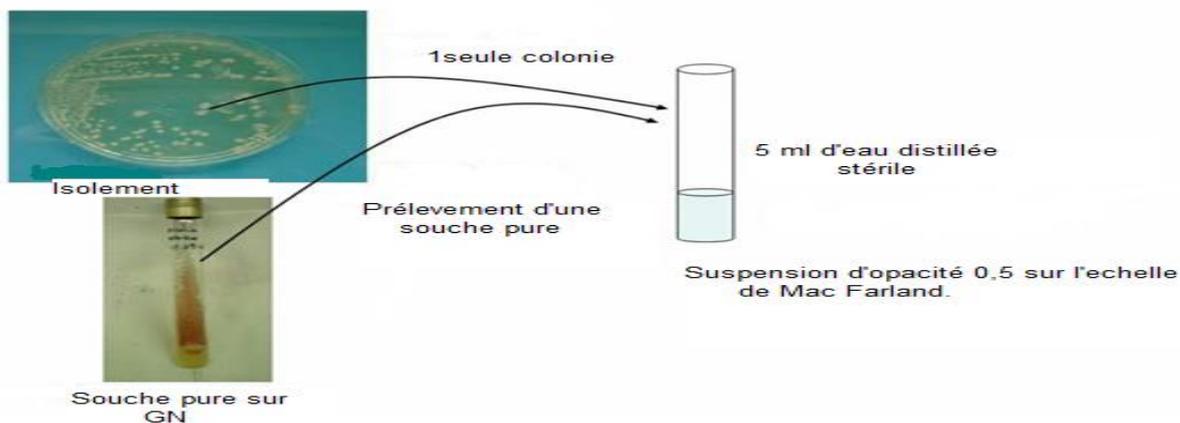


Galerie API 20<sup>E</sup> avant culture

### \* Technique :

#### Préparation de galerie :

- ✓ Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour une atmosphère humide.
- ✓ Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- ✓ Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.



### Technique de préparation de l'inoculum bactérien

- Déposer soigneusement la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide d'une pipette.
- Pour les tests CIT, VP et Gel remplir les tubes et les cupules, pour les autres tests, remplir uniquement les tubes et non les cupules.
- Pour les tests ADH, LDH, ODC, H<sub>2</sub>S, URE créer une anaérobiose en remplissant leurs cupules d'huiles de vaseline.
- Refermer la boîte d'incubation et placer à l'étuve à 37°C durant 24 heures.



Remplir de suspension le tube et la cupule (CIT, VP, GEL).



Remplir le tube de suspension et recouvrir d'huile de vaseline (ADH, ODC, LDC, H<sub>2</sub>S, UREE)

### \* Lecture :

Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et à partir d'un code d'identification composé de 7 chiffres. Ce code nous permet d'identifier avec le catalogue analytique le nom de l'espèce à laquelle est identifiée la bactérie.

### □ Identification des Cocci à Gram positif :

#### a) Recherche de catalase

### \* Principe :

Le test de catalase est un examen important pour identifier les micro-organismes, en particulier les bactéries à Gram positif. La catalase est utilisée par les micro-organismes aérobies pour se protéger des produits toxiques de la croissance en aérobiose (c'est-à-dire peroxyde d'hydrogène). L'enzyme de la catalase peut convertir le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Le Minor L et al, 1993).

### \* Technique :

- On enlève la colonie bactérienne de la gélose avec une anse en faisant très attention pour ne pas prendre de la gélose. On place cette colonie sur une lame de verre propre.

## Annexes

---

- On dépose une goutte à 3% de peroxyde d'hydrogène sur la colonie bactérienne : la réaction positive est indiquée par des bulles qui se produisent en 10 secondes.

- ★ **Lecture :**

- ✓ **Réaction positive :** Formation de bulles (exemple : *Staphylococcus*).
- ✓ **Réaction négative :** Aucune formation de bulles en 10 seconde (exemple : *Streptococcus*).

- b) Recherche de coagulase :

- ★ **Principe**

Le test de coagulase est utilisé pour séparer les *Staphylococcus aureus* de tous autres *Staphylococcus* (exemple : *Staphylococcus* à coagulase négatif appelé aussi *Staphylococcus spp*). Ceci est une distinction importante parce que *Staphylococcus aureus* est l'espèce de *Staphylococcus* responsable de la plupart des infections.

La coagulase est l'enzyme qui permet la coagulation de plasma de lapin par transformation du fibrinogène en fibrine.

- ★ **Technique :**

- Mettre environ 0,5ml de plasma pour coagulase dans un tube sec ;
- Collecter avec une pipette plusieurs colonies bactériennes et les mettre en suspension dans le plasma de lapin ;
- Placer le tube dans l'incubateur et l'examiner après 2 heures ,4 heures, et 24 heures (si la réaction est positive au bout de 2 ou 4h, il n'est plus nécessaire d'incuber plus longtemps).

- ★ **Lecture :**

- ✓ **Réaction positive :** Gélification du plasma.

Ceci peut apparaître comme une masse flottante dans le tube ou bien le plasma en entier formera un gel permettant au tube d'être complètement renversé.

⇒ Chacune de ces réactions est considérée comme positive.

- ✓ **Réaction négative :** pas de prise en masse du plasma au bout de 24heures.

### 3- Antibiogramme :

- ★ **Principe :**

L'antibiogramme est souvent réalisé en milieu hospitalier pour étudier la sensibilité et la résistance des bactéries vis-à-vis des divers antibiotiques testés, afin de connaître l'antibiothérapie efficace.

- Technique :**

La méthode que nous avons utilisée est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé par le NCCLS et recommandé par l'OMS.

- ★ **Milieu :**

- Gélose Muller Hinton, coulée en boîte de pétri sur une épaisseur de 4mm : pour les bactéries non exigeantes.

## Annexes

---

- Gélose Muller Hinton additionnée de 5% de sang de cheval : pour les bactéries exigeantes.
- Les géloses sont pré-séchées avant l'emploi.

### \* Inoculum :

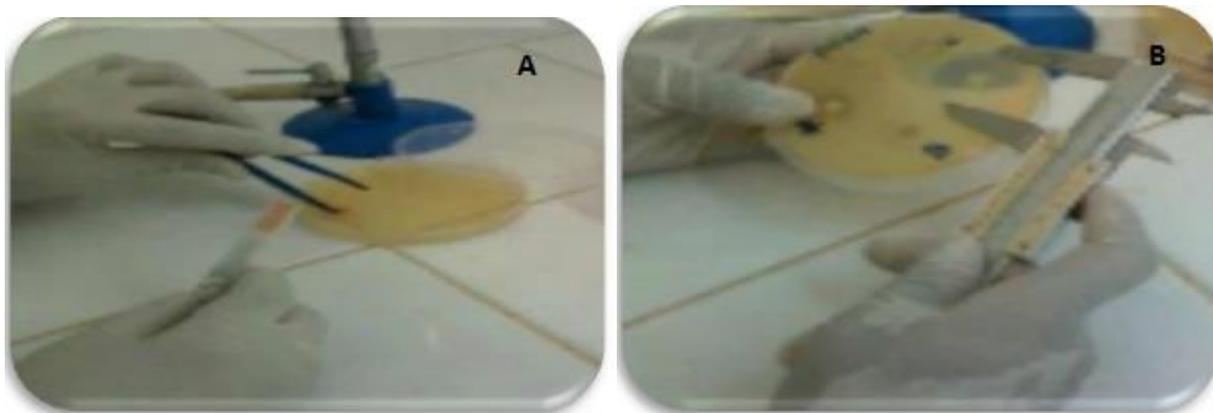
- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette pasteur stérile quelques colonies identiques et bien isolée ;
- Déchargé la pipette dans 10 ml d'eau physiologique stérile ;
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mac farland (mesurer par le densitomètre) ;
- L'inoculum bactérien doit être ensemencé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

### \* Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum ;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées, répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. A la fin de l'ensemencement passer l'écouvillon sur la périphérie de la boîte (Le Minor L et al, 1993).

### \* Application des disques d'antibiotiques :

- Les disques d'antibiotiques sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince fine flambée, ou à l'aide d'un distributeur (il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'ATB sur une boîte de 90mm de diamètre (Figure 09A).
- Les disques d'ATB doivent être espacés de 24 mm, placés centre à centre.
- Incuber les boîtes dans l'étuve à 37C° durant 18 heures à 24heures.



A : Application des disques d'antibiotiques

B : Mesure du diamètre d'inhibition à l'aide d'un pied coulisse

### \* Lecture :

Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide de pied à coulisse (Figure 9B).

Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans la table de lecteur voir

Classer les bactéries isolées dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire, résistante.

## 4- Vérification de la pureté du miel

La pureté de miel dépend de la dissolution totale de miel lorsqu'il n'y a pas des additifs artificiels (surtout les sucres). La pureté dépend de la teneur limitée en sucre lorsqu'il y a une oxydation partielle au cours d'une exposition au feu. Il existe quelques tests simples qui permettent de vérifier la pureté du miel :

- a. Test de dissolution :** Obtenir un verre d'eau et une cuillère à soupe de miel sont tout le nécessaire pour le premier test.

Vider le miel dans l'eau. Si le miel est impur, il se dissoudra dans l'eau, si il est pur, le miel se coller ensemble et évier comme une masse solide au fond du verre.

- b. L'essai à la flamme :** Ce test est meilleur, si vous n'avez pas beaucoup de miel à revendre.

- Obtenir un briquet et une bougie avec une mèche de coton.
- Trempez la mèche de coton dans un peu de miel, et secouer l'excédent.
- Allumer la mèche. Si le miel est brûlé, il est pur. S'il refuse de brûler, alors il est moins pur.

### 4.1 Etude du pouvoir antibactérien du miel

La méthode d'évaluation du pouvoir antimicrobien de miel a porté sur une technique standard simple, rapide, économique.

#### A. Préparation de la gélose

- ✓ Placer les flacons de milieu gélosé dans un bain marie de manière à faire fondre le milieu.
- ✓ Laisser au bain-marie jusqu'à ce que le milieu soit bien liquide.
- ✓ Couler les géloses dans le fond de la boîte de Pétri (une épaisseur de 4mm) près d'un bec bunsen.
- ✓ Laisser sécher.

#### B. Repiquage et préparation de l'inoculum

- ✓ Les souches ont été repiquées par la méthode des stries, sur des milieux spécifiques :
  - 1- La bactérie à Gram- (*E. coli*) est repiquée sur le milieu Hektoen qui inhibe la croissance de la flore Gram+
  - 2- La bactérie à Gram+ (*Staphylococcus aureus*) est repiquée sur le milieu Chapman, caractérisé par sa forte teneur en NaCl et qui inhibe les bactéries Gram-.
- ✓ Puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeunes et des colonies isolées.
- ✓ A partir de ces colonies isolées racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies (une colonie pour *E. coli* et deux colonies pour *S. aureus*).
- ✓ Bien décharger l'anse dans 5 ml de sérum salé stérile pour chaque souche, dont la turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland qui est standardisé de  $10^6$  (UFC/ ml).
- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

## Annexes

### C. Préparation et stérilisation des disques

- ✓ En se servant d'un perforateur de papier, des disques de 5 mm de diamètre ont été découpés sur un papier filtre.
- ✓ Une fois découpés, les disques ont été mis dans une boîte de Pétri et stérilisés au four Pasteur à 160°C pendant 1 heure.

### D. Antibiogramme

L'antibiogramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), la résistance et la sensibilité des bactéries vis-à-vis des divers antibiotiques testés afin de connaître l'antibiothérapie efficace. La sensibilité aux antibiotiques est étudiée par l'antibiogramme.

Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.

Code	Antibiotique
CN	Céfaloquine
AMC	Amoxicilline + AC. Clavulanique
SXT	Sulfaméthoxazole
GEN	Gentamicine



Application des disques d'antibiotiques.

### E. Technique

- 1000 ul de chaque suspension bactérienne préalablement préparée est ensemencée par inondation sur des boîtes de pétri contenant la gélose Muller-Hinton.
- Laisser sécher à l'étuve pendant 15 minutes.
- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques sur une boîte de 90 mm.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile et ne pas déplacer les disques après application.
- Laisser à température ambiante (temps pour que les antibiotiques diffusent dans le milieu avant démarrage de la culture).
- Les boîtes sont incubées 24 h à 37°C.

### F. La lecture

Elle consiste à mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition qui apparaissent autour des disques à l'aide d'une règle graduée. Une bactérie est considérée sensible si le diamètre de la zone

## Annexes

---

d'inhibition est supérieur à 1 cm. et elle est résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 1cm. La sensibilité est intermédiaire si le diamètre est égal à 1cm.

### G. Préparation des disques du miel pur

- Des disques antibiogrammes de 5 mm de diamètre ont été découpés dans du papier filtre stérilisés à chaleur sèche et ensuite plongés dans le miel pur pendant quelques heures.
- Les disques étaient ensuite séchés à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.
- **Technique**
  - Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum de chaque bactérie.
  - L'essorer en le pressant fermement contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
  - Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée en stries serrées.
  - Répéter l'opération 2 fois pour chaque boîte 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 chaque gélose.
  - Laisser sécher à température ambiante pendant 15 minutes.
  - Presser chaque disque stérile du miel à l'aide d'une pince stérile sur le milieu et ne pas déplacer les disques après application.
  - L'incubation se faisait à 37°C pendant 24 heures ou 48 heures.
- **La lecture :**

La présence ou l'absence de zone d'inhibition renseigne sur l'activité du miel pur vis-à-vis du germe concerné.

**H. Préparation des disques du miel dilué :** nous avons effectué des dilutions de  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  en utilisant le DMSO ( Diméthylsulfoxyde) comme solvant.

### I.3.4 1- Les étapes de l'étude histologique

Les glandes mammaires de vaches laitières prélevées devront subir plusieurs étapes pour finir dans une lame fixée afin de pouvoir observer les dommages potentiels des tissus.

Il existe 5 étapes pour réaliser une coupe histologique :

#### a) Fixation

Cette première étape commence directement après avoir prélevé l'organe (glande mammaire), son rôle est la conservation des différents tissus de l'organe, elle prévient l'autolyse cellulaire, prévient aussi la putréfaction bactérienne et permet la technique histologique et les colorations ultérieures. Nous avons utilisé du formol à 35%.

#### b) Inclusion

Le principe de l'inclusion est d'avoir une consistance rigide aux tissus, afin de réaliser des coupes très fine pour permettre le passage de la lumière à travers le tissu, dans le but d'avoir une bonne observation

## *Annexes*

---

microscopique. L'inclusion en paraffine comporte à l'infiltration et à l'enrobage des tissus à examiner avec de la paraffine. Nous procédons avant cet enrobage de deux étapes obligatoires. La première étape est la déshydratation où on va passer les tissus dans des bains d'alcool de degré croissant (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°), l'intérêt de la déshydratation est d'éliminer le fixateur. A la deuxième étape, nous passons au bain toluène qui est un solvant miscible à la paraffine pour remplacer l'alcool. Enfin le tissu est placé dans de la paraffine fondue, la chaleur va accélérer l'évaporation du solvant, placée ensuite dans de petits moules, à température ambiante, elle va durcir, nous démoulons pour obtenir des fractions de tissus de la paraffine.

A l'aide d'un microtome, on effectue des coupes. Le microtome fait avancer le bloc sur un couteau, les coupes mesurent environ 5 µm, l'ensemble des tranches vont former un ruban dans lequel on retrouve des coupes de prélèvement tissulaire. On fait un étalement des coupes sur des lames de verre, on chauffe sur une plaque chauffante la paraffine va coller à la lame.

### **c) Coloration**

La coloration la plus utilisée est hématoxyline/éosine/safran (HES). L'hématoxyline est une substance basique, qui colore les noyaux en violet donc colore les acides nucléiques. L'éosine est une substance acide, qui colore en rose les cytoplasmes, c'est la coloration des protéines. Le safran colore les fibres de collagène en jaune. Avant la coloration, il y a un déparaffinage, on passe les lames dans des bains de toluène. Ensuite c'est la réhydratation : l'alcool se mélange avec l'eau et le toluène, on passe les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (de 100° à 70°).

### **d) Montage**

Les lames sont déshydratées grâce à des bains en toluène, puis on colle des lamelles de verre par-dessus grâce à des résines synthétiques pour préserver les préparations. Ces lames peuvent être conservées pendant plusieurs d'années (Dadoune J.P, 2006).

## Le test de mammite de Californie (CMT)



Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine  
Canadian Bovine Mastitis Research Network



Le test de mammite de Californie (CMT - *California Mastitis Test*) est une façon rapide, simple et économique de détecter les infections subcliniques dans un quartier. Il donne une indication sur la quantité de cellules somatiques présentes dans le lait. Le test CMT ne réagira de façon visible qu'à partir d'un taux de 400 000 cellules et plus.

Le réactif est composé d'un détergent et d'un indicateur de pH. Lorsqu'il est mélangé avec le lait, il réagit avec les cellules pour former un gel visqueux. Plus il y a de cellules somatiques dans le lait, plus le mélange sera épais et visqueux. Le changement de couleur indique la variation du pH du lait et donc le degré d'inflammation.

Le CMT peut être utilisé :

- Pour vérifier le statut d'une vache que l'on veut acheter.
- Pour sélectionner le ou les quartier(s) à analyser et à traiter lorsque le CCS d'une vache est élevé.
- Pour détecter la présence d'infections subcliniques au début ou durant la lactation dans le cadre d'un programme de gestion de la santé du pis.

**Matériel nécessaire : une palette de CMT, le réactif et des gants.**



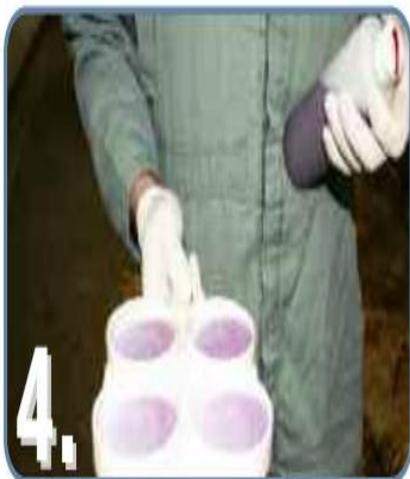
1. Assurez-vous que les trayons sont exempts de débris. Vérifiez la présence de lait anormal à l'aide d'une tasse-filtre.



2. Adoptez toujours la même position pour tenir la palette sous le pis afin de faciliter le repérage des quartiers lors de l'interprétation. Recueillez du lait de chaque quartier dans le godet correspondant.



3. Inclinez la palette pour jeter le trop-plein. Conservez juste assez de lait pour que le



4. Mélangez bien le réactif et le lait par un mouvement circulaire pendant 10 à 30 secondes.



5. Interprétez immédiatement le test pour chaque quartier :

- 1) en poursuivant le mouvement circulaire pour voir l'épaississement;
- 2) en l'inclinant d'un côté à l'autre, puis en versant le mélange.

niveau atteigne le plus grand cercle concentrique. Repositionnez la palette afin que le niveau de lait soit à mi-chemin entre les deux cercles.



2) Ajoutez un volume de réactif équivalent à la quantité de lait en remplissant le godet jusqu'au cercle central.



## 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)
	<b>N</b>	<b>Négatif</b>	Le mélange demeure liquide et homogène. Le godet se vide goutte à goutte.	<b>0 – 200 000</b>
	<b>T</b>	<b>Trace</b>	Le mélange devient légèrement visqueux. La réaction est réversible, la viscosité tend à disparaître.	<b>150 000 – 500 000</b>
	<b>1</b>	<b>Faiblement positif</b>	Le mélange devient visqueux sans formation de gel au centre et la viscosité tend à persister. Le mélange quoique épais, se vide graduellement.	<b>400 000 – 1 500 000</b>
	<b>2</b>	<b>Clairement positif</b>	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.	<b>800 000 – 5 000 000</b>
	<b>3</b>	<b>Fortement positif</b>	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.	<b>&gt; 5 000 000</b>
	<b>+</b>	<b>Alcalin</b>	On ajoute ce symbole si la réaction est distinctement alcaline indiquée par une coloration mauve intense.	
	<b>A</b>	<b>Acide</b>	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.*

Crédits photos :

Page 1 - RCRMB, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal.

Page 2 - Tirées du livre « Moins de mammite, Meilleur lait » (Pierre Lévesque, 2004), distribué par la Fédération des producteurs de lait du Québec.

Ce document peut être reproduit en version intégrale seulement, à des fins éducationnelles, sans autre permission, si les crédits sont accordés au RCRMB.

[www.reseaumammite.org](http://www.reseaumammite.org)

