



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

**Contribution à l'étude des mammites
(Cliniques et Subcliniques) à staphylocoques chez la
chèvre dans la wilaya de Tizi-Ouzou**

Réalisé par :

M^{elle} BENTAYEB Lamia

Soutenu le : 30 Juin 2016

Devant le jury :

Président :	MENEOUIRI N.	M.C.A.	ISV Blida
Examineur :	YAHIA A.	M.C.B.	ISV Blida
Examineur :	SAIDI R.	M.C.A.	Univ Laghouat
Promoteur :	AKKOU M.	M.A.A.	ISV Blida
Co-promoteur :	FERDJI A.	Assistant	UMMTO

Année : 2015/2016

Remerciements

Avant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « ALLAH le Tout Puissant », pour m'avoir donné la volonté, la santé et la patience afin de réaliser et achever ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon promoteur, **D^r AKKOU Madjid**, Maître assistant A, à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir prêté main forte durant la réalisation de ce travail. Il fut pour moi un promoteur attentif ; sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. J'ai clairement vu en lui le professionnel qui aimait avant tout son activité et travaillait par plaisir et non pas pour gonfler un égo personnel.

Mes vifs remerciements vont de même à mon co-promoteur, **D^r FERDJI Abdelkrim**, Assistant à l'université de Tizi-Ouzou, pour m'avoir indiqué la conduite à suivre pour que les choses se déroulent de manière optimale, ainsi que pour sa présence et son aide lors de mes premières sorties sur le terrain.

Que **M^r MENEUIRI Nabil**, Maître de conférences classe A, à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, soit vivement remercié pour l'intérêt qu'il a accordé au sujet et pour avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus chaleureux à, **D^r YAHIA Achour**, Maître de conférences classe B, à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, pour avoir fait l'honneur d'accepter l'évaluation de mon travail.

Je tiens aussi, à exprimer mes chers remerciements à **D^r SAIDI Redouane**, Maître de conférences classe A, à l'université de Laghouat, pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

Je réitère tous mes remerciements et ma reconnaissance à mon père, mes frères : Samir et Chafik ainsi que **D^r IDDOU Yacine**, **D^r SAADI Madjid** et **D^r HAMMOUNI Rabah**, pour l'excellente contribution qu'ils ont apporté à ce labeur et vous prie d'agréer mes meilleures salutations.

Je remercie également **D^r MEBKHOUT Faiza** ; ces faveurs dont elle m'a gratifié m'ont été d'une très grande aide tant matériel que moral, ses judicieux conseils et l'attention particulière qu'elle a eu pour moi.

C'est aussi pour moi un plaisir autant qu'un devoir, d'exprimer ma gratitude et reconnaissance au **Professeur TAZIR Mohammed**, chef de service du laboratoire de microbiologie à l'hôpital Mustapha Bacha, de m'avoir accueilli à bras ouverts au sein de son laboratoire ainsi que pour la liberté d'action qu'il m'a donné à chaque étape de la réalisation de ce travail.

Je veux exprimer ma reconnaissance à tout le personnel du laboratoire que j'ai été amené à côtoyer durant mon stage et particulièrement à **D^r BECHTARZI Mohammed**, dont l'intervention m'a apporté une grande sérénité et j'ai grandement apprécié de pouvoir ainsi être soulagée d'une partie de la pression inhérente à l'accomplissement de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aux biologistes **Djazia** et **Soumia** pour leur aide et leur générosité à mon égard.

Dédicaces

**En hommage et à la mémoire de mes grands
parents**

**A mes très chers parents, sources de mes joies,
secrets de ma force. C'est à vous que je dois le
mérite pour ce que je suis devenue aujourd'hui.
Puisse Dieu le Tout Puissant, vous préserver et
vous accorder santé, longue vie et bonheur.**

**A mon très cher oncle et à toute sa famille.
Recevez à travers ce travail, toute ma gratitude,
mon estime et mes profonds sentiments.**

**A mes frères, vous qui n'avez cessé d'être pour
moi des exemples de persévérance, de courage et
de générosité.**

**A ma sœur, son mari et mon petit neveu adoré,
en témoignage de l'attachement, l'amour et de
l'affection que je porte pour vous.**

**A tous ceux que j'aime et qui croient toujours en
moi...**

**Enfin, à toute personne qui reste convaincue que
l'effort sincère et honnête est la seule voie vers la
réussite et la réalisation de soi.**

LAMIA

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumés

A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction générale	1
I. Les infections intramammaires chez la chèvre	2
I.1. Les mammites chez la chèvre : définition et importance	2
I.2. Types de mammites.....	2
I.3. Méthodes de diagnostic	3
I.3.1. Diagnostic clinique	3
I.3.1.1. Test au bol de traite ou du filtre	4
I.3.1.2. Test d'homogénéité.....	4
I.3.2. Diagnostic expérimental	4
I.3.2.1. Méthodes directes de dénombrement des cellules du lait.....	4
I.3.2.2. Méthodes indirectes de dénombrement des cellules du lait.....	4
I.3.3. Diagnostic étiologique	5
I.3.4 Diagnostic bactériologique	6
I.3.5. Autres méthodes	6
I.4. Prévalence des infections intramammaires chez la chèvre	7
I.4.1. Prévalence des mammites subcliniques.....	7
I.4.2. Prévalence des mammites cliniques	8
I.5. Facteurs de risque d'une infection intramammaire chez la chèvre	8
I.5.1 Facteurs liés à la traite	9
I.5.2 Facteurs liés à l'habitat	10
I.5.3. Facteurs liés à l'alimentation	10
I.5.4. Injections intramammaires	10
I.5.5. Facteurs divers	10
I.6. Etiologie des mammites caprines	11
I.6.1. Classification des agents pathogènes.....	11
I.6.2. Etiologie des mammites cliniques	11
I.6.3. Etiologie des mammites subcliniques.....	13
1.7. Traitement des mammites chez la chèvre.....	13
II. Caractérisation phénotypique et moléculaire des staphylocoques	15

II.1. Taxonomie et écologie des <i>Staphylococcus spp.</i>	15
II.1.1 Taxonomie.....	15
II.1.2. Habitat	15
II.2. Caractères bactériologiques	15
II.2.1. Caractères morphologiques	15
II.2.2 Caractères biochimiques	16
II.3. Facteurs de virulence et pouvoir pathogène.....	16
II. 3.1. Pouvoir pathogène.....	16
II.3.2. Facteurs de virulence.....	17
II.4. Caractéristiques des mammites à SCP et SCN chez la chèvre	20
II.5. Résistance aux antibiotiques des staphylocoques chez la chèvre	21
II.6. Typage moléculaire de <i>S. aureus</i>	21
B. PARTIE PRATIQUE	
I. Objectif de l'étude	22
II. Matériel et méthodes	22
II.1 Matériel	22
II.2. Méthodes.....	23
II.2.1. Population d'étude et échantillonnage	25
II.2.1.1. Description de la wilaya d'étude	25
II.2.1.2. Présentation des régions	25
II.1.2.3. Echantillonnage	26
II.1.2.4. Détermination de la taille de l'échantillon	26
II.2. Enquête sur les mammites au sein des élevages	27
II.2.1. Prospection des élevages	27
II.2.2. Examen clinique des mamelles	27
II.2.3. Dépistage des mammites subcliniques.....	27
II.2.4. Collecte des prélèvements.....	28
II.3. Isolement et caractérisation phénotypique des souches de staphylocoques	30
II.3.1. Identification des staphylocoques	30
II.3.2. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	34
II.3.3. Conservation des souches.....	37
II.4. Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de staphylocoques	37
II.4.1. Confirmation des souches au Walk Away	37
II.4.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	38

II.4.2.1. Extraction chaud-froid de l'ADN	38
II.4.2.2. Amplification de l'ADN	40
II.4.2.3. Révélation des amplifiats.....	44
II.5. Synthèse des données et analyse statistique.....	45
III. Résultats	45
III.1. Etude de l'échantillonnage	45
III.1.1. Distribution géographique des échantillons.....	45
III.1.2. Description et évolution de l'échantillonnage au sein des fermes.....	45
III.2. Enquête sur les mammites caprines au sein des élevages	46
III.2.1. Epidémiologie descriptive des mammites	46
III.2.1.1. Prévalence des mammites chez les chèvres	46
III.2.1.2. Distribution clinique et subclinique des mammites	46
III.2.2. Facteurs de variation de la prévalence	47
III.2.2.1. Variations géographiques de la prévalence.....	47
III.2.2.2. Variations inter-cheptels de la prévalence des mammites	48
III.2.2.3. Variations (intrinsèques) individuelles.....	48
III.2.2.4. Facteurs extrinsèques de variation des mammites	49
III.3. Analyse bactériologique et isolement de <i>Staphylococcus</i>	49
III.3.1. Résultats globaux	49
III.3.2. Impact des staphylocoques sur la santé de la mamelle.....	50
III.3.3. Espèces de staphylocoques impliquées en mammites caprines.....	50
III.3.4. Prévalence des <i>Staphylococcus</i> impliqués en mammites caprines	51
III.3.5. Répartition des staphylocoques en mammites clinique et subclinique.....	51
III.3.6. Variations géographiques.....	52
III.3.7. Isolement des staphylocoques au niveau des fermes	52
III.4. Résistance aux antibiotiques et typage moléculaire	53
III.4.1. Résistance aux antibiotiques	53
III.4.2. Typage moléculaire des souches <i>S. aureus</i>	54
III.4.2.1. Recherche du gène <i>gyr</i>	54
III.4.2.2. Typage <i>agr</i>	55
III.4.2.3. Recherche de la <i>pvl</i> et <i>tsst</i>	55
III.4.2.4. Récapitulatif d'analyse moléculaire	56
IV. Discussion	57
IV.1. Protocol d'étude et biais de conception.....	57

IV.1.1. Constitution de l'échantillon animal et biais de l'échantillonnage.....	57
IV.1.2. Critères d'inclusion et qualité de données	57
IV.2. Enquête sur les mammites caprines au sein des élevages	58
IV.2.1. Prévalence et importance des mammites	58
IV.2.2. Variations clinique et subclinique	58
IV.3. Analyse bactériologique et isolement des staphylocoques.....	58
IV.3.1. Culture bactérienne	58
IV.3.2. Prévalence globale des mammites à staphylocoques.....	59
IV.3.3. Fréquence des espèces impliquées.....	59
IV.4. Résistance aux antibiotiques et typage moléculaire	61
IV.4.1. Résistance aux antibiotiques.....	61
IV.4.2. Recherche de la <i>pvl</i>	61
IV.4.3. Typage <i>agr</i> et recherche de la <i>tsst</i>	62
Conclusion générale	63
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
µm	Micro-mètre.
ADH	Arginine Dihydrolase.
ADN	Acide Désoxy-ribonucléique
<i>agr</i>	Les gènesaccessoirs de régulation “Accessory Gene Regulator”.
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché.
ARN	Acide Ribonucléique.
ATB	Antibiotique.
CAEV	Caprine Arthritis Encephalitis Virus.
CCS	Comtage de Cellules Somatiques
CFU	Unité formant colonie “ Colonyformingunits ”.
<i>Chips</i>	ChemotaxisInhibitory Protein of Staphylococci.
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
CMT	Californian Mastitis Test.
<i>gyr</i>	La gyrase.
mL	Millilitre.
nM	Nanomètre.
OMS	Organisation Mondiale de la Santé.
PCR	PolymeraseChain Reaction.
<i>pvl</i>	La Leucocidine de Pantan et Valentine “ Panton-Valentine Leukocidin ”.
<i>Scin</i>	Staphylococcalcomplementinhibitor.
SCN	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative.
SCP	Staphylococcus à coagulase positive.
<i>tsst</i>	La toxine du syndrome de choc toxique“ Toxic of the Syndrome of ShockToxic ”.

Liste des figures

Figure	Intitulé	Page
01	Equilibre des facteurs de risque et échelle de santé continue.	9
02	Coupe schématique de l'extrémité du trayon.	10
03	Etiologie des mammites subcliniques chez la chèvre.	13
04	Répartition des différentes communes d'étude de la wilaya de Tizi-Ouzou.	25
05	Technique de réalisation du CMT.	27
06	Degrés de la réaction teepol-lait.	27
07	Dépistage des mammites clinique et subclinique.	28
08	Dépistage des mammites subcliniques et technique de prélèvement du lait.	29
09	Ensemencement des échantillons de lait.	30
10	Technique de la recherche de la catalase.	30
11	Etapas de réalisation du test à la coagulase.	31
12	Préparation et incubation des galeries API Staph.	32
13	Lecture des galeries API Staph.	33
14	Préparation des suspensions bactériennes pour antibiogramme.	34
15	Préparation des boîtes, des écouvillons et des suspensions pour antibiogramme.	34
16	Application des disques et incubation des boîtes à 35.5°C et 30°C pour P et OXA.	35
17	Estimation des diamètres des zones d'inhibition.	35
18	Matériel pour analyse au Walkaway.	37
19	Préparation des plaques PC 31.	37
20	Etapas de mélange de l'eau PPI et des colonies <i>S. aureus</i> dans des eppendorf.	38
21	Centrifugation des eppendorf et récupération du culot.	38
22	Passage dans la glace après 10 min à 100°C.	39
23	Récupération du surnageant dans des eppendorf portant les même références.	39
24	Mélange des MIX avec l'ADN extrait dans des eppendorf.	40
25	Le mélange MIX-ADN dans le thermocycleur.	40

26	Préparation du gel d'agarose avec le BET	41
27	Préparation du gel d'agarose sur support d'électrophorèse.	42
28	Dépôt des 100 paires de bases sur le gel d'agarose.	42
29	Dépôt des amplifiats après coloration dans le gel d'agarose.	43
30	Migration des amplifiats à 130 volts pendant 45min.	43
31	Révélation des amplifiats de PCR après migration.	44
32	Représentation de l'évolution de l'échantillonnage animal au sein des fermes visitées.	46
33	Représentation des prévalences individuelles intra-cheptel des mammites caprines.	48
34	Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes <i>gyr</i> chez les souches <i>S. aureus</i> issues de mammites caprines.	55
35	Analyse des produits de PCR pour l'identification des groupes spécifiques d' <i>agr</i> à partir des souches <i>S. aureus</i> issues de mammites caprines. Voie T+ : contrôle positif, T- : contrôle négatif, et 100pb : 100 paires de bases.	55
36	Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats de PCR des gènes <i>tsst</i> et <i>pvl</i> chez les souches <i>S. aureus</i> issues de mammites caprines.	56

Liste des tableaux

Tableau	Intitulé	Page
01	Les zoonoses potentielles transmises par le lait de chèvre.	2
02	Test au Teepol : mesure de la concentration cellulaire et degré de réaction de CMT.	5
03	Prévalence et étiologie des mammites subcliniques de la chèvre.	8
04	Infections cliniques les plus courantes à staphylocoques coagulase +	17
05	Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans les mammites staphylococciques	18
06	Gènes codants des facteurs de virulence potentiels associés aux souches de mammite.	19
07	Liste des antibiotiques utilisés pour l'analyse de la résistance des souches.	33
08	Répartition géographique des échantillons au sein de la population d'étude.	45
09	Echantillonnage animal au sein des fermes visitées.	45
10	Prévalences cheptel, individuelle et quartier de mammites chez les chèvres.	46
11	Prévalences quartier et individuelle des mammites chez les chèvres visitées.	47
12	Variations géographiques de la prévalence individuelle des mammites de chèvre.	47
13	Variations géographiques de la prévalence quartier des mammites chez les chèvres.	47
14	Variations de la survenue intra-cheptel des mammites cliniques et subcliniques chez les chèvres.	48
15	Variations inter-quartiers de la prévalence des mammites cliniques et subcliniques.	49
16	Description des facteurs de risque potentiels associés aux mammites à l'échelle individuelle (chèvre).	49
17	Nombre des espèces bactériennes isolées par échantillon de lait mammiteux.	50
18	Fréquence d'isolement bactérien des laits issus de quartiers mammiteux.	50
19	Espèces de staphylocoques isolées dans les laits mammiteux de chèvre.	51
20	Prévalences de <i>Staphylococcus</i> responsable de mammites chez la chèvre.	51
21	Prévalences des <i>Staphylococcus</i> impliqués en mammites cliniques et subcliniques.	52
22	Variations géographiques de la prévalence des mammites à <i>Staphylococcus spp.</i>	52
23	Prévalence et fréquence d'isolement de <i>Staphylococcus</i> des laits mammiteux.	53
24	Fréquence de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Staphylococcus spp.</i>	54
25	Profils de résistance des staphylocoques isolés en mammites caprines.	54
26	Typage moléculaire des souches <i>S. aureus</i> issues des infections intramammaires chez la chèvre.	56
27	Comparaison des fréquences d'isolement des staphylocoques aux mammites subcliniques chez la chèvre.	60

Résumé

Afin de définir les particularités des infections intramammaires à staphylocoques dans la wilaya de Tizi-Ouzou, nous avons procédé, dans 17 élevages, au dépistage de 266 chèvres. Sur les 532 quartiers étudiés 113 (21.2%) étaient atteints, dont 1,7% et 19.6% de mammites clinique et subclinique respectivement. La séparation des chevreaux de leurs mères et le lavage régulier avant la traite des mamelles ont été associés à des prévalences significativement élevées. La recherche des staphylocoques sur les échantillons de lait mammitique, a révélé un taux de positivité de 24.8% (28/113). La résistance des souches à la tétracycline, la pénicilline et l'acide fusidique est estimée à 25%, 21% et 10.7% respectivement. L'identification biochimique a permis la répartition des souches en : *S. aureus* (28.6%), *S. chromogenes* (14.3%), *S. epidermidis* (10.1%), *S. simulans* (10.1%), *S. haemolyticus* (7.1%), *S. lugdensis* (7.1%), *S. hyicus* (7.1%), *S. sciuri* (3.5%), *S. caprae* (3.5%), *S. xylosus* (3.5%) et *S. saprophyticus* (3.5%). Par ailleurs, des huit souches *S. aureus* analysées génotypiquement, quatre ont montré un profil "agrIII, tsst+, pvl⁻", trois de type agrI et une seule de type agrIV. Enfin, nos résultats indiquent que les mammites subcliniques chez la chèvre sont liées aux infections par les SCN au moment où *S. aureus* est associé aux mammites cliniques.

Mots clés : Chèvres, mammites, *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, agr, tsst, pvl.

Abstract

To define the characteristics of staphylococcal intra-mammary infections at the department district of Tizi-Ouzou, we proceed to the screening of 266 goats in 17 farms. Of the 532 studied mammary quarters 113 (21.2 %) showed mastitis within 1.7 % and 19.6 % rates for subclinical and clinical respectively. Kid's separations from their mothers, and regular washing of udders before milking were associated with significantly higher rates of infection. The isolation of staphylococci was observed in 24.8% (28/113) of mastitis derived milk samples. Resistance of these latter to tetracycline, penicillin and fusidic acid was estimated to 25%, 21% and 10.7% respectively. Biochemical identification listed the strains: *S. aureus* (28.6%), *S. chromogenic* (14.3%), *S. epidermidis* (10.1%), *S. simulans* (10.1), *S. haemolyticus* (7.1%), *S. lugdensis* (7.1%), *S. hyicus* (7.1%), *S. sciuri* (3.5%), *S. caprae* (3.5%), *S. xylosus* (3.5%) and *S. saprophyticus* (3.5%). Furthermore, 8 strains of *S. aureus* were sought for *gyr*, *agr*, *pvl* and *tsst* genes. PCR analyses showed the profile "AgrIII, tsst⁺ pvl⁻" in four *S. Aureus* strains, while agr I and agr IV patterns were observed in three and one isolates respectively. Finally, our results show that subclinical mastitis in goats is related to SCN infections while *S. aureus* is highly associated with clinical cases.

Key words: Goats, mastitis, *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, agr, tsst, pvl.

ملخص

لتحديد خصوصيات إصابة الضرع بالبكتيريا العنقودية في ولاية تيزي وزو، قمنا بفحص 266 ماعز، موزعة على 17 مزرعة.

أسفرت النتائج أنه من مجموع 532 نصف ضرع التي تم فحصها أن 113 منها، أي نسبة إجمالية مقدرة بـ 21.2% كانت مصابة، متمثلة في 1.7% و 19.6% من الإلتهابات المرئية و الغير مرئية على التوالي. فصل الجدي عن أمهاتهم و كذا التنظيف المنتظم للضرع قبل كل عملية حلب كانت مرتبطة بمعدلات إنتشار قصوى لهذه الإلتهابات.

البحث عن البكتيريا العنقودية في عينات من حليب إتهاب الضرع، كشف عن إيجابية مقدرة بنسبة 24.8% (113/28). مقاومة السلالات البكتيرية للتراسكلين، البنسلين و حمض الفوسيديك فُدرت بالنسب 25%، 21% و 10.7% على التوالي. كما سمحت تحاليل الكيمياء الحيوية بشطر السلالات و تصنيفها إلى: بكتيريا عنقودية ذهبية (28.6%)، بكتيريا عنقودية مولدة اللون (14.3%)، بكتيريا عنقودية بشروية (10.1%)، بكتيريا عنقودية سمولنز (10.1%)، بكتيريا عنقودية حالة للدم (7.1%)، بكتيريا عنقودية لقدنسز (7.1%)، بكتيريا عنقودية هيوكس (7.1%)، بكتيريا عنقودية سيوري (3.5%)، بكتيريا عنقودية عنزية (3.5%)، بكتيريا عنقودية كزِيلوزس (3.5%)، بكتيريا عنقودية مترممة (3.5%).

و علاوة على ذلك، فإن من أصل ثمانية بكتيريا عنقودية ذهبية، التي خضعت لدراسة وراثية، أربعة أظهرت لمحة من نوع "Agr III، pvl، tsst⁺"، ثلاثة من نوع "Agr I" و واحدة من نوع "Agr IV". وأخيرا، أن إتهابات الضرع الغير مرئية عند الماعز مرتبطة بالعدوى عن طريق البكتيريا العنقودية المخثرة (-)، في حين أن البكتيريا العنقودية المخثرة (+)، عنقودية ذهبية، مرتبطة بإلتهابات الضرع المرئية.

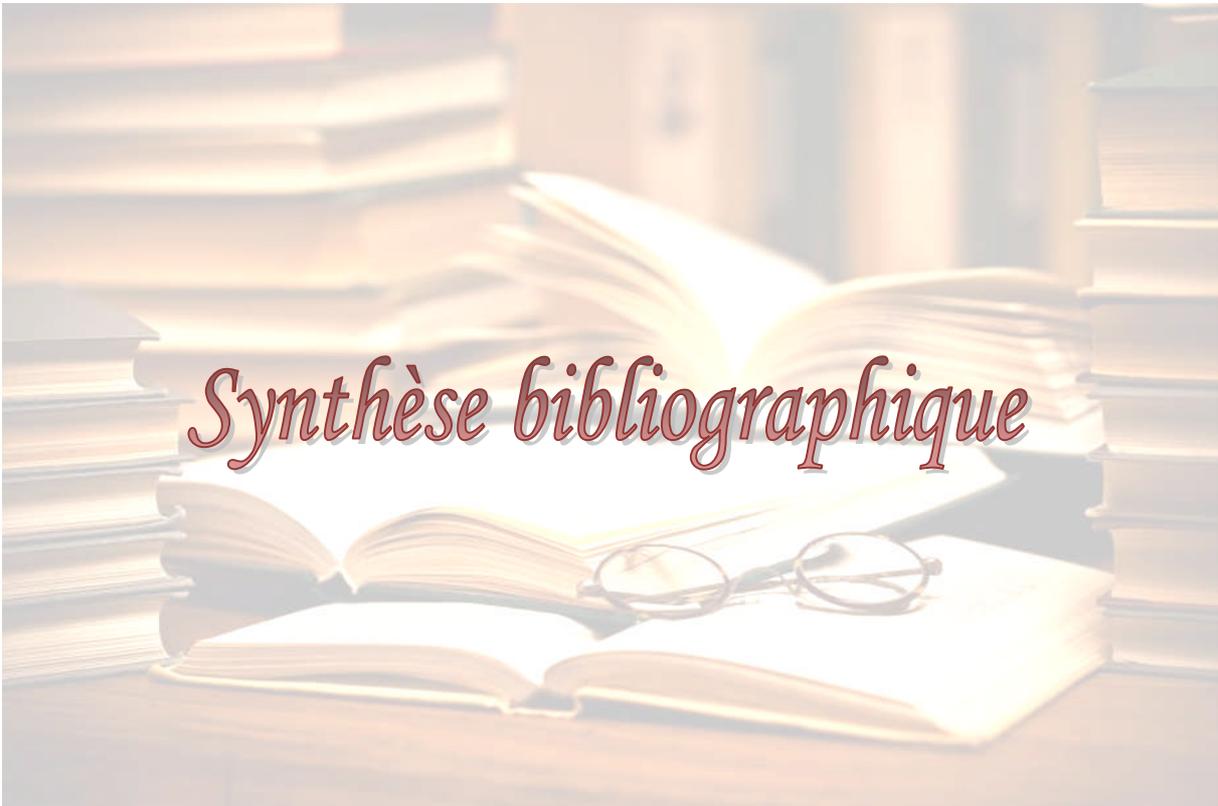
الكلمات المفتاحية: الماعز، إتهابات الضرع، البكتيريا العنقودية، البكتيريا العنقودية الذهبية، agr، pvl، tsst.

Introduction générale

La mammité est la pathologie la plus coûteuse et la plus importante dans l'industrie laitière. Elle se définit comme étant l'inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la glande mammaire, caractérisée par des changements physiques, chimiques et microbiologiques de la sécrétion lactée, ainsi que des modifications pathologiques dans le tissu mammaire (**Hanzen, 2015**). C'est une pathologie multifactorielle qui résulte de l'interaction de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques, en rapport avec les conditions de l'élevage et le mode de conduite du troupeau. De part l'incidence des mammites, la santé humaine peut se trouver compromise par la présence d'agents pathogènes et/ou des toxines dans le lait ainsi que des résidus d'antibiotiques résultant du traitement des mammites (**Chartier, 2009**). En effet, *S. aureus* demeure un des principaux pathogènes responsables de mammites chez les ruminants, quoique de façon très variable selon les pays et les régions.

L'élevage caprin fait partie des axes majeurs des projets de développement actuels, notamment en milieu montagnard : son ancrage traditionnel et l'excellente adaptation de ces animaux à leur environnement sont des bases solides sur lesquelles peuvent s'appuyer des initiatives nouvelles en Algérie, où leur nombre total est estimé à 4.594.525 (**Hammaz, 2014**). A notre connaissance, bien que les travaux sur les mammites bovines soient fréquents, les données relatives aux mammites à staphylocoques chez les caprins sont rares. Il est admis que les staphylocoques soient responsables de mammites contagieuses, dont la transmission est favorisée par un défaut d'hygiène de la traite en présence d'individus ayant des mamelles infectées. Chez la vache laitière, de 5 à 30% de mammites cliniques et de 5 à 10% de mammites subcliniques sont dues à *S. aureus* (**Poutrel, 1985**). Alors, qu'en est-il de la prévalence des infections intra-mammaires chez la chèvre, en Algérie ? Les staphylocoques sont-ils souvent impliqués, à quelle prévalence ? Quel est le niveau de résistance des souches de staphylocoques associées ? Les souches de *S. aureus* impliquées dans les mammites caprines sont-elles virulentes ? Quelle est leurs origines ? Autant de questions que nous nous sommes posés, c'est une optique préventive, car mieux vaut prévenir que guérir tardivement.

C'est dans ce contexte qu'il nous ait paru intéressant de mener une enquête épidémiologique sur les chèvres en lactation, en vue d'apprécier d'un côté, l'état de santé de leurs mamelles, en tenant compte des facteurs de risque liés à l'individu et à la conduite d'élevage ; et d'estimer d'un autre côté, la fréquence d'implication des staphylocoques ainsi que la virulence intrinsèque des souches *S. aureus*.



Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les infections intramammaires chez la chèvre

I. Les infections intramammaires chez la chèvre

I.1. Les mammites chez la chèvre : définition et importance

La mammite peut se définir par l'état inflammatoire d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle quelle qu'en soit l'origine traumatique, chimique, physique ou biologique, le degré de gravité clinique ou subclinique, l'évolution chronique, aiguë ou suraiguë ou la terminaison c'est-à-dire la guérison apparente ou réelle ou la mort de l'animal (**Hanzen, 2015**). L'importance des mammites chez la chèvre laitière tient à plusieurs aspects :

- **Importance réglementaire et en santé publique** : certaines bactéries sont pathogènes pour l'homme et peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires. De manière générale, le lait peut véhiculer de nombreux agents infectieux zoonotiques (**Tableau 01**) ;
- **Importance économique** : la fréquence, parfois la gravité médicale, le coût des traitements mais aussi les répercussions sur la production laitière en quantité et en qualité et l'impact réglementaire sur la vente des produits en filière lait cru sont autant d'éléments affectant l'économie du troupeau (**Chartier, 2009**).

Tableau 01 : Les zoonoses potentielles transmises par le lait de chèvre (**Chartier, 2009**).

	Pathogènes excrétés dans le lait	Contaminants fécaux du lait
Ordre décroissant de prévalence chez la chèvre	Fièvre Q	Cryptosporidiose
	Lymphadénite caséuse (<i>C. pseudotuberculosis</i>)	Salmonellose
	Staphylocoques (<i>S. aureus</i>) producteurs d'entérotoxines	<i>Yersinia pseudo-tuberculosis</i>
	Toxoplasmose	Collibacillose (VTEC dont O ₁₅₇ : H ₇)
	Chlamydie	Campylobactériose
	Listériose	
	<i>Streptococcus agalaxie, et St. equi zooepidermicus</i>	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
	Tuberculose	
	Leptospirose	
	Brucellose	
	Encéphalite à tiques (Flavivirus)	

I.2. Types de mammites

En fonction de leurs signes cliniques, on classe les mammites en cinq catégories :

- ☞ Une simple modification de la sécrétion (diminution de production et augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait) sans signes cliniques. Dans ce premier cas la mammite est qualifiée de **subclinique** ;
- ☞ Une modification de la sécrétion accompagnée de signes cliniques fonctionnels (grumeaux, sang ou caillots sanguins, pus dans le lait) ;
- ☞ Une modification de la sécrétion accompagnée de signes locaux (« gonflement », chaleur, douleur, et rougeur), sans signes fonctionnels ;
- ☞ Une modification de la sécrétion, des signes cliniques fonctionnels, des signes locaux ;
Dans les quatre cas, la mammite est qualifiée de **mammite clinique subaigüe** ;
- ☞ Soit enfin par une modification de la sécrétion, accompagnée de signes cliniques fonctionnels, de signes locaux et de signes généraux (température plus ou moins élevée, avec ou sans appétit et, quelquefois, de décubitus, d'un état de choc).

Dans ce dernier cas, on parle de **mammite clinique aigüe ou suraigüe (Remy, 2010)**.

I.3. Méthodes de diagnostic

Le diagnostic des mammites chroniques est relativement simple : il est basé sur l'observation des animaux, l'observation de la mamelle avec présence ou non de signes d'inflammation et l'observation de l'aspect du lait avec présence ou non de grumeaux. En revanche, dans le cas de mammites subcliniques, les symptômes sont pratiquement invisibles ce qui pose d'énormes problèmes pour leur détection. Une numération cellulaire en laboratoire réalisée systématiquement pour les adhérents au contrôle laitier permet de déterminer le nombre de globules blancs et donc l'état d'infection du troupeau ou d'une chèvre donnée (**Pradal, 2014**). La conductivité électrique et les tests rapides de détection bactérienne ne sont pas validés chez les caprins (**Chartier, 2009**).

I.3.1. Diagnostic clinique

L'examen clinique de la mamelle et des sécrétions mammaires constitue le pilier de la démarche de diagnostic des mammites (**Poutrel, 2002**). Il repose sur la mise en évidence des symptômes généraux, locaux et fonctionnels caractéristiques de l'inflammation de la mamelle. Bien souvent, lorsque l'inflammation est modérée, les signes généraux et locaux sont absents et seuls présents les signes fonctionnels, c'est-à-dire les modifications macroscopiques visibles dans le lait. Ces modifications concernent l'aspect, la coloration et l'homogénéité du lait (**Hanzen, 2015**).

I.3.1.1. Test au bol de traite ou du filtre

Cette épreuve consiste à recueillir, avant la traite, les premiers jets de lait dans un récipient réservé à cet usage et à en examiner l'aspect. Le récipient peut être muni d'un filtre qui facilite la mise en évidence de grumeaux, signes de l'inflammation et du passage dans le lait de facteurs de coagulation (**Hanzen, 2009**).

I.3.1.2. Test d'homogénéité

Il suffit de recueillir quelques jets de lait dans un récipient en verre, de laisser reposer quelques minutes, puis d'observer l'aspect, l'homogénéité et la coloration du produit (**Hanzen, 2009**).

I.3.2. Diagnostic expérimental

I.3.2.1. Méthodes directes de dénombrement des cellules du lait

➤ Comptage microscopique direct

Il s'agit de la méthode approuvée aux Etats-Unis pour la numération des cellules somatiques. On place un échantillon de lait de chèvre sur une plaque de microscope et on y applique un colorant spécial, du vert de méthyl pyronine, qui colore seulement l'ADN présent dans les cellules du lait (**Scruton et al., 2009**).

➤ Système Fossomatic

Système fluoro-opto-électronique, suppose la coloration préalable de l'ADN des noyaux au moyen d'un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium. La fluorescence rouge ainsi émise après éclaircissement de la préparation au moyen d'une lampe au xénon, est proportionnelle à l'ADN du noyau. Un photomultiplicateur capte le signal fluorescent émis par les cellules et le transforme en signal électrique (**Hanzen, 2015**). La prise en compte de l'intensité des impulsions électriques permet de différencier les signaux résultant d'un bruit de fond (présence de bactéries) de ceux attribués aux cellules somatiques. Les impulsions électriques ne sont comptabilisées qu'au-delà d'un certain seuil, puis traduites en termes de concentrations cellulaires après calibration (**Idèle, 2012**).

➤ Le Coulter-Counter

Dénombrement des particules du lait en fonction de la taille. Le lait subit d'abord une fixation chimique des cellules somatiques au formol puis une dispersion des globules gras. Toutes les

particules, avec ou sans noyaux, de diamètre supérieur ou égal à 4.4 micromètres sont dénombrables. Cette technique prend donc en compte les particules cytoplasmiques, ce qui diminue sa fiabilité (Rives, 1997 ; Bergonier *et al.*, 2003 ; Perrin *et al.*, 1997).

I.3.2.2. Méthodes indirectes de dénombrement des cellules du lait

➤ Californian Mastitis Test

Son principe est basé sur une réaction chimique entre le réactif et l'ADN cellulaire. Il consiste à mélanger, dans des quantités identiques, du lait et un réactif, le Teepol. Chez la chèvre, il semble préférable de ne pas se fier aux changements de couleur liés aux modifications de pH. Ainsi, seule l'appréciation visuelle de la viscosité du précipité obtenu permet d'apprécier le niveau d'inflammation de la mamelle (David *et al.*, 2013).

Il existe une bonne corrélation entre les comptages cellulaires individuels et les scores de CMT chez la chèvre. Son utilisation dans cette espèce conduit cependant à une interprétation plus difficile que chez la vache et requiert l'emploi d'une grille simplifiée à 4 scores (Tableau 02) permettant le dépistage des demi-mamelles infectées et en particulier des infections à pathogènes majeurs type *S. aureus*. Un CMT compris entre 0 et 1 regroupe 93% des animaux non infectés tandis qu'un CMT de 2 ou 3 permet de déceler la quasi-totalité des infections à pathogènes majeurs. La détection des infections à pathogènes mineurs en revanche reste imprécise (Chartier, 2009).

Tableau 02 : Test au Teepol : mesure de la concentration cellulaire et degré de réaction de CMT.

Aspect du gel	Note	No. de cellules/mL
Peu de précipité	0	
Précipité trouble qui disparaît	1	< 750 000
Léger gel persistant avec filaments grumeleux	2	de 750 000 à 2000 000
Epaississement immédiat, gel de type « blanc d'œuf » se détachant du fond en filaments lors des rotations du plateau	3	>2000 000
Gel bombé, glissant en masse sur le fond du plateau lors de ses rotations	4	>2000 000

Lefrileux-Station expérimentale caprine régionale du Pradel-PEP Caprin Rhône-Alpes

I.3.3. Diagnostic étiologique

La recherche d'une cause infectieuse unique responsable des mammites observées dans une exploitation est une tentation fréquente. Seule, elle ne mène souvent à rien. Toutefois, le diagnostic bactériologique des infections mammaires a son intérêt à condition qu'il soit bien conduit et interprété dans un cadre approprié (Durel *et al.*, 2011).

I.3.4 Diagnostic bactériologique

L'examen bactériologique du lait de mammites, ou plus généralement d'un prélèvement de lait qui peut renseigner le praticien sur l'état sanitaire des mamelles, est un examen utile, permettant à la fois l'analyse d'une situation et sa surveillance. Cet examen a un coût ; il est donc fondamental non seulement d'obtenir un résultat exploitable, ce qui oblige à une grande rigueur dans la mise en œuvre du prélèvement mais aussi son utilisation à son escient. Enfin, l'examen bactériologique va souvent de paire avec l'antibiogramme. Là aussi, il est essentiel de bien connaître les limites d'un antibiogramme et ce qu'il faut en attendre exactement (**Durel et al., 2011**).

La relative faible diversité des germes rencontrés dans les mammites de la chèvre (par rapport aux bovins) ainsi que les coûts des analyses font que le diagnostic bactériologique sur prélèvement de lait n'est pas réalisé fréquemment. Néanmoins, lors de mammites cliniques, l'étiologie staphylococcique est loin d'être systématique ; nous rappelons notamment l'importance des mycoplasmoses mammaires et donc la nécessité de faire un diagnostic différentiel notamment lorsque les infections touchent une fraction importante du cheptel (**Chartier, 2009**).

I.3.5. Autres méthodes

➤ Kit de diagnostic bactériologique « Speed ® Mam Color »

Cette technique correspond à une mise en culture spécifique et directe du prélèvement sur des micro-galeries portées à 35°C. En 24h, le virage de couleur des puits concernés, permet une lecture rapide de l'antibiogramme adapté aux molécules antibiotiques vétérinaires et au germe pathogène présent dans le prélèvement. En 48h, la seconde lecture visuelle se fait pour l'identification des bactéries ou levures, détectables à des concentrations bactériennes supérieures à 10³ CFU/mL (**Shyaka, 2007**).

➤ La PCR

Pour un dépistage de sensibilité maximale : l'amplification de l'ADN par la Polymerase Chain Réaction consiste à multiplier et à hybrider l'ADN préalablement libéré des bactéries présentes, au moyen d'amorces (primers), séquences d'ADN connues et caractéristiques d'un germe.

En employant une batterie d'amorces, on peut identifier plusieurs germes. La technique permet en routine l'identification d'une douzaine de bactéries et donne leur abondance relative dans l'échantillon (PCR semi-quantitative). On trouve en général plusieurs germes, ce qui ne va pas sans poser des problèmes d'interprétation. Compte tenu de sa sensibilité, la méthode ne permet pas de détecter une éventuelle contamination de l'échantillon par un germe sans rapport avec la mammite (**Durel *et al.*, 2011**).

I.4. Prévalence des infections intramammaires chez la chèvre

La prévalence des mammites cliniques est inférieure à 5% chez la chèvre, alors que les mammites subcliniques sont beaucoup plus fréquentes avec une prévalence qui varie de 18% à 34% (**Ferrouillet et Belanger, 2003**).

I.4.1. Prévalence des mammites subcliniques

La prévalence est très variable d'un troupeau ou d'une région à l'autre. Elle est établie soit au niveau individuel par diagnostic bactériologique ou par comptage des cellules somatiques du lait individuel, soit par estimation à partir du comptage des cellules somatiques sur le lait de mélange du troupeau (CCS de tank).

Chez la chèvre, la relation entre le CCS de tank et la prévalence des mammites subcliniques est plus difficile à établir que chez la brebis du fait de l'intervention de nombreux facteurs de variation non infectieux du CCS, et de l'existence de mammites lentivirales (CAEV) dont l'impact en terme d'élévation du CCS est beaucoup moins marqué que pour les mammites bactériennes. En se basant sur le diagnostic bactériologique, la proportion de chèvres infectées peut aller de 22 à 62% (**Tableau 03**) (**Bergonier *et al.*, 1997 ; Menzies, 2001 ; Bergonier *et al.*, 2003**).

Tableau 03: Prévalence et étiologie des mammites subcliniques de la chèvre (**Bergonier et al., 1997**).

Auteurs	Année	Pays	Nombre de chèvres	Nombre d'élevages	Type de traite	Nombre d'éch	Prév. (%) chèvre	Stériles (%)	SCN (%)	<i>S.aureus</i> (%)	<i>Strept</i> (%)	<i>E.coli</i> (%)	<i>Coryn.</i> (%)	Autres (%)
East	1983	USA	2522	17			22	78	72.7	13.6	1.3			6.8
Larondelle	1984	France	1217	10	M	2428		69.4	76.2	17.8	5.6			0.2
Manser	1986	GB	85	05		170	47	64	80.0	16.0	2.0	0.0		2.0
Schoder	1993	Autriche	204		M et m	2423		76	55.0	37.3	6.2			1.5
Farrer	1994	Espagne				1078			53.2	13.5		32		
Corrales	1994	Espagne	603	18		1206		83	65.0			27.		
Kosev	1994	Bulgarie	3040			3040		60.7	16.7	43.8	4.6	5.2	3.1	26.6
De crémoux	1995	France	>1000	08	M	5905	62	53	95.2	2.60	1.2	0.9		0.26
Contreras	1995	Espagne	188	10	M	369	30.3	81.5	66.7		1.0	3.0	12	13.0
Boscós	1996	Grèce	93	06	m	186		71	61.1	18.5	9.3			11.1

Prév : Prévalence ; M= traite mécanique ; m= traite manuelle ; Case vide= données non communiquées ; SCN= staphylocoques à coagulase négative ; Strept= Streptocoque ; Coryn= corynébactéries.

I.4.2. Prévalence des mammites cliniques

En situation normale, le taux annuel de cas de mammites cliniques dans les élevages caprins ou ovins en France ne dépasse pas 5% des animaux (**Bergonier et al., 2003**). Il s'agit en général de cas sporadiques de mammites bactériennes.

Dans les cas épizootiques ou enzootiques (moins de 1% des élevages), la morbidité peut atteindre ou dépasser 50% de l'effectif, le plus souvent lors d'infections dues à *Staphylococcus aureus* et occasionnellement à d'autres germes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Streptococcus uberis*) (**Bergonier et al., 2002**).

I.5. Facteurs de risque d'une infection intramammaire chez la chèvre

La mammité est une maladie multifactorielle, elle est due à un complexe de facteurs dont chaque élément représente une part de la cause, c'est-à-dire «un facteur de risque». Ce dernier est un paramètre, une pratique ou une caractéristique modifiable par l'homme. Les facteurs de risque influent les uns sur les autres, en conséquence, aucun mécanisme ne produit les effets qu'il produisait seul (**Weisen, 1974**). D'après **Durel et al. (2011)**, un problème de mammité est donc une pathologie de troupeau, reposant sur 3 groupes de facteurs de risque (**Figure 01**).

Santé

Pathologie

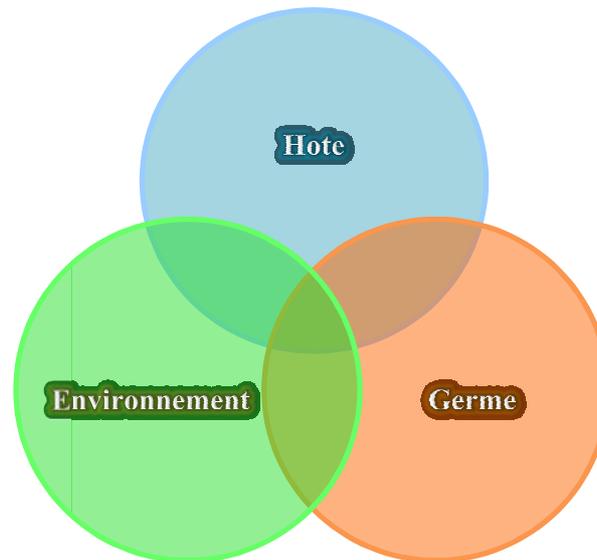


Figure 01 : Equilibre des facteurs de risque et échelle de santé continue (Durel *et al.*, 2011).

Ces facteurs de risque interviennent essentiellement au niveau de la traite et du bâtiment. La nutrition, dont on ne connaît pas toujours bien l'impact, augmente le risque de développement des mammites.

I.5.1 Facteurs liés à la traite

Le matériel et la technique de traite sont deux facteurs essentiels augmentant la réceptivité aux mammites en amoindrissant les défenses naturelles du trayon (**Figure 02**). Le niveau de vide, la fréquence de pulsation et la durée de traite sont des paramètres importants. De même, les pratiques de massage, d'égouttage et/ou de repasse, qui augmentent la congestion du trayon, sont des facteurs favorisant l'infection mammaire. La sur-traite à l'origine d'hyperkératose du trayon, bien que tolérée par les animaux est également à éviter. A l'inverse, une traite incomplète (mauvais réglage de la machine, problème de griffe ou de manchon, temps de traite, lésions douloureuses sur les pis), bien que relativement fréquente (elle pourrait toucher plus de 10% des animaux) a probablement moins d'incidence sanitaire chez la chèvre en raison du caractère cicatrisant de la mamelle (Chartier, 2009).

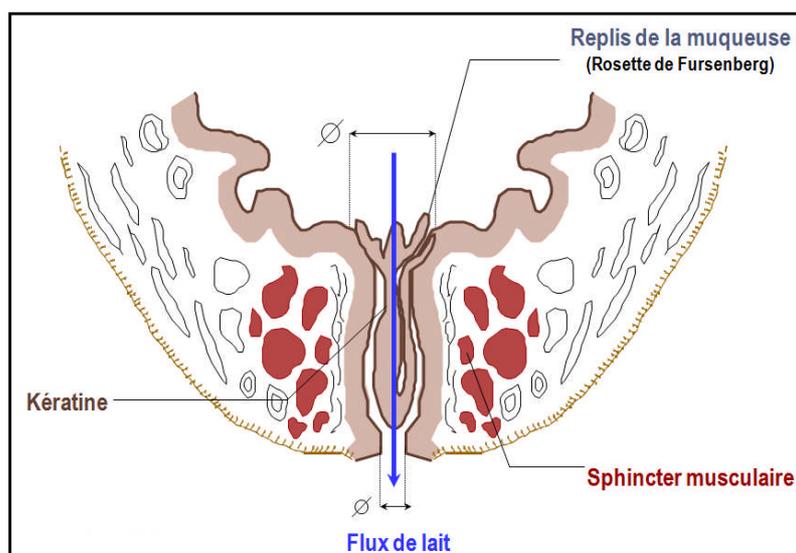


Figure 02 : Coupe schématique de l'extrémité du trayon (**Barone, 1978**).

I.5.2 Facteurs liés à l'habitat

Aération insuffisante, humidité, manque d'ensoleillement, surpeuplement, courants d'air, litière humide et souillée (**Pradal, 2014**).

I.5.3. Facteurs liés à l'alimentation

Bien que ce ne soit pas démontré formellement, les rations excédentaires en azote pourraient être liées à une augmentation d'incidence des mammites. De même, les carences en vitamine A et en β -carotènes ou en vitamine E-sélénium peuvent favoriser l'expression clinique d'infections préexistantes (**Chartier, 2009**).

I.5.4. Injections intramammaires

Selon **Chartier (2009)**, des injections mal pratiquées (dose, désinfection, moment du traitement) peuvent traumatiser le trayon et favoriser les infections. Rappelons que le tarissement est à l'origine de la mise en place d'un bouchon de kératine au niveau du sphincter. Des épidémies de mammites fongiques d'origine iatrogène ont été signalées.

I.5.5. Facteurs divers

Prédisposition héréditaire, forte production, lésions des trayons (ecthyma, blessures), trayons malformés ou mal fermés entre les traites, porteurs de croûtes ou blessures (**Pradal, 2014**).

La tendance au désaisonnement de la reproduction afin de produire du lait de manière plus régulière sur l'année ainsi que l'allongement des lactations (lactations dites longues) pourraient constituer des facteurs favorisant la pression d'infection sur les mamelles (**Chartier, 2009**).

I.6. Etiologie des mammites caprines

Les mammites sont des maladies multifactorielles avec l'intervention de germes, nombreux et variés, mais aussi des conditions de vie des animaux qui réduisent leur défenses et favorisent l'exposition à ces germes, mais encore des conditions de travail qui épuisent les fermiers, les enferment dans des routines parfois dégradées dont il peut être difficile de les sortir (**Durel et al., 2011**). Ces mammites sont provoquées par plus d'une centaine de micro-organismes (**Rhinaldi et al., 2010**). Chez la chèvre, elles sont principalement d'origine bactérienne. L'originalité par rapport à ce qui est observé chez la vache est l'implication des mycoplames et des virus.

I.6.1. Classification des agents pathogènes

De même que chez les bovins, les agents pathogènes responsables de mammites caprines sont répartis en deux groupes selon leur pathogénicité :

- ❖ Les pathogènes majeurs sont potentiellement à l'origine de mammites cliniques : *Staphylococcus aureus* est le plus fréquent. On trouve également des mycoplasmes, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus*, *Brucella*, *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Aspergillus*, *Nocardia asteroides*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❖ Les pathogènes mineurs ne provoquent des mammites cliniques que de manière exceptionnelle : il s'agit principalement des staphylocoques à coagulase négative (SCN), mais cette classification est actuellement discutée et les SCN sont de plus en plus considérés comme des pathogènes majeurs (**Maisi et Riipinen, 1991 ; Contreras et al., 1995 ; Bergonier et al., 1997 ; Contreras et al., 2003 ; Bergonier et al., 2003**).

Le caractère clinique ou non d'une mammite est majoritairement influencé par le genre et l'espèce de la bactérie pathogène (**Rainard et Riollet, 2006**).

I.6.2. Etiologie des mammites cliniques

Lors de mammites cliniques, les principaux germes rencontrés sont *Staphylococcus aureus* (plus de 50%), les streptocoques (*Str. uberis*, *Str. suis*, *Str. equi zooepidemicus*), des pasteurelles (*P.*

multocida ou *M. haemolytica*), des entérobactéries, des corynébactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* et parfois des staphylocoques à coagulase négative (SCN).

Les mammites cliniques à bacilles gram négatif (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) sont peu fréquentes mais très sévères et peuvent prendre l'allure d'une mammite gangréneuse (**Chartier, 2009**). Les agents pathogènes impliqués dans les mammites cliniques n'ont pas tous le même impact à l'échelle du troupeau. On distingue deux cas de figure :

- **Cas de mammites sporadiques**

Staphylococcus aureus est l'agent le plus fréquemment isolé, puis on trouve (par fréquences décroissantes) les staphylocoques à coagulase négative (SCN), les streptocoques, les entérobactéries, *Arcanobacterium pyogenes*, les corynébactéries, les pasteurellesn, *Pseudomonas spp*, *Nocardia asteroides*.

- **Cas de mammites enzootiques ou épizootiques**

Selon plusieurs auteurs, on trouve que là aussi majoritairement que *S. aureus* est le germe le plus fréquemment isolé chez la chèvre (**Mellenberger, 1979 ; Sheldrake et al., 1981 ; Lerondelle et Poutrel, 1984 ; Aleandri et al., 1984 et De Cremoux, 1995**), puis des streptocoques (*S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. suis*) ou des germes opportunistes tels que *Aspergillus fumigatus* et *Pseudomonas aeruginosa*, et plus rarement *Burkholderia cepacia* ou *Serratia marcescens*.

Les mycoplasmes font également partie des pathogènes majeurs (*M. capricolum capricolum*, *M. mycoides mycoides*, *M. putrefaciens*, *M. agalactiae*) : ils sont responsables de l'agalaxie contagieuse. Il existe de plus des mammites virales dues aux lentivirus du CAEV (Virus de l'Arthrite Encéphalite Caprine) (**Maisi et Riipinen, 1991 ; Le Guillou, 1993 ; Bessam et Hasso, 1997 ; Contreras et al., 2003 ; Bergonier et al., 2003**). Des virus peuvent être impliqués dans le déclenchement des mammites, soit en causant des lésions du trayon et ainsi en favorisant la contamination par d'autres pathogènes, soit en ayant une action immunosuppressive (**Barkema et al., 2009**).

Les mammites cliniques de la chèvre ont donc une étiologie qui se démarque de celles de la vache laitière par plusieurs aspects :

- ↳ L'agent pathogène majeur le plus fréquent chez la chèvre est *S. aureus*, responsable de mammite suraigüe à subaigües.

- ↳ Les SCN sont considérées comme des pathogènes majeurs pouvant provoquer des mammites subaigües à aigües chez la chèvre (ceci est sujet à débat car les SCN ont longtemps été considérées comme des pathogènes mineurs).
- ↳ Les Streptocoques (pathogènes majeurs les plus fréquents chez la vache laitière) et les germes à Gram négatif (dont les entérobactéries) sont rarement impliqués.
- ↳ L'existence de mammites virales est spécifique aux chèvres (**Bergonier *et al.*, 1997**).

I.6.3. Etiologie des mammites subcliniques

Lors de mammites subcliniques, les staphylocoques de type SCN tiennent une place prépondérante avec 70% des cas (**Chartier, 2009**). Les principales espèces sont *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes* et *S. simulans*.

En deuxième position, on trouve *S. aureus*, les streptocoques (contrairement à ce qui est décrit chez la vache laitière) et les entérobactéries sont plus rares (**Figure 03**) (**Maisi et Riipinen, 1991 ; Le Guillou, 1993 ; El Idrissi *et al.*, 1994 ; Contreras *et al.*, 1995 ; Bergonier *et al.*, 1997 ; White et Hinckley, 1999 ; Contreras *et al.*, 2003**).

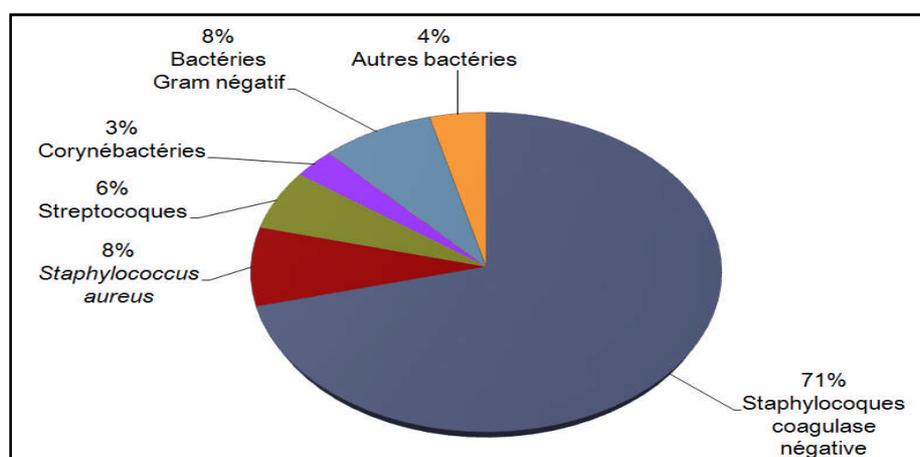


Figure 03 : Etiologie des mammites subcliniques chez la chèvre (**Bergonier *et al.*, 2003**).

1.7. Traitement des mammites chez la chèvre

La rentabilité économique du traitement des mammites chez la brebis et la chèvre doit être prise en compte. En effet, les frais à engager sont élevés par rapport à la valeur de l'animal et les chances de guérison ne sont pas garanties. Les enjeux et les modalités du traitement sont différents si l'on est face à une mammite clinique ou à une mammite subclinique.

❖ Mammites cliniques

Dans le cas d'une mammite aiguë ou suraiguë, l'objectif du traitement est de sauver l'animal afin d'en permettre la réforme dans de bonnes conditions. Pour les mammites subaiguës, la récupération fonctionnelle du quartier peut être obtenue mais ce n'est pas le cas le plus fréquent. Le traitement se fait par voie locale et/ou générale:

- Traitement intramammaire : notons tout d'abord que les préparations antibiotiques intramammaires faisant l'objet d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour les petits ruminants sont très rares. On utilise donc des produits pour bovins.
- Traitement par voie générale : il repose sur l'antibiothérapie.

Des traites fréquentes sont conseillées afin d'éliminer au maximum les germes présents dans le quartier. Elles peuvent être précédées d'une injection d'ocytocine afin de favoriser l'éjection du lait. En complément, on peut employer des anti-inflammatoires et mettre en place une perfusion pour les cas graves (**Bergonier *et al.*, 1997 ; Matthews, 1999 ; Bergonier *et al.*, 2003**).

❖ Mammites subcliniques

Dans le cas des mammites subcliniques, le but est la guérison bactériologique du quartier. Pour cela, on met en œuvre un traitement antibiotique intramammaire au moment du tarissement. Le taux de guérison bactériologique chez la chèvre est de 50 à 90% (**Fox *et al.*, 1992 ; Matthews, 1999**). Ce traitement permet également de prévenir les nouvelles infections. La conséquence de cette pratique est qu'en diminuant l'incidence des mammites subcliniques, on limite les baisses de production qui leur sont dues : ceci n'est pas négligeable pour l'éleveur puisque les pertes en lait estimées sont de 7 à 17% chez les chèvres atteintes (**Baudry *et al.*, 1997**).

Une alternative au traitement intramammaire serait l'administration d'antibiotiques par voie intramusculaire lors du tarissement : cela permet d'éviter les problèmes de contamination iatrogène des mamelles. De plus, l'injection intramusculaire est bien mieux adaptée au traitement de grands effectifs. Cependant, on manque de protocoles ayant fait l'objet d'essais contrôlés (**Bergonier *et al.*, 1997 ; Bergonier *et al.*, 2003**).

Chapitre II : Caractérisation phénotypique et génotypique des staphylocoques

II. Caractérisation phénotypique et moléculaire des staphylocoques

II.1. Taxonomie et écologie des *Staphylococcus spp.*

II.1.1 Taxonomie

Du point de vue taxonomique, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli et à l'ordre des Bacillales. Outre les *Staphylococcus sp.*, la famille bactérienne des *Staphylococcaceae* comprend quatre autres genres moins connus, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* et *Salinicoccus*.

Les membres du genre *Staphylococcus* diffèrent cependant de ceux du genre *Micrococcus* entre autres par leur métabolisme anaérobie facultative, par un contenu en G+C compris entre 30 et 39% (contre 63 à 73% pour *Micrococcus*), par leur paroi contenant un peptidoglycane et des acides teichoïques et par la présence de peptide oligoglycine dans les ponts peptidiques de la paroi (Le Loir et Gautier, 2010).

II.1.2. Habitat

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre :

- En bactéries saprophytes dans la nature (sols, air, eaux, aliments) ;
- En bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (mammifères) ;
- En bactéries pathogènes, agents d'infections humaines ou animales qui peuvent être redoutables (Delarras, 2007).

II.2. Caractères bactériologiques

II.2.1. Caractères morphologiques

Les staphylocoques sont des coques immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas plan de plusieurs éléments (du grec staphylo, grappe de raisin), diamètre moyen 0.8 à 1 μm . Après coloration de Gram, ce sont des cocci Gram positif (Le Loir et Gautier, 2010).

II.2.2 Caractères biochimiques

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

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 n'est retrouvée que chez l'animal.

Les espèces sont généralement classées en deux groupes sur la base de leur capacité à produire une coagulase libre : les staphylocoques à coagulase positive (SCP), généralement considérés comme pathogènes et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), réputés moins dangereux **(Le Loir et Gautier, 2010)**.

Staphylococcus aureus a longtemps été considéré comme le seul représentant des SCP, mais de nouvelles espèces de staphylocoques à coagulase positive ont été récemment isolées : *Staphylococcus intermedius* et *staphylococcus hyicus*. Mais, d'une part, la coagulase n'est pas toujours présente chez ces deux dernières espèces **(Brisabois et al., 1997 ; Euzéby, 2013 ; Leyral et Vierling, 2007)** et d'autre part, elles sont beaucoup plus rarement présentes dans les aliments que *Staphylococcus aureus* **(De buyser, 2008)**.

II.3. Facteurs de virulence et pouvoir pathogène

II. 3.1. Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus demeure un des principaux pathogènes responsables de mammites chez les ruminants, quoique de façon très variable selon les pays et les régions. Chez la vache laitière, de 5 à 30% de mammites cliniques et de 5 à 10% de mammites subcliniques sont dues à *S. aureus* **(Poutrel, 1985)**. Chez les petits ruminants, la fréquence des mammites subcliniques par *S. aureus* est plus faible que chez la vache, mais celle des mammites cliniques est plus forte **(Bergonier et al., 2003)**.

C'est une bactérie commensale et pathogène de l'homme comme de certains animaux. Lorsqu'il devient pathogène, *S. aureus* est responsable d'un spectre d'infections très variées, en terme de diversité comme en terme de gravité. Bactérie colonisant la peau et les muqueuses, son portage, notamment nasal semble être un facteur favorisant les infections à *S. aureus*. On distingue physio-pathologiquement les infections suppuratives, liées à la multiplication bactérienne et à

l'expression de multiples facteurs de virulence responsables de l'invasion et de la destruction des tissus de l'hôte, des syndromes toxiques, où la production de toxines est majoritairement responsable à elle seule des symptômes cliniques.

Tableau 04: Infections cliniques les plus courantes à staphylocoques coagulase + (**Le Loire et Gautier, 2010**).

Espèces	Hôtes	Infections
<i>S. aureus subsp. aureus</i>	• Bovins	Mammites, impetigo
	• Moutons	Mammites, dermatites, folliculites bénigne
	• Chèvres	Mammite, dermatite,
	• Porcs	Botryomycose mammaire
	• Chevaux	Mammites, plaies de castration
	• Chats	Dermites, infections urinaires et suppurations diverses
	• Chiens	Dermites, suppurations diverses (rare)
	• Oiseaux	Dindes : arthrites, septicémies
	• Oiseaux	Poulets : arthrites
<i>S. intermedius</i>	• Chiens	Pyodermites, métrites, cystites, otite externe, suppurations diverses
	• Chats	Suppurations diverses
<i>S. hyicus</i>	• Bovins	Mammites (rare)
	• Porcs	Dermatites exsudatives, arthrites
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>	• Bovins	Mammites (rare)
	• Moutons	Lymphadénites, maladie des abcès
<i>S. delphini</i>	• Chats	Cystite et suppurations diverses
	• Dauphins	Lésions cutanées suppuratives
<i>S. schleiferi subsp. coagulans</i>	• Chiens	Otites externes

II.3.2. Facteurs de virulence

La pathogénie de *S. aureus* et l'aspect multifactoriel des infections sont liés à la synthèse de nombreux facteurs de virulence dont la diversité peut s'expliquer par la grande plasticité du génome. Cette pathogénie implique trois classes de facteurs de virulence : les protéines sécrétées, les protéines de surface et les composants de la paroi. Ces facteurs sont, soit codés par le chromosome et présents chez presque toutes les souches, soit codés par des éléments génétiques mobiles comme les transposons, les plasmides ou les phages (**Le Loir et Gautier, 2010**).

Tableau 05: Facteurs de virulence potentiellement impliqués dans les mammites staphylococciques (Le Loir et Gautier, 2010).

	Facteurs de virulence	Mécanismes d'action
Adhésines	<ul style="list-style-type: none"> Fibronectin-binding protein FnBPA, FnBPB 	Adhésion à la matrice extracellulaire Pénétration dans les cellules épithéliales mammaires
Composants de surface	<ul style="list-style-type: none"> Microcapsules (CP5, CP8) Intercellular antigen (ica) Biofilm associated protein (bap) Acide lipoteichoïque Peptidoglycane 	Résistance à la phagocytose Formation de biofilm ? Formation de biofilms? Réaction inflammatoire Inflammation, hypersensibilité retardée
Toxines	<ul style="list-style-type: none"> Hémolysine alpha Hémolysine bêta Leucotoxines (hémolysine gamma, LukM/F') Entérotoxines 	Cytotoxique pour les cellules épithéliales mammaires Cytotoxique pour les polynucléaires Cytotoxiques pour les cellules endothéliales Implication dans les mammites gangréneuses Cytotoxique pour les cellules épithéliales mammaires Cytotoxique pour les polynucléaires et les monocytes Implication dans les mammites gangreneuses Perturbation de la réponse immunitaire

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. Beaucoup d'études épidémiologiques ont porté sur la présence ou l'absence de certains gènes (Tableau 06) (Moore et Lindsay, 2001 ; Peacock *et al.*, 2002).

Tableau 06: Gènes codants des facteurs de virulence potentiels associés aux souches de mammite (Le Loire et Gautier, 2010).

Gènes associés aux souches isolées de mammites des ruminants	
Très forte fréquence, partagés avec souches d'autres origines	<i>Hla, hlg, spa</i>
Fréquence particulièrement élevée	<i>Hlb, lukED</i>
Gènes particuliers aux souches de mammites	<i>Bap, lukMF'</i>
Fréquence particulièrement faible	<i>Sak</i>
Gènes très rarement isolés de souches de mammite	<i>Scn, chp, pvl, eta, etb</i>

Hla : hémolysine α ; *hlg* : hémolysine γ ; *spa* : protéine A ; *hlb* : hémolysine β ; *lukED* : leucotoxine E/D ; *bap* : biofilm associated protein (Bap) ; *lukMF'* : leucotoxine M/F' ; *sak* : staphylokinase ; *scn* : staphylococcal complement inhibitor (SCIN) ; *chp* : chemotaxis inhibitory protein of staphylococci (CHIPS) ; *pvl* : leucocidine de Panton Valentine ; *eta* : exfoliatine A ; *etb* : exfoliatine B.

- **Protéine A**

La protéine A (Spa) est une des protéines de surface majeures chez *S. aureus* que l'on qualifie de facteur de virulence pléiotropique, de part ses rôles multiples dans l'interaction avec l'hôte lors d'une infection (Le Loir et Gautier, 2010).

- **Régulateur agr**

Le principal système régulateur contrôlant l'expression des facteurs de virulence chez *S. aureus* est le système agr (*accessory gene regulator*) (Kornblum *et al.*, 1990). Ce système est l'un des deux systèmes du quorum sensing décrit chez *S. aureus*. Il est largement conservé parmi les staphylocoques (Dufour *et al.*, 2002). La communication intercellulaire via ce système affecte l'expression de facteurs de virulence chez *S. aureus* (Patten *et al.*, 2001).

Chez *S. aureus*, les souches qui ont ce système sont capables de synthétiser la toxine delta qui agirait comme un surfactant et préviendrait l'adhésion des cellules aux surfaces (Vuong *et al.*, 2000). Il active la synthèse d'exotoxines permettant aux staphylocoques de s'échapper du site de l'infection et de s'étendre à de nouveaux sites (Yarwood et Schlievert, 2003 ; Yarwood *et al.*, 2004).

Le polymorphisme de séquence du locus *agr* a permis de définir quatre groupes Agr I, II, III et IV. La variabilité d'Agr est corrélée à la phylogénie de *S. aureus* ; ainsi, les quatre groupes Agr reflèteraient la dérive génétique du système Agr au cours de l'évolution de l'espèce (Le Loire et Gautier, 2010).

- **La (LPV) Leucocidine de Panton Valentine**

La LPV est une toxine qui se compose des protéines LukS-PV et LukF-PV. Il existe 20 à 27% d'homologie de séquence entre les deux composés. Les deux composants sont sécrétés séparément, puis s'assemblent en octamère à la surface des cellules cibles. La formation d'un pore dans la membrane cellulaire requiert la présence des deux composants de la toxine (**Prevost et al., 1995**). *In vitro*, la LPV induit la lyse de plusieurs types cellulaires participant aux défenses de l'hôte comme les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les macrophages.

Impliquée dans les furonculoses chroniques et dans la pneumonie nécrosante (**Gillet et al., 2002**). La LPV, à forte concentration (200nM) induit la nécrose cellulaire des polynucléaires par activation des canaux calciques et fuite osmotique du cytosol, et à faible concentration (10nM), la formation de pores dans la membrane mitochondriale induisant l'apoptose (**Genestier et al., 2005**).

- **Les toxines superantigéniques**

La toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), et les entérotoxines se caractérisent par leur activité superantigénique. Cette propriété tient au fait que ces toxines ont la capacité de se lier d'une part à l'extérieur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II des cellules présentatrices d'antigènes et d'autre part, aux récepteurs des lymphocytes T, en reconnaissant certaines chaînes V β . Ceci entraîne une activation polyclonale des lymphocytes T possédant une chaîne reconnue. Cette activation polyclonale provoque une production et une libération massive de cytokines pro-inflammatoires responsables de la survenue de choc toxique (**Proft et Fraser, 2003**).

II.4. Caractéristiques des mammites à SCP et SCN chez la chèvre

Les infections mammaires les plus fréquentes chez les ruminants laitiers sont provoquées par des staphylocoques coagulase négatifs, mais les mammites dues à *S. aureus* s'en distinguent par une réaction inflammatoire plus forte ainsi que par un plus faible taux de guérison après traitement antibiotique. Ces caractéristiques font de *S. aureus* un des trois pathogènes majeurs actuellement en élevage laitier, avec *Escherichia coli* et *Streptococcus uberis*. A la différence des deux derniers pathogènes, dont les habitats majeurs sont hors mamelle, on considère que le principal réservoir de *S. aureus* est intramammaire. En conséquence, il est possible d'éradiquer les mammites par *S. aureus* dans un troupeau, contrairement aux mammites collibacillaires ou streptococciques (**Le Loir et Gautier, 2010**).

II.5. Résistance aux antibiotiques des staphylocoques chez la chèvre

Quatre grandes catégories de mécanismes de résistance concernent la plupart des espèces bactériennes d'intérêt médical, y compris *S. aureus*. Il s'agit de mécanismes :

- Par modification de l'incorporation de l'antibiotique ;
- Par inactivation enzymatique ;
- Par modification de la cible ;
- Par contournement métabolique.

Selon l'OMS une souche résistante est une souche qui supporte une concentration d'antibiotiques notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce. Cette élévation de CMI est directement liée à l'acquisition d'un mécanisme de résistance.

S. aureus est une des espèces bactériennes qui a su le plus s'adapter à la pression exercée par les substances antibiotiques en développant des mécanismes de résistance (**Le Loir et Gautier, 2010**).

II.6. Typage moléculaire de *S. aureus*

Staphylococcus aureus est l'une des espèces bactériennes qui ont été les plus caractérisées par des méthodes de typages. Une panoplie de méthodes a été développée pour le typage de *S. aureus*, et la liste ne cesse de s'allonger. D'une façon générale, on distingue les méthodes basées sur la restriction de l'ADN, sur l'amplification d'ADN par la *polymerase chain reaction* (PCR), ou sur l'analyse de séquence(s) d'ADN.

Avec le développement des méthodes de séquençage, les méthodes basées sur l'analyse de séquence (s) du génome sont de plus en plus utilisées. Parmi ces méthodes :

- Multi locus sequence typing (*MLST*)
- Spa typing
- Double locus sequence typing (*DLST*) (**Le Loir et Gautier, 2010**).



NOUS NE CROYONS QUE CE QUE NOUS ANALYSONS

Matériel et méthodes

I. Objectif de l'étude

Afin de mieux connaître la place des staphylocoques en infections intramammaires dans les élevages de chèvres de la wilaya de Tizi-Ouzou, nous avons fixé comme objectifs :

- ✚ Estimer la prévalence des infections intramammaires chez la chèvre, en tenant compte des aspects clinique et subclinique de la mammite.
- ✚ Analyser les risques relatifs aux infections intramammaires chez les chèvres laitières.
- ✚ Evaluer le taux d'implication des staphylocoques en infections intramammaires chez la chèvre.
- ✚ Etudier les profils d'antibio-résistance des souches de staphylocoques isolées.
- ✚ Caractériser les gènes de virulence des souches *S. aureus* responsables des mammites de chèvre.

II. Matériel et méthodes

L'analyse bactériologique et moléculaire des laits mammitieux prélevés des élevages caprins à Tizi-Ouzou a été réalisée au niveau du :

- 👉 Laboratoire central de l'Institut Technique d'élevage (ITELV) de Baba Ali -Alger-, afin d'isoler, identifier et caractériser phénotypiquement les souches de staphylocoques.
- 👉 Laboratoire de Microbiologie Médicale du Centre Hospitalo-universitaire "Mustapha Bacha" à Alger, afin de confirmer les phénotypes des staphylocoques douteux et caractériser génotypiquement les souches *S. aureus*.

L'ensemble des analyses et manipulations a nécessité le recours aux matériels et méthodes indiqués ci-après :

II.1 Matériel

➤ Milieux de culture

Milieux solides d'isolement : Gélose au sang frais (GSF), gélose nutritive (GN), gélose Chapman ; Milieu pour antibiogramme : Gélose Muller Hinton (MH) ; et gélose de conservation.

➤ **Matériel biologique**

La souche de référence pour le contrôle de qualité : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sensible à la méticilline.

➤ **Réactifs spécifiques et autres**

Réactif de CMT (Teepol), palette à quatre coupelles, boîtes Pétri simples et bi-compartmentées, H₂O₂ (catalase), plasma de lapin (coagulase), sang hépariné, disques d'antibiotiques (Pénicilline, Oxacilline, Céfoxitine, Tétracycline, Vancomycine, Erythromycine, Acide fusidique, Gentamycine, Spiramycine, Ofloxacin et chloramphénicol), galeries API staph, ampoules d'API Staph Medium, Réactif VP1, VP2, NIT1 et NIT2, tampon 10X sans MgCl₂, MgCl₂, désoxyribonucléotides, eau pour préparation injectable, taq polymérase, amorces, agarose, TBE Buffer 10X, BET, colorant Blue/Orange Loading Dye, 100 pb Ladder.

➤ **Appareillages**

- Agitateur de tubes « VORTEX », étuves, bain Marie, hotte, bec Bunsen, autoclave, thermocycleur, balance de précision, centrifugeuse, micro-ondes, trans-illuminateur, MicroScan Walk Away 96 et un inoculateur Renok.
- Unité d'électrophorèse comprenant des cuves, un générateur de courant (max 250 V, 100 mA) et peignes.

➤ **Petit matériel**

Pipettes Pasteur, tubes de prélèvement stériles, seringues, gants, alcool éthylique à 70°, lingettes, glacière, micropipettes, portoirs, cônes d'aspiration, tubes eppendorf, chronomètre de laboratoire, Erlenmeyer, plaques PC31, PromptTM.

II.2. Méthodes

Dans le besoin de limiter les erreurs par excès et/ou par défaut lors de la progression de l'enquête, notre rigueur était particulièrement focalisée sur les exigences de prélèvements, de transport, puis des analyses microbiologique et moléculaire des échantillons.

II.2.1. Population d'étude et échantillonnage

II.2.1.1. Description de la wilaya d'étude

La wilaya de Tizi-Ouzou est une wilaya côtière, elle se situe dans la partie Nord Centre de l'Algérie. Schématiquement, cette région est un vaste bastion constitué d'une succession de chaînes de montagnes toutes d'orientation générale Est-Ouest et qui emprisonnent des plaines alluviales étroites.

Administrativement, elle est divisée en 67 Communes et 21 Dairas. Le relief de la wilaya de Tizi-Ouzou est marqué par la succession et la juxtaposition de différents ensembles topographiques, du Nord au Sud, disposée de la manière suivante :

- La chaîne côtière
- La vallée de l'oued Sebaou
- Le massif de grande Kabylie
- La zone collinaire de Tizi-Guenif
- La dépression de Draa El Mizan
- La chaîne de Djurdjura

II.2.1.2. Présentation des régions

- ☞ **Ouacif** : Commune et daïra rurale de Kabylie, située au Sud de la wilaya de Tizi-Ouzou et limitrophe de la wilaya de Bouira. Elle se situe à flanc de la montagne du Djurdjura.
- ☞ **Massif d'Azeffoun** : Il occupe la partie Nord-Est de la wilaya. Le relief est accidenté dominé par les pentes supérieures à 12.5% exception faite de l'embouchure des petits oueds côtiers.
- ☞ **Massif côtier de Tizirt** : Le relief est assez peu accidenté. Les pentes varient entre 3% et 25% et l'altitude moyenne ne dépasse pas les 300m. Monticule rocheux à relief très accidenté, constitue la limite du Sud de cette zone.



Figure 04: Répartition des différentes communes d'étude de la wilaya de Tizi-Ouzou.

II.1.2.3. Echantillonnage

Pour mieux explorer sa variabilité écologique dans le milieu d'élevage en Algérie, via une sélection commode, différentes régions de la wilaya de Tizi-Ouzou ont été retenues pour la quête de staphylocoques responsables des infections intramammaires chez les chèvres durant la période allant du 5 Décembre 2015 au 30 Mars 2016. En l'absence d'une base précise de sondage, nous avons été obligés de mettre en application un plan d'échantillonnage qui allie à la fois la commodité et le hasard. Pour ce faire, le choix des exploitations était fonction de la disponibilité, alors que la taille de l'échantillon était le résultat du hasard, car sauf les chèvres présentant une mammite, allaient être prélevées.

II.1.2.4. Détermination de la taille de l'échantillon

Dans cette étude, le choix des animaux a été fait au hasard dans différents élevages de la wilaya de Tizi-Ouzou. L'âge, le numéro de lactation et le stade de lactation n'ont pas été pris en compte dans le choix des animaux. Les prélèvements ont été effectués tout simplement sur des femelles en lactation. La traite manuelle est la technique effectuée dans tous les élevages.

L'étude a concerné 17 élevages, à savoir 78, 100 et 88 chèvres respectivement à Ouacif, Tigzirt et Azeffoun, soit un total de 266 chèvres sur lesquelles des prélèvements de lait sur tubes stériles

étaient effectués chez les chèvres présentant des quartiers à mammites cliniques ou celles révélées positives au test de CMT.

II.2. Enquête sur les mammites au sein des élevages

II.2.1. Prospection des élevages

Au fur et à mesure des visites de fermes, des fiches de renseignement conçues spécialement pour repérer les facteurs animaux et environnementaux favorisant l'installation des infections intramammaires ont été remplies, suivant les révélations du chargé d'élevage en tenant compte de nos constatations sur place. Les volets, descriptif des élevages, thérapeutique des mammites et caractéristiques de la traite ont été développés dans la fiche d'élevages (**AnnexeI**).

II.2.2. Examen clinique des mamelles

Les mamelles ont été examinées via inspection visuelle puis palpation pour révéler des symptômes de l'inflammation associés ou pas à des éventuelles lésions du pis. De plus, du lait de chaque quartier est prélevé et inspecté pour d'éventuels changements de couleur et de consistance.

II.2.3. Dépistage des mammites subcliniques

Chez les chèvres en phase post-colostrale, une fois le pis nettoyé d'une manière grossière, c'est selon les procédures données par **Quin et al. (1994)**, que le diagnostic de la mammite subclinique par le California Mastitis Test (CMT) a été réalisé.

De chaque quartier, une fois les premiers jets éliminés, une quantité suffisante de lait est traitée dans la coupelle correspondante de la palette de CMT, auxquelles une quantité égale du réactif de CMT (Teepol) est rajoutée. Ainsi, un doux mouvement circulaire dans un plan horizontal est assujéti à la palette pendant quelques secondes.



Figure 05: Technique de réalisation du CMT

Le résultat de la réaction marque le niveau de destruction des cellules somatiques et de la coagulation des acides nucléiques. De ce fait, la positivité est fonction du degré de formation de gel auquel on attribue une note allant de 0 à 4 (pour la grille de notation, Cf. tableau 02).



Figure 06 : Degrés de la réaction teepol-lait.

Une chèvre est considérée atteinte d'une infection intramammaire si elle présente au minimum un quartier positif au CMT même en l'absence d'isolement de micro-organismes. Vue la grande subjectivité liée à la différenciation des degrés de formation du gel, seul l'aspect qualitatif du test CMT est retenu dans notre enquête.

II.2.4. Collecte des prélèvements

🚰 Prélèvement des échantillons de lait

Sur les femelles en lactation, les prélèvements ont été effectués sur les quartiers présentant des signes cliniques incluant au minimum ; une modification apparente du lait et/ou une modification

du quartier ou un CMT+. Les prélèvements de lait sont collectés, avant la traite du matin, selon les instructions de National Mastitis Council (NMC, 1990).



Figure 07 : Dépistage des mammites cliniques et subcliniques.

✚ Technique de prélèvement

Le quartier atteint d'une infection intramammaire, est lavé par de l'eau de robinet puis séché par des lavettes uniques jetables. Après avoir lavé soigneusement nos mains, des gants jetables sont enfilés. L'extrémité du trayon est ensuite désinfectée avec un tampon de coton imbibé d'alcool éthylique à 70°, en débutant par le trayon le plus éloigné. La date, le numéro de l'animal et le quartier prélevé sont les mentions notées sur les tubes stériles avant chaque collecte d'échantillon de lait.

Après élimination des premiers jets, le bouchon est ôté avec la main droite pour être tenu entre l'index et le médium de la main gauche. Le couple, tube et bouchon ont alors leur ouverture dirigée vers le bas, et ce afin d'éviter toute contamination. Sitôt, le trayon saisi de la main droite, est ramené en position latérale pour être traité presque horizontalement dans le flacon à prélèvement. Ce dernier en position oblique au moment où le lait gicle, est porté entre le pouce et l'index de la main gauche avec un bouchon porté par l'index et le médium orienté vers le bas.

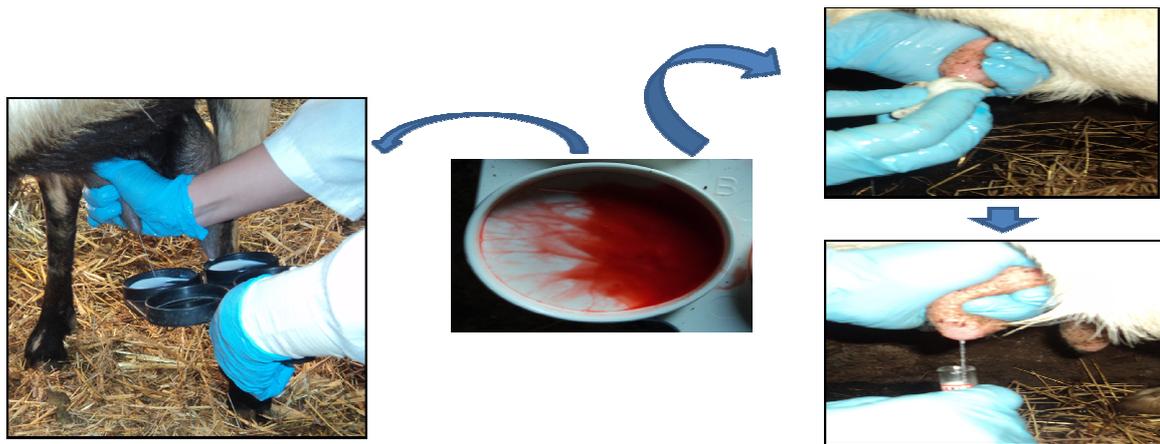


Figure 08: Dépistage des mammites subcliniques et technique de prélèvement du lait.

Enfin, le flacon est rebouché avant redressement, puis placé immédiatement dans une glacière à 4°C et transféré vers un congélateur en attendant d'être analysé. A l'inverse de l'ordre de désinfection par l'alcool éthylique, l'échantillonnage des deux quartiers a débuté par le trayon le plus proche et terminé par le plus éloigné.

Conservation des prélèvements

Les prélèvements transportés dans une glacière à 4°C sont par la suite conservés par congélation à -18°C jusqu'au moment de l'analyse.

II.3. Isolement et caractérisation phénotypique des souches de staphylocoques

II.3.1. Identification des staphylocoques

- **Ensemencement des échantillons de lait**

Après homogénéisation des échantillons de lait décongelés au vortex pendant cinq secondes, les milieux: gélose nutritive additionnée de 5% du sang humain, Chapman contenus respectivement dans les boîtes Pétri bi-compartmentées, ont été ensemencés par 0.01 mL de lait chacun. Les boîtes ensemencées, sont ensuite incubées à 37°C pendant 48h.

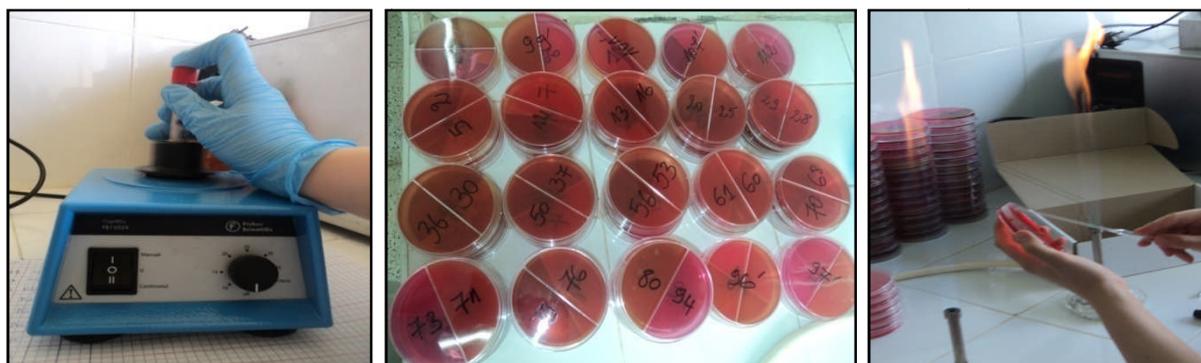


Figure 09: Ensemencement des échantillons de lait.

Lecture : Après incubation, un prélèvement est considéré positif une fois une croissance minimale de 100 UFC/mL est détectée. Tout échantillon montrant plus de deux différents types de colonies sont considérés contaminés (NMC, 1990). Outre, toutes les colonies d'aspect caractéristique ou non caractéristique sont soumises à un test de confirmation.

- **Test de la catalase**

Il s'agit de mettre en évidence la présence de cette enzyme dans les bactéries. Pour cela, on racle à l'aide d'un cure dent une colonie isolée de la souche à tester et on la dissocie dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur un fond propre et sec. La catalase catalyse cette réaction :

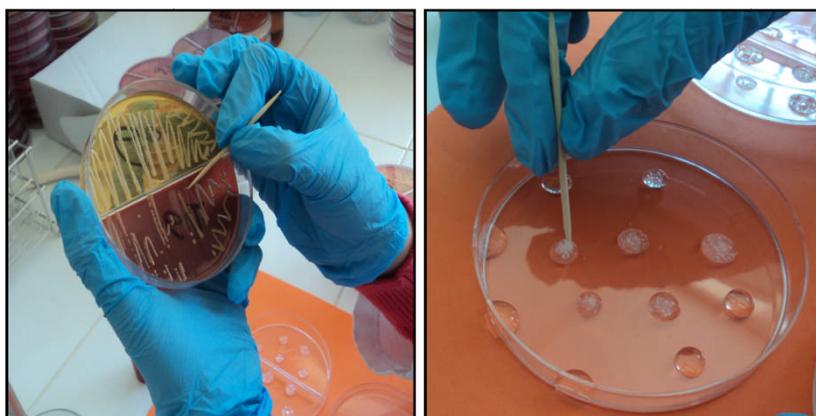


Figure 10 : Technique de recherche de la catalase.

Si la bactérie possède une catalase, il se produit un dégagement d'oxygène : on observe immédiatement une effervescence. Sinon, aucune réaction ne se produit.

- **Test de coagulase**

Ce test permet la recherche de la coagulase, exo-enzyme capable *in vitro* de coaguler le plasma de lapin. Dans un tube à hémolyse stérile, on met un volume de plasma de lapin Bio-Rad (préalablement reconstitué), auquel on rajoute une colonie bactérienne puis on ferme le tube et on laisse incuber à 37°C pendant 18 à 24h.



Figure 11: Etapes de réalisation du test à la coagulase.

La coagulase induit une coagulation du plasma de lapin : on observe un caillot qui se forme en quelques minutes à quelques heures pour les bactéries à coagulase positive, alors que le milieu reste liquide pour les bactéries à coagulase négative.

- **Galerie API staph**

API Staph est un système standardisé utilisé pour diagnostic *in vitro* ainsi que pour contrôle microbiologique.

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Ces microtubes sont inoculés avec la suspension bactérienne à identifier.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des 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 l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

↪ Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, des colonies isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une pipette Pasteur.
- On prépare une suspension bactérienne homogène en déchargeant notre pipette dans 5mL de l'ampoul d'API Staph Medium. L'opacité de cette suspension doit être égale à 0.5 Mc Ferland.
- La suspension bactérienne doit être utilisée extemporanément.

↪ Préparation et inoculation de la galerie

- De l'eau distillée est mise sur le fond de la boîte (partie alvéolée) pour former une chambre humide.
- La galerie est placée dans la boîte d'incubation et ses tubes sont remplis à l'aide d'une pipette avec API Staph Mediumensemencé.
- De l'huile de paraffine est additionnée pour créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE.
- Renfermer la boîte et inscrire les références de la souche sur la languette latérale.
- Incuber à 37°C pendant 24h.

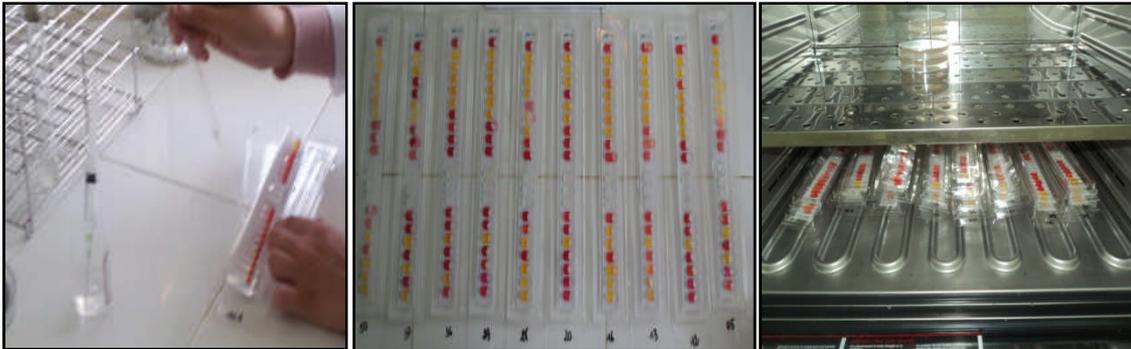


Figure 12: Préparation et incubation des galeries API Staph.

↪ Lecture

- Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture (Annexe II) après addition des réactifs VP1, VP2, NIT1, NIT2, ZYM A et ZYM B.
- Inscription des résultats sur la fiche de lecture.
- Identification à l'aide du logiciel ApiwebTM.

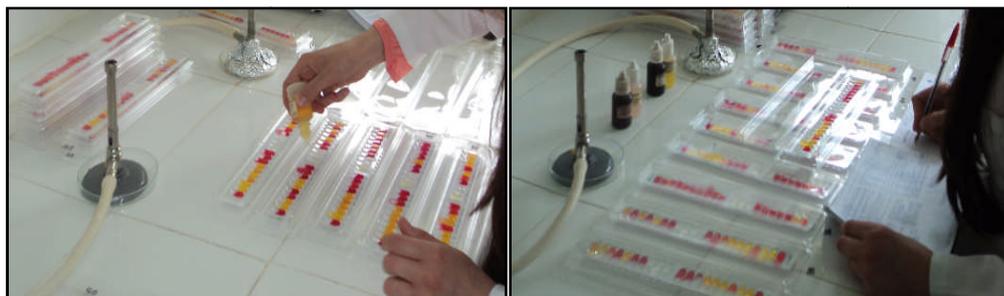


Figure 13: Lecture des galeries API Staph.

II.3.2. Test de sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est le résultat d'étude *in vitro* de la sensibilité d'une bactérie à différents antibiotiques. Cette étude de l'antibio-sensibilité qui a porté sur onze antibiotiques (**Tableau 07**), a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose Muller Hinton.

Tableau 07 : Liste des antibiotiques utilisés pour l'analyse de la résistance des souches.

Classe d'antibiotique	Antibiotiques	Code	Charge du disque
β-lactamines	Pénicilline	P	10UI
	Oxacilline	OXA	5μg
	Céfoxitine	FOX	30μg
Macrolides	Erythromycine	E	15UI
	Spiramycine	SP	100μg
Aminosides	Gentamycine	GM	15μg
Fluoroquinolones	Ofloxacine	OFX	5μg
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30μg
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30UI
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30μg
Fusidanines	Acide fusidique	FC	10μg

↳ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, des colonies isolées et parfaitement identiques ont été raclées à l'aide d'une anse de platine, qui est par la suite déchargée dans 10mL d'eau physiologique stérile à 0.9%.

Cette suspension bactérienne est homogénéisée. Son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland. L'ajustement s'opère en ajoutant, soit de la suspension bactérienne, soit de l'eau physiologique stérile.



Figure 14: Préparation des suspensions bactériennes pour antibiogramme.

↳ **Ensemencement**

Un écouvillon en coton stérile est plongé dans l'inoculum et pressé doucement en tournant sur la paroi interne du tube afin d'éliminer le liquide en excès retenu. L'écouvillon est ensuite étalé sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas, en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, puis finir par le passer sur la périphérie de la gélose.



Figure 15: Préparation des boîtes, des écouvillons et des suspensions pour antibiogramme.

↳ **Application des disques d'antibiotiques**

Les disques d'antibiotiques ont été appliqués à l'aide de pinces bactériologiques stériles, en veillant à ne pas mettre plus de six disques par boîte Pétri.

↪ Incubation

Les boîtes ont été incubées immédiatement après ensemencement à 37°C pendant 24h.



Figure 16: Application des disques et incubation des boîtes à 35.5°C et 30°C pour P et OXA.

↪ Lecture

Après incubation, un halo clair d'inhibition est créé autour de chaque disque d'antibiotique. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés avec précision à l'aide d'une règle en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée.

Une comparaison des différents diamètres obtenus aux diamètres critiques publiés par des organisations reconnues telle que le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2015), permet de répondre qualitativement si la souche bactérienne étudiée peut être classée comme sensible (S) ou résistante (R) à l'antibiotique présent sur chaque disque (Annexe III)



Figure 17: Estimation des diamètres des zones d'inhibition.

II.3.3. Conservation des souches

Afin de conserver les souches, ces dernières étaient inoculées dans des tubes gélosés de conservation par piqûre centrale, puis gardés à température ambiante jusqu'à analyse moléculaire.

II.4. Caractérisation phénotypique et génotypique des souches de staphylocoques

II.4.1. Confirmation des souches au Walk Away

Après revivification des souches *S. aureus* préalablement conservées dans des tubes de conservation, on passe au test Walk Away, test à télémaintenance, précis et fiable pour l'identification et l'antibiogramme, où la mesure des CMI est directe, c'est-à-dire non calculée et basée sur la croissance réelle de la bactérie dans chaque puits antibiotique.

Trois technologies de lecture y sont intégrées : colorimétrie, fluorescence et turbidimétrie, fournissant des résultats rapides d'identification en seulement 2h à 2h30 conduisant à des alertes automatiques, identifications biochimiques les plus rapide. Pour ce faire on a suivi les étapes suivantes :

- ✚ Grâce à une pointe calibrée standardisée du PromptTM, l'inoculum rapidement et sans ajustement de la concentration par turbidimétrie (5×10^5 UFC/mL) est prélevé à raison de 2 à 3 colonies pures et parfaitement identiques.
- ✚ La pointe du PromptTM est par la suite introduite dans le flacon de préparation de la suspension, qu'on ferme puis mélange au Vortex pour homogénéiser.
- ✚ Cette suspension est versée sur le couvercle de la plaque PC31 "Pos Combo Panel Type 31" spécifique aux Staphylocoques.

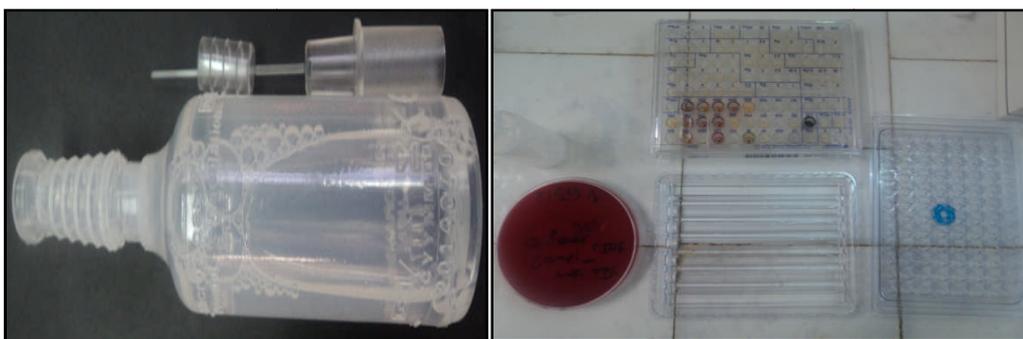


Figure 18 : Matériel pour analyse au Walk away.

- ✚ A partir de cette suspension, l'inoculateur Renok permet d'inoculer et réhydrater les plaques MicroScan PC31 de façon simple et rapide en une seule étape (42 secondes).
- ✚ La plaque est ensuite fermée, débarrassée de l'excès de suspension et introduite dans l'appareil Microscan Walk Away 96 préalablement réglé, pendant 24h.



Figure 19 : Préparation des plaques PC 31.

II.4.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*), est une technique de répllication ciblée *in vitro*. Il s'agit d'une répllication de séquences spécifiques d'ADN pour générer à des dizaines de milliards d'exemplaires un fragment d'ADN particulier à partir d'un extrait d'ADN matriciel. Toutes les souches ont été typées par cette méthode, passant par 3 étapes essentielles :

II.4.2.1. Extraction chaud-froid de l'ADN

- Dans la salle d'extraction, en travaillant sous hotte, avec des gants sans talc, un volume de 100 μ L d'eau PPI (Pour Préparation Injectable) était transféré dans des tubes à eppendorf portant chacun les références des souches à caractériser.

- Par la suite, au laboratoire, environs 8 à 10 colonies pures et identiques ont été raclées sous hotte et rajoutées dans les eppendorf qu'on a mélangés rigoureusement.

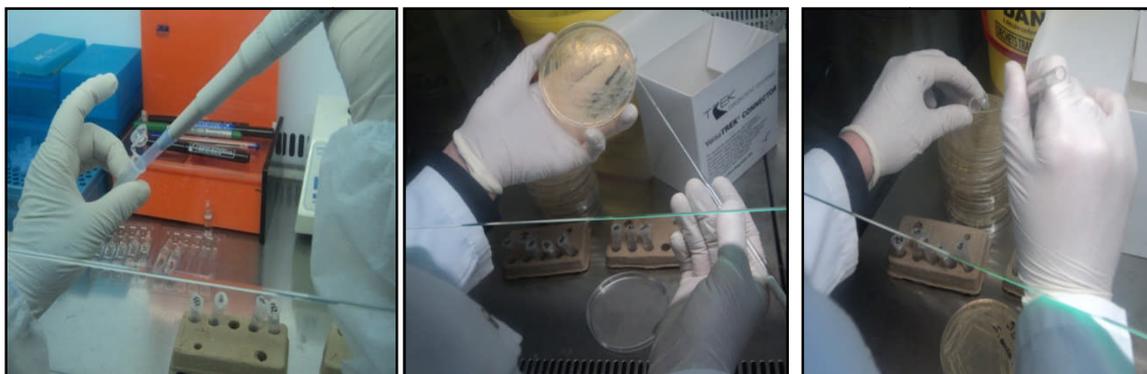


Figure 20: Etapes de mélange de l'eau PPI et des colonies *S. aureus* dans des eppendorf

- Les eppendorf ont été placées dans une centrifugeuse à +4°C à vitesse maximale pendant 10 minutes.
- Le culot a été par la suite récupéré, sous hotte dans la salle d'extraction, puis additionné de 300 μ L d'eau PPI.



Figure 21: Centrifugation des eppendorf et récupération du culot.

- Les eppendorf ont été placés dans le bain marie à 100°C pendant 10min.
- Un bref passage des eppendorf a été effectué directement un par un dans un bac de glace.

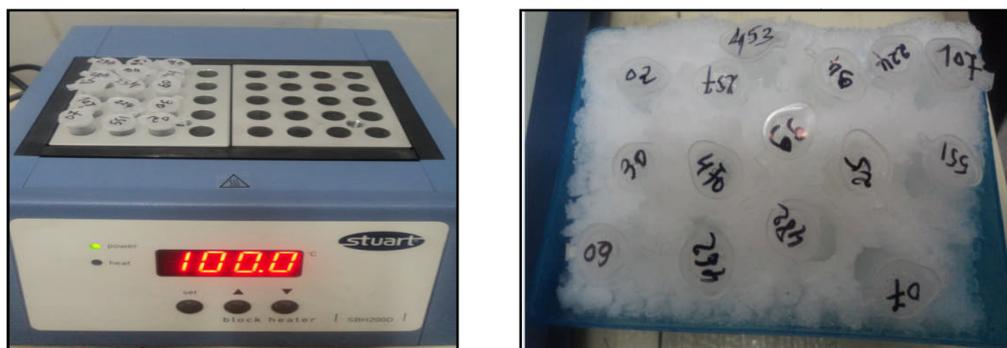


Figure 22: Passage dans la glace après 10 min à 100°C.

- Une seconde centrifugation à +4°C à vitesse maximale pendant 10min a été effectuée.
- Dans la salle d'extraction, sous hotte, le surnageant a été récupéré dans d'autres eppendorf portant les mêmes références et gardé au congélateur pendant 24h, pour l'étape suivante.



Figure 23: Récupération du surnageant dans des eppendorf portant les mêmes références.

II.4.2.2. Amplification de l'ADN

Avant de commencer l'amplification, nous préparons les mélanges réactionnels ou MIX des différentes PCR.

↳ Préparation des mélanges réactionnels (MIX)

Chaque PCR doit contenir les réactifs suivants : le tampon 10X sans MgCl₂ (tampon spécial pour PCR), le MgCl₂, des désoxy-ribo-nucléotides (DNTP), de l'eau PPI, l'enzyme Taq polymérase et les amorces appropriées à chaque gène recherché.

Tous ces réactifs sont mélangés avec des proportions différentes selon les PCR effectuées (**Annexe IV**).

Une fois préparé, le MIX est rigoureusement mélangé au Vortex puis réparti dans des eppendorf à PCR, à raison de 35 ou 45 μ L (selon la PCR). Puis 5 μ L d'ADN extrait sont ajoutés à chaque mélange. A ce stade l'amplification peut commencer.

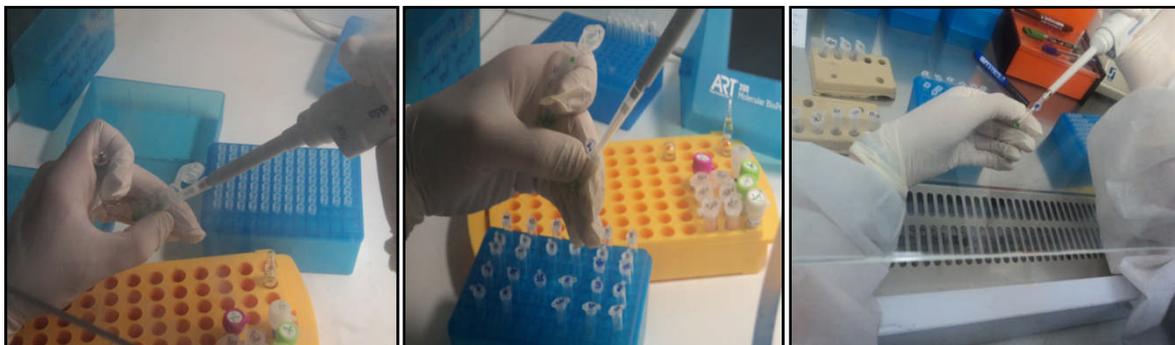


Figure 24 : Mélange des MIX avec l'ADN extrait dans des eppendorf.

↳ Amplification

Elle est réalisée dans un thermocycleur pendant environ 1h30, dans les conditions suivantes : une étape de chauffage à 94°C pendant 5min suivie de 25 cycles répétés comportant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 55°C pendant 30 sec et une élongation à 72 °C pendant une minute puis est terminée par une dernière étape de chauffage à 72 °C pendant 7min.



Figure 25: Le mélange MIX-ADN dans le thermocycleur.

Chaque PCR comportera :

- ↳ Un témoin négatif : sans ADN, c'est-à-dire contenant uniquement le MIX.

- ☞ Un témoin positif : contenant un mélange de plusieurs ADN préparés à partir de souches identifiées contenant les gènes codants pour les toxines recherchées.

3. Révélation des fragments amplifiés

Les fragments d'ADN amplifiés ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose.

☞ **Préparation du gel**

Le gel d'agarose a été préparé à raison de 2g d'agarose dans 120mL de tampon TBE Buffer (tampon Tris Borate EDTA) préalablement dilué à 0.5X (selon la taille du support de l'électrophorèse, le volume du gel pourra être adapté).

Ce mélange tampon agarose a été chauffé au micro-onde jusqu'à l'obtention d'un liquide limpide puis additionné d'un agent révélateur :

- * Le Bromure d'éthydiu (BET), à raison de 100 μ L (deux gouttes) par 100mL de tampon. Ce dernier étant sensible à la chaleur, il ne devra être rajouté qu'une fois que le mélange aura refroidi et atteint 45°C.



Figure 26: Préparation du gel d'agarose avec le BET.

Le gel préalablement mélangé est alors coulé au niveau du support de l'électrophorèse, en évitant la formation de bulles d'air. Deux peignes y sont déposés puis on attend la solidification du gel (au moins 30min) avant de déposer les amplifiats.

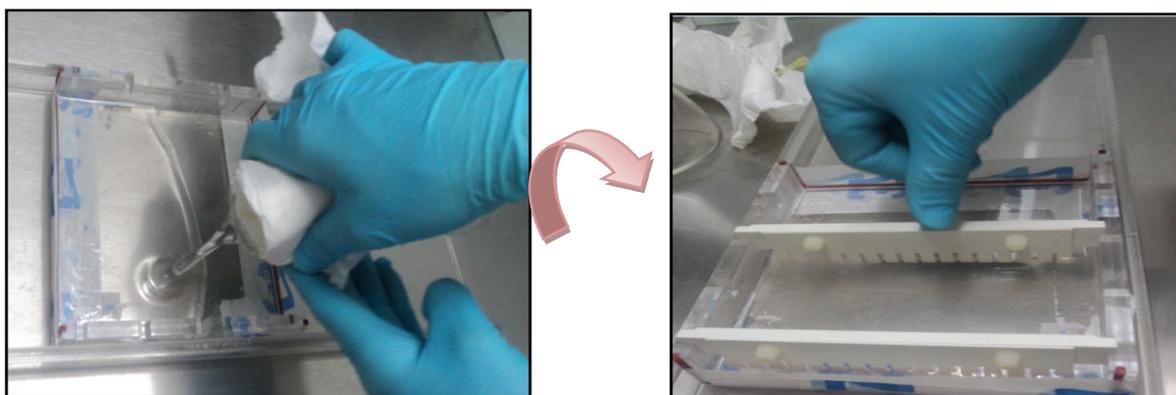


Figure 27: Préparation du gel d'agarose sur support d'électrophorèse.

↳ Dépôt des ampliats et migration

Après solidification du gel, on le dépose soigneusement dans la cuve à électrophorèse en superposant les puits sur les indicateurs de migration, puis on l'inonde de la solution TBE 0.5X permettant l'ouverture des puits pour un dépôt adéquat.

Dans chaque puits, 5 μ L d'ampliat sont déposés, séparés par deux dépôts de poids moléculaire (100 pb Ladder) dans des puits assez proches pour permettre la lecture de part et d'autre sur le gel.



Figure 28: Dépôt des 100 paires de bases sur le gel d'agarose.

Ces poids moléculaires, étant transparents, sont colorés avec deux gouttes du colorant Blue/Orange Loading dye avant leur dépôt.



Figure 29: Dépôt des amplifiats après coloration dans le gel d'agarose.

La migration se fait à 130 Volts pour une durée de 45min selon la taille des fragments d'ADN (si la taille des fragments à révéler est proche, la migration doit durer plus longtemps pour une meilleure séparation) et de la taille du gel (plus le gel est petit (8puits), plus la migration est courte).

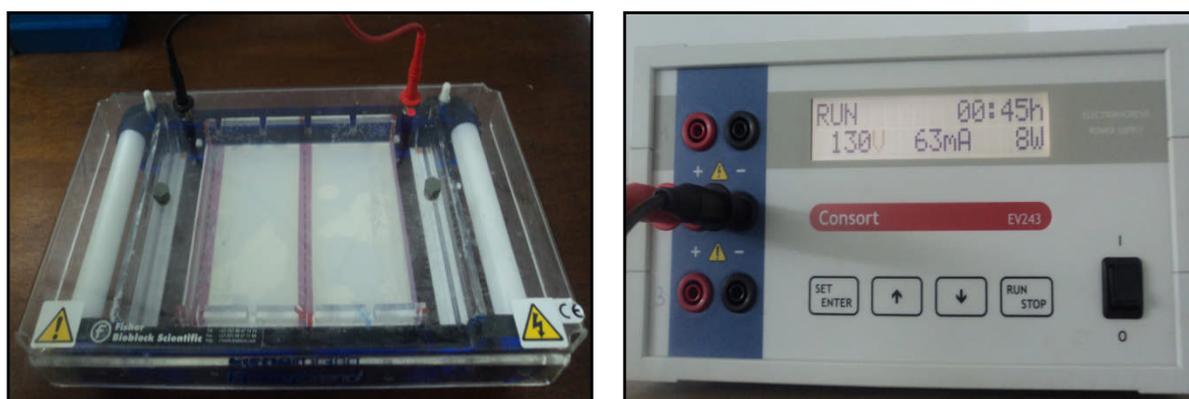


Figure 30: Migration des amplifiats à 130 volts pendant 45min.

II.4.2.3. Révélation des amplifiats

Une fois la migration terminée, les produits de PCR ainsi séparés vont être révélés grâce à un appareil transilluminateur : Molecular Imager Gel DocTM XR+.

Après révélation des amplifiats, l'interprétation des résultats se fait en comparant la taille des fragments révélés avec ceux du témoin positif.

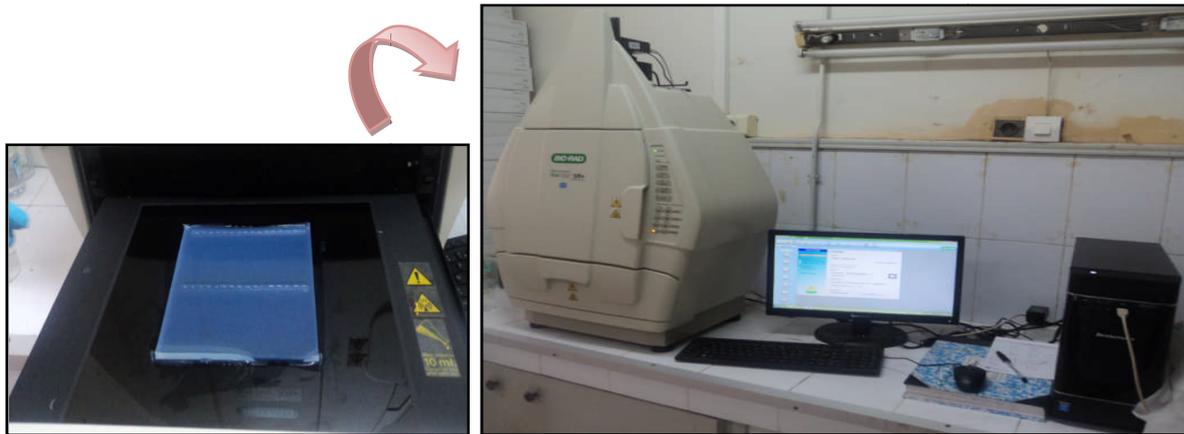


Figure 31: Révélation des amplifiats de PCR après migration.

II.5. Synthèse des données et analyse statistique

Après avoir codifié les questions et les réponses des questionnaires, l'ensemble des données recueillies ont été saisies et stockées dans un fichier Microsoft Excel.

Le traitement des données a été réalisé par le même logiciel dont la comparaison entre les variables (les pourcentages) a été réalisée à l'aide du test Chi-deux (χ^2), pour cela une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative. Les intervalles de confiance et les précisions relatives étaient calculés selon les formules proposées par **Toma *et al.* (2001)**.



Résultats et discussion

Conclusion générale

Les mammites demeurent l'une des pathologies dominantes qui sévissent dans les élevages des ruminants. Notre étude sur dix-sept élevages caprins, a permis d'établir un certain nombre de résultats relatifs à la situation des mammites à *Staphylococcus* chez les chèvres de la wilaya de Tizi-Ouzou.

La prospection des élevages montre que la situation est caractérisée par des prévalences élevées des mammites chez la chèvre. On enregistre en effet, sur le plan cheptel, individuel et quartier des taux de 94%, 32.3% et 21.2% respectivement. De plus, la séparation des chevreaux de leurs mères et le lavage régulier des mamelles avant la traite étaient associés à des prévalences significativement plus élevées.

Les analyses bactériologiques des laits de mammites cliniques et subcliniques indiquent un niveau d'implication des staphylocoques de 24,8% et ce, à raison de 15.9% pour les staphylocoques à coagulase négative et 8.8% pour les staphylocoques à coagulase positive. De ces derniers, les espèces : *S. aureus* (28.6%), *S. chromogènes* (14.3%), *S. epidermidis* (10.1%), *S. simulans* (10.1), *S. haemolyticus* (7.1%), *S. lugdensis* (7.1%), *S. hyicus* (7.1%), *S. sciuri* (3.5%), *S. caprae* (3.5%), *S. xylosus* (3.5%) et *S. saprophyticus* (3.5%) étaient identifiées. Les souches isolées chez la chèvre ont montré de faibles niveaux de résistance aux antibiotiques, par rapport à celles impliquées dans les infections intra-mammaires chez les bovins.

Bien qu'aucune souche de *S. aureus* ne porte les gènes *luk-S-PV* et *luk-F-PV* codant pour la toxine « Leucocidine de Panton-Valentine », un marqueur de l'origine communautaire des souches, 50% se sont montrées positives à une toxine super-antigénique (TSST), dont une souche est issue d'un cas de mammité clinique. Ce résultat est à prendre en considération dans les prochaines investigations sur la relation entre les mammites cliniques à *S. aureus* et la toxine du syndrome de choc toxique.

Enfin, les mammites à réservoirs mammaires restent un sérieux problème tant dans les infections cliniques que subcliniques. Pour en réduire l'incidence et la prévalence, la mise en place de plans de lutte contre les mammites se justifie donc pleinement. Il faut agir à deux niveaux : limiter les nouvelles infections et diminuer les taux des infections existantes.



Références bibliographiques

Akkou M, Antri K, Bachtarzi M-A, Bes M, Tristan A, Dauwalder O, Kaidi R, Meugnier H, Tazir M, Etienne J, Laurent F & N Ramdani-Bouguesa, 20016. Phenotypic and Genotypic Characterization of Staphylococcus aureus Strains Associated with Bovine Mastitis and Nasal Carriage of Workers in Contact to Animals in Algeria. *Pak Vet J*, 36(2): 184-188.

Aleandri M, Fagiolo A, Calderini P, Colafrancesco R, Giangolini G, Rosati R & F De Michelis, 1994, Somatic cells and milk of small ruminants, Wageningen, Pers, Pays Bas : 65-70.

Barkema HW, Green MJ, Bradley AJ et RN Zadoks, 2009. Invited review: The role of contagious disease in udder health. *J Dairy Sci*, 92: 4717-4729.

Barone R, 1978. Mamelles In : Anatomie comparée des mammifères domestiques, tome 3: Splanchnologie, fascicule 2, Vigot Paris, 449-501.

Bassam LS & SA Hasso, 1997. Mastitis in goats caused by Nocardia asteroïdes. *Small Rum Res*, 26: 287-290.

Baudry C, De Cremoux R, Chartier C & G Perrin, 1997. Incidence de la concentration cellulaire du lait de chèvre sur sa production et sa composition, *Vet Res*, 28 : 277-286.

Benhamed N & M Kihal, 2013. Phenotypic and Genotypic Characterization of Staphylococcus aureus agents pof dairy cows' mastitis in Algeria. *J Appl Sci Res*, 9: 86-93

Bergonier D, Blanc MC, Fleury B, Lagriffoul G, Barillet F & X Berthelot, 1997. Les mammites des ovins et des caprins laitiers : étiologie, épidémiologie, contrôle, *Rech Rum*, Paris, 251-260.

Bergonier D, De Crémoux R, Lagriffoul G, Rupp R & X Berthelot, 2002. Etiologie et épidémiologie des mammites des petits ruminants. Pathologie ovine et caprine. Paris, éditions du point vétérinaire. 40-45.

Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G & X Berthelot, 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet Res*, 34 : 1-28.

Bourabah A, Ayad A, Hammoudi SM, Boukraa L & Benbarek H, 2013. Prevalence and Etiology of Subclinical Mastitis in Goats of the Tiaret Region, Algeria. *Global Veterinaria*, 11 (5): 604-608.

- Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, De Buyser ML, Collette C, Garin-Bastuji B & MF Thorel, 1997.** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : Situation en France et en Europe. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 16: 452-471.
- CA-SFM, 2015.** Comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie : recommandations, société française de microbiologie, Soussy Dj.
- Chartier C, 2009.** Pathologie caprine : Du diagnostic à la prévention. Editeurs du Point vétérinaire, Sine qua non. 325 : 207-220.
- Contreras A, Corrales JC, Sierra D & J Marco, 1995.** Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goat. *Small Rum Res*, 17: 71-78
- Contreras A, Luengo C, Sanchez A & JC Corrales, 2003.** The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science*, 79 : 273-283
- Contreras A, Luengo C, Sanchez A & JC Corrales, 2003.** The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livestock Production Science*, 79 : 273-283.
- David V, De Cremoux R, Roussel P, Lamoureux B, Mercier P & T Vidard, 2000.** Le CMT ou test au teepol. Institut de l'élevage. (Page consultée le 10 janvier 2006). Site de l'institut de l'élevage, [en ligne] Adresse URL : <http://www.inst-elevage.asso.fr>
- David V, De Cremoux R, Roussel P, Lamoureux B, Mercier P et T Vidard, 2013.** Le CMT ou test au teepol. Elaboration par : GIE Midi-Pyrénées, chambres d'Agriculture Lot et Garonne et Lot, Etoile du Quercy, Insitut de l'élevage (France): Références : 001238061.
- De Buyser ML, 2008.** Enterotoxines staphylococciques dans le lait cru et les fromages au lait cru. Bulletin des GTV, 43 :37- 42.
- De Crémoux R, 1995.** Relations entre les numérations cellulaires du lait et les infections mammaires chez la chèvre. Thèse de Doctorat Médecine. Vétérinaire : Toulouse.
- Delarras C, 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire, éditions TEC & DOC, Lavoisier, Paris. 476p.
- Dufour P, Jarraud S, Vandenesch F, Greenland T, Novick RP, Bes M, Etienne J & G Lina, 2002.** High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *J Bacteriol*, 184: 1180-1186.

Durel L, Guyot H & L Théron, 2011. Vade-mecum des mammites bovines, éditions MED'COM. 270p.

El Idrissi AH, Benkirane A & M Zardoune, 1994. Investigations sur les mammites subcliniques dans les élevages caprins laitiers au Maroc. *Rev Elev Méd Vét Pays trop*, 47 : 285-287

Euzéby JP, 2013. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, [en ligne]. URL www.bacdico.net.

Ferrouillet C & D Belanger, 2003. Les mammites subcliniques chez la chèvre laitière. *Le medecin vétérinaire du Québec*. Vol 33, N° 1 et 2.

Fox LK, Hancock DD & SD Horner, 1992. Selective intramammary antibiotic therapy during the non lactating period in goats. *Small Rum Res*, 9: 313-318.

Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F & L Genestier, 2005. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest*, 115: 3117-3127.

Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piemont Y, Brousse N, Floret D & J Etienne, 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton - Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359: 753-759.

Hama H, 2006. Recherche de bactéries associées aux mammites subcliniques dans le lait de chèvre en Mauritanie et au Togo et détermination de leur antibio-sensibilité. Thèse : Med Vet, Dakar, 31.

Hammaz Z, 2014. Prévalence des mammites subcliniques caprines et leurs étiologies. Mémoire de Magister, ENSV d'Alger.

Hanzen C, 2015. Physio-anatomie et propédeutique de la glande mammaire. Symptomatologie, étiologie et thérapeutiques. Approches individuelles et de troupeau des mammites. Liège, Belgique. [http:// orbi.ulg.ac.be](http://orbi.ulg.ac.be).

Hanzen Ch, 2009. La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Etiopathogénie et traitements. Approche individuelle et de troupeau. Liège, Belgique. <http://orbi.ulg.ac.be>.

IDELE, 2012. Les mammites caprines in: <http://www.fidocl.fr/content/dossier-mammites-caprines-idele>

Kornblum J, Kreiswirth BN, Projan SN, Ross H & RP Novick, 1990. Agr: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In: Molecular Biology of the Staphylococci. New York, USA, 373-402.

Le Guillou S, 1993. Pathologie mammaire et production laitière. In: « Gérard Perrin (éd) Pathologie caprine et productions », 2^{ème} colloque international de Niort, 26-29 juin 1989, Etudes et synthèses de l'EMVT, 435-447.

Le Loir Y & M Gautier, 2010. *Staphylococcus aureus*, éditions TEC & DOC (Monographies de microbiologie), Lavoisier, Paris. 283p.

Lefrileux Y, Test au Teepol : mesure de la concentration cellulaire. Station expérimentale caprine régionale du Pradel-PEP Caprin Rhône-Alpes.

Lerondelle C & B Poutrel, 1984. Characteristics of non clinical mammary infections of goat. *Ann Rech Vet*, 18: 105-112.

Leyral G & E Vierling, 2007. Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. Doin Editions, 290p.

Maisi P & I Riipinen, 1991. Pathogenicity of different species of staphylococci in caprine udder. *Br Vet J*, 147: 126-132.

Matthews J, 1999. Diseases of the goat, 2nd edition. *Blackwell Science*. Oxford, 266 pp.

Mellenberger R, 1979. Incidence, risks and aetiology of mammary abnormal milk, proc. 8th Ann. Meet. Nat Mastitis council, 40-43.

Menzies PI & SZ Ramanoon, 2001. Mastitis of sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 17, 2, 333-335.

Moore PC & JA Lindsay, 2001. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: Evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J Clin Microbiol*, 39: 2760-2767.

Moroni P, Vellere F, Antonini M, Pisoni G, Ruffo G & S Carli, 2004. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chronically infected dairy goats. *Int J Antimicrob Agents*, 23: 637-640.

NMC, 1990. Microbiological Procedures for the diagnosis of udder infection -3rd Edition. National Mastitis Council, Arlington, VA, USA

Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, O'Neill G & NP Day, 2002. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 70: 4987-96.

Perrin GG, Mallereau MP, Lenfant D & C Baudry, 1997, Relationships between California mastitis test (CMT) and somatic cell counts in dairy goats. *Small Rum Res*, 26: 167-170.

Poutrel B., 1985, généralités sur les mammites de la vache laitière : processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthodes de contrôle. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 161 : 497-511.

Poutrel B, 2002. Actualités sur les méthodes de diagnostic des mammites. Journées nationales GTV INRA, Tours, 157-162.

Poutrel B, 2008. Prélever du lait pour recherche *Staphylococcus aureus*. *Le Point Vétérinaire*, 283 : 47-49.

Pradal M, 2014. Le guide de l'éleveur de chèvres : de la maîtrise à l'optimisation du système de production, éditions TEC & DOC, Lavoisier, Paris. 568p.

Pratten J, Foster SJ, Chan PF, Wilson M & SP Nair, 2001. *Staphylococcus aureus*. Accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes Infect*, 3: 633-637.

Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbacon V, Monteil H & Y Piemont, 1995. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun*, 63: 4121-4129.

Proft T & ID Fraser, 2003. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*, 133: 299-306.

Quinn PJ, Carter ME, Markey B & GR Carter, 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wilfe Publishing, London pp. 95-101.

Rainard P & C Riollet, 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* 37: 369-400.

Ramdani-Bougoussa N, Bes M, Meugnier H, Forey F, Revendy ME, Lina G, Vandenesch F, Tazir M & J Etienne, 2006. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Pantone-Valentine leukocidine genes in Algiers hospital. *Antimicrob agents Ch*, 5:1083-1085.

Remy D, 2010. Les mammites, hygiène, prévention, environnement (maladies). Guides France Agricole. 260p.

Rinaldi M, Li RW & AV Capuco, 2010. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 138: 267-279.

Rinaldi M, Li RW, Bannerman DD, Daniels KM, Evock-Clover C, Silva MVB, Paape MJ, Van Ryssen B, Burvenich C & AV Capuco, 2010. A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Functional & Integrative Genomics* 10: 21-38.

Rives C, 1997. Numérations cellulaires du lait de chèvre : Etude bibliographique et essai préliminaire. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse, 91 pp.

Saidi R, Cantekin Z, Khelef Dj, Ergün Y, Solmaz H & R Kaidi, 2015. Antibiotic susceptibility and Molecular Identification of Antibiotic resistance genes of staphylococci isolated from bovine mastitis in Algeria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21 (4): 513-520.

Sanchez A, Contreras A, Jimenez J, Luengo C, Corrales JC & C Fernandez, 2003. Effect of freezing goat milk on recovery of intramammary bacterial pathogens. *Veterinary Microbiology*, 94 : 71-77.

Scruton D, Rood K, Junkins L & B Moyer, 2009. Guide to crisis management of somatic cell counts in goats. Vermont Agency of agriculture, food and markets. In: <http://www.uvm.edu/newfarmer/production/livestock/SCCgoats2010.pdf>

Sheldrake RFT & VE Woodhouse, 1981. Relationship of somatic cell count cell volume, analysis of goat's milk to intramammary infection with coagulase negative staphylococci. *J Dairy Res*, 48: 393-403.

Shyaka A, 2007. Diagnostic des mammites cliniques et subcliniques en élevage bovin laitier intensif (cas de la ferme de wayembam).Thèse de Doctorat. Faculté de médecine, pharmacie et d'odonto-stomatologie de Dakar.

Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE & AR Horswill, 2010. Peptide signalin in the staphylococci. *Chen Rev*, 111: 117-151.

Toma B, Dufour B, Sanaa M, Bénet JJ, Shaw A, Moutou F & A Louza, 2001. Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies transmissibles majeures. 2nd Edition. Paris: Jouve, 696p.

Vandenesh F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Herrernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T et al. 2003. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis*, 9: 978-984.

Vuong C, Saenz HL, Gotz F & M Otto, 2000. Impact of the agr quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 182: 1688-1693.

Wesen JP, 1974, Editeurs Vigot frères.

White EC & LS Hinckley, 1999, Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Rumin Res*, 33: 117-121.

Yarwood JM & PM Schlievert, 2003. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest*, 112:1620-1625.

Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM & EP Greenberg, 2004. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*, 186: 1838-1850.

A close-up photograph of a hand holding a silver pen, writing on a document. The image is slightly blurred and has a soft, warm light. The word "Annexes" is overlaid in a red, cursive font.

Annexes

Annexe I : Fiche de renseignements des fermes (Mammites à *Staphylococcus spp*)

I-INFORMATIONS GENERALES

1-Lieu, le...../...../2016 Lot-souchier n°:.....

2-Exploitation :..... Depuis Quand :.....

3-Nombre de professionnels :..... Nombre de trayeurs :.....

4-Animaux élevés : Bovins Ovins Caprins

Oiseaux Canins Équins

5-Nombre de têtes caprines:..... N^{bre} d'enclos Cp :.....

8-Mode d'élevage : Intensif Semi-extensif Extensif

9-Tableau :

Catégories	Chèvres	Chèvres en lactation	Boucs	Chevreaux
Nombre de têtes

10-Type d'élevage : Laitier Viandeux Mixte

II-USAGE DES ANTIBIOTIQUES ET APPARITION DES RESISTANCES

1-Acquisition d'intrants récents (<1an) : Non Oui Nombre :.....

Origine :.....

2-Nombre d'interventions vétérinaires par année :.....

3-Mammites cliniques récentes (<1an) : Non Oui Nombre :.....

4-Les mammites cliniques sont-elles traitées : Oui Non

5-Mammites rebelles au traitement ATB : Non Oui Nombre :.....

6-Dépistage des mammites subcliniques : Oui Non

7-Le tarissement est il : Progressif Brusque

8-Traitement ATB de mammites au tarissement : Oui Non

9-Les chevreaux sont-ils séparés de leurs mères : Oui Non

10-Destination du lait : Consommation familiale Industrie transformatrice

III-CARACTERISTIQUES DES PRATIQUES DE LA TRAITE

1-Mode de traite : Manuel Mécanique

2-Les personnes responsables de la traite sont-elles: Les mêmes Différentes

3-Nettoyage systématique de la mamelle : Oui Non

4-Utilisation d'une lavette : Non Oui Individuelles
Collectives

5-Essuyage : Oui Non

6-Élimination des premiers jets : Oui Non Parfois

7-Égouttage régulier en fin de traite : Oui Non

8-Trempage des trayons après la traite : Oui Non

9-Traite à part les chèvres à mammites : Oui Non

Les observations cliniques à rechercher

ANOMALIES DETECTABLES A L'INSPECTION DE LA MAMELLE

Inspection	Inflammation	Palpation	Aspect du lait
Pustules	Rougeur	Normale	Normal
Verrues	Chaleur	Œdémateuse	Séreux
Ulcérations	Douleur	Sclérotique	Hémorragique
Nodules	Ganglions supra-mammaire réactionnels		Présence de grumeaux
Abcès			Présence de pus

Pustules: Lésions rougeâtres circonscrites à la peau, contenant un liquide purulent.

Verrues : Formations cornées jusqu'à 2 cm de hauteur en développement sur la peau.

Nodules : Circonscrit, sphéroïdaux, solide, sous-cutanée, ou lésion du parenchyme.

Annexe II : Tableau de lecture des Api Staph.

Tests	Composants actifs	QTE (mg/cup.)	Réactions/enzymes	Résultat	
				Négatif	Positif
0	Aucun		Témoin négatif	Rouge	-
GLU	D-glucose	1.56	(Témoin positif)(D-GLUcose)	Rouge	Jaune
FRU	D-fructose	1.4	Acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1.4	Acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1.4	Acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose	1.4	Acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1.32	Acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1.36	Acidification (d-MANnitol)		
XLT	Xylitol	1.4	Acidification (XyLiTol)		
MEL	d-mélibiose	1.32	Acidification (D-MELibiose)		
NIT	Nitrate de potassium	0.08	Réduction des NITrates en nitrites	<u>NIT1+NIT2/10min</u> Incolore-rose pâle	rouge
PAL	B-naphtyl phosphate	0.0244	Phosphatase ALCaline	<u>ZYM A+ZYM B/10min</u> Jaune	Violet
VP	Sodium pyruvate	1.904	Production d'acétyl méthyl-carbinol	<u>VP1+VP2/10min</u> Incolore-rose pâle	Violet-rose
RAF	D-raffinose	1.56	Acidification (RAFfinose)	Rouge	Jaune
XYL	D-xylose	1.4	Acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1.32	Acidification (SACcharose)		
MDG	Méthyl- α D- glucopyranoside	1.28	Acidification (Méthyl- α D- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1.28	Acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
<u>ADH</u>	L-arginine	1.904	Arginine DiHydrolase	Jeune	Orange- rouge
<u>URE</u>	urée	0.76	UREase	Jaune	Rouge- violet

Annexe III : Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose (SFM, 2015)

Classe d'ATB	Antibiotiques	Charge du disque	Diamètres critiques	
			Résistant	Sensible
β-lactamines	Pénicilline	10UI	<29	≥29
	Oxacilline	5µg	<20	≥ 20
	Céfoxitine	30µg	<25	≥ 27
Macrolides	Erythromycine	15UI	<17	≥ 22
	Spiramycine	100µg	<14	≥18
Aminosides	Gentamycine	15µg	<14	≥ 16
Fluoroquinolones	Ofloxacine	5µg	<20	≥ 20
Glycopeptides	Vancomycine	30µg	--	≥15
Tétracyclines	Tétracycline	30UI	<17	≥ 19
Phénicolés	Chloramphénicol	30µg	<19	≥ 22
Fusidanines	Acide fusidique	10µg	<24	≥ 24

Annexe IV : Mélanges réactionnels (MIX)

Tableau 1 : Mix pour amplification du gène *gyr*

Réactifs	Quantité en µL pour un essai
Tampon 10X sans MgCl ₂	5
MgCl ₂ 50 mM	2.5
Amorces	3
DNTP	1
Eau PPI	8.5
Taq polymérase	0.25

Tableau 2 : Amplification des gènes *agrI*, *agrII*, *agrIII*, *agrIV*,

Réactifs	Quantité en µL pour un essai
Tampon 10X sans MgCl ₂	5
MgCl ₂ 50 mM	2.5
Amorces : <i>agr1</i> , <i>agr2</i> , <i>agr3</i> , <i>agr4</i> , <i>Pan agr</i>	7.5
DNTP	1
Eau PPI	4
Taq polymérase	0.25

Tableau 3 : Mix pour amplification du gène *tsst*

Réactifs	Quantité en μL pour un essai
Tampon 10X sans MgCl_2	5
MgCl_2 50mM	5
Amorces	1.5
DNTP	4
Eau PPI	1.9
Taq polymérase	0.4

Tableau 4 : Amplification du gène *pvl*

Réactifs	Quantité en μL pour un essai
Tampon 10X sans MgCl_2	5
MgCl_2 50 mM	2.5
Amorces	6
DNTP	1
Eau PPI	5.5
Taq polymérase	0.4 ou 0.5