



546THV-2

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahleb Blida**

**Faculté des sciences Agro-vétérinaires et biologiques**

**Département des sciences vétérinaires**

# mémoire

De fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en  
**Médecine vétérinaire**

## Thème

**Caractérisation des souches bactériennes responsables  
de mammites cliniques.**

**Présenté par : TELDJI Imane  
ROBAI Manel**

**Promotrice : M<sup>me</sup> AMMI D.  
Copromotrice : M<sup>me</sup> HEZIL N.**

**Devant le jury : Dr Metref A.  
Dr Mezali L.**

***Promotion : 2012***

## REMERCIEMENTS

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la volonté et le courage de pouvoir terminer ce modeste travail.

Et ensuite à :

Madame BAAZIZE-AMMI de nous avoir octroyé le privilège de nous orienter avec ses critiques et ses conseils pointu, pour mener au mieux notre travail et d'avoir su nous transmettre une partie de son sens aiguisé dans les travaux de recherches.

Madame HEZIL, notre Co-promotrice pour nous avoir bien encadré au cours de notre étude.

Monsieur Dr METREF AHMED, pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury de mémoire et avoir bien voulu examiner notre travail. Hommage respectueux.

Madame Dr MEZALI LYNDA, pour avoir bien voulu examiner notre travail.

Sincères remerciement.

A Monsieur GUETARNI, Madame BAAZIZE-AMMI et Madame HEZIL, pour leur accueil et pour avoir été disponible tout au long de la réalisation des analyses bactériologiques, au niveau du laboratoire de Microbiologie de département des sciences vétérinaires (Université-Saad Dahleb – Blida) et surtout pour leur sympathie.

Nous remercions également Dr KEBBAL et les étudiants, pour leur aide précieuse pour la réalisation des prélèvements nécessaires à notre étude.

Et pour être sur de n'oublier personne, que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué, par leur conseil, leurs encouragements ou leur amitié, à l'aboutissement de ce modeste travail, trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

## **Dédicace :**

A mes très chers parents pour leur générosité, sacrifice et pour leur aide  
continue. Que Dieu vous garde pour nous.

Je vous aime.

A mes grand parents ; longue vie pleine de santé.

A mon très cher frère : **AMINE**

Sache que je t'aime tendrement.

A ma très chère sœur **CELINA**

Tu restes toujours mon petit ange adoré

Merci de notre complicité en tant qu'une famille unie.

A ma binôme et copine : Manel

A mes amis

Qui m'ont particulièrement encouragé et motivé surtout Asma Louadjani

Ainsi, à toute la promotion 2011/2012

Très affectueux remerciement.

**IMANE TELDJI**

# **Dédicaces**

## **A mes parents**

Qui au fil des années m'ont donné cette force de continuer quand tout autour de moi incitait à arrêter ; ce modeste travail représente l'aboutissement du soutien qu'ils m'ont donné tout au long de mon cursus

## **A mes sœurs Sarah, Soumia, Lamia et mon frère Chafik**

Pour notre complicité retrouvée, nos délires et vos bons conseils.

Merci

## **A tout ma grande famille**

Qui m'a inculqué comme valeurs la persévérance, le courage et comme héritage cette envie de connaissance.

## **A mes amis de l'université**

Sans vous, les cliniques et l'université en général auraient été bien ternes.

Pour vos conseils avisés, vos encouragements.

A nos soirées mémorables, a la chambre chez les unes et les autres .A quand les prochaines parties ??

**A tous ceux qui, de près ou de loin, ont croisé mon chemin et ont participé à l'élaboration de ce mémoire.**

**Merci à tous.**

**Manel Robai**

## RESUME

La présente étude a porté sur la caractérisation des germes responsables de mammites cliniques en élevages laitiers au niveau de la wilaya de Blida (commune de chiffa) au moyen du Kit Speed mam utilisé comme méthode de screening et les méthodes classiques.

A partir des 16 échantillons nous avons obtenu : un échantillon négatif et 15 échantillons avec une seule espèce bactérienne. Ceci a permis l'isolement de 15 souches et l'identification de 11 espèces bactériennes à savoir :

6 souches du genre *Streptococcus* avec un taux de 40%

4 souches du genre *Staphylococcus* avec un taux de 26.67%

1 souche de la Famille *Enterobacteriaceae* avec un taux de 6.67%

4 autres souches non identifiées avec un taux de 26,67%

Nous avons noté une prédominance des streptocoques (40%), avec une répartition de 13,33% d'*Enterococcus faecium*, 13,33% d'*Enterococcus durans*, 6,67% d'*Enterococcus faecalis*, et 6,67% de *Streptococcus agalactiae*.

Les staphylocoques présentent un taux de 26,67%, dont 13,33% pour *Staphylococcus xylosus*, 6,67% pour *Staphylococcus lentus* et 6,67% pour *Staphylococcus sciuri* qui sont des staphylocoques à coagulase négative (germes pathogènes mineurs).

Les entérobactéries représentent 6,67% dont l'espèce *Serratia enterococcus*.

D'après notre étude, on constate la prédominance des mammites d'origine environnementales par rapport aux mammites à réservoir mammaire.

## ملخص

ركزت دراستنا على توصيف الكائنات الدقيقة المسببة لالتهاب الضرع بين قطعان البقر الحلوب، في ولاية البلدية (بلدية الشفة) باستخدام سييد مام كولور ( kit speed mam ) كوسيلة للفحص، و الطرق التقليدية . من بين 16 عينة، تحصلنا على عينة واحدة سالبة، و 15 عينة أين حددنا نوع واحد من البكتيريا ، هذا ما سمح لنا بعزل 15 سلالة و 15 نوع من البكتيريا، و هي كالآتي :

● 6 سلالات من جنس streptocoques بنسبة 40 %

● 4 سلالات من staphylocoques بنسبة 26.67%

● سلالة واحدة من عائلة entérobactéries بنسبة 6.67%

● 4% سلالات مجهولة الهوية بنسبة 26.67 %

لاحظنا أن الأغلبية تتمثل في البكتيريا العقدية streptocoques بنسبة 40 %

موزعة كالآتي :

*Enterococcus faecium* 13,33 % ، *Enterococcus durans* 13,33%

*Enterococcus faecalis* 6,67 % و *Streptococcus agalactiae* 6,67 %

تمثل نسبة المكورات العنقودية staphylocoques 26.67%، منها :

*Staphylococcus xylosum* 13,33% ، *Staphylococcus lentus* 6,67 %

*Staphylococcus sciuri* 6,67 % و التي هي مكورات عنقودية سالبة التخثر مسببة الأمراض البسيطة

تمثل البكتيريا المعوية entérobactéries نسبة 6,67 % من السلالات المعزولة التي تتضمن نوع واحد من البكتيريا

*Serratia entérocooccus*.

من دراستنا وجدنا الإنتشار الأغلب للإلتهابات البيئية المنشأ مقارنة بالإلتهابات ضرعية المنشأ .

## Summary

This study focused on the characterization of the causative organisms of clinical mastitis in dairy cattle in the wilaya of Blida (Chiffa) using Speed Kit mam as a screening method as well as conventional methods.

From the 16 samples we obtained a negative sample and 15 positive samples with a single bacterial species. This allowed the isolation and identification of 15 strains of 11 bacterial species namely:

6 strains of the genus *Streptococcus* with a rate of 40%

4 strains of the *Staphylococcus* genus with a rate of 26.67%

1 strain of the family *Enterobacteriaceae* with a rate of 6.67%

4 other unidentified strains with a rate of 26.67%

We noted a predominance of Streptococci (40%), with a distribution of 13.33% of *Enterococcus faecium*, 13.33%, of *Enterococcus durans*, 6.67% of *Enterococcus faecalis*, and 6.67% of *Streptococcus agalactiae*.

Staphylococci have a rate of 26.67%, with 13.33% of *Staphylococcus xylosus*, 6.67% of *Staphylococcus lentus* and 6.67% of *Staphylococcus sciuri* which are coagulase-negative Staphylococci (minor pathogens).

*Enterobacteriaceae* represent 6.67% with *Serratia enterococcus*.

In our study, we found the prevalence of mastitis origin with respect to environmental mastitis mammary tank.

## Liste des tableaux

---

<b>N° Tableau</b>	<b>Liste des Tableaux</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Classification des principaux germes responsables de mammites dans l'espèce bovine en fonction du pouvoir pathogène et du réservoir.	08
<b>II</b>	L'identification biochimique des entérobactéries	34
<b>III</b>	Taux des mammites cliniques lors de chaque passage	35
<b>IV</b>	Analyse bactériologiques.	36
<b>V</b>	l'identification préliminaire des colonies caractéristiques sur gélose au sang.	37
<b>VI</b>	Les différentes espèces isolées d'un lait de vache présentant une mammite clinique.	38

## Listes des figures

<b>Figures N<sup>o</sup></b>	<b>Liste des figures</b>	<b>Pages</b>
<b>1</b>	Les cellules sécrétoires (cellules alvéolaires) et les canaux formant ce système sécréteur de la glande mammaire.	02
<b>2</b>	Californian Mastitis Test (CMT).	10
<b>3</b>	Présentation du kit Speed <sup>®</sup> mam color.	22
<b>4</b>	Présentation de la galerie Speed <sup>®</sup> mam color.	24
<b>5</b>	Protocole expérimental.	26
<b>6</b>	Identification de la mini galerie.	27
<b>7</b>	Inoculation du puits témoin IL.	27
<b>8</b>	Inoculation du milieu de culture stérile.	27
<b>9</b>	Inoculation des autres puits.	27
<b>10</b>	L'ajout du supplément de staphylocoques.	28
<b>11</b>	L'ajout d'huile de paraffine.	28
<b>12</b>	Lecture des puits témoins.	28
<b>13</b>	Lecture des puits des antibiotiques.	29
<b>14</b>	Lecture des puits d'identification des germes.	30
<b>15</b>	Aspect de la culture sur gélose au sang (streptocoques).	31
<b>16</b>	Observation des streptocoques (GR x 100).	32
<b>17</b>	Catalase positive.	32
<b>18</b>	Ensemencement d'une galerie API.	33
<b>19</b>	Taux des mammites cliniques lors de quatre passages au sein d'un même élevage	35
<b>20</b>	Résultats de la bactériologie.	36
<b>21</b>	Représentation graphique des résultats de l'identification globale.	37
<b>22</b>	Représentation graphique des résultats de l'identification bactérienne.	39

## Liste des abréviations

**ACTH** : Adenocorticotropie hormone

**CMT** : Californian Mastitis Test.

**PCR** : Polymérase chain reaction.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**TCK** : Taux cellulaire de tank.

**CCI** : Comptage cellulaire individuel.

**TCT** : Taux cellulaire du troupeau.

# Sommaire

---

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Anatomie et physiologie de la mamelle.

I-1-Définition.....	1
I-2-Anatomie de la mamelle.....	1
I-2-1-Morphologie externe.....	1
I-2-2-Morphologie interne.....	1
I-3-Physiologie de la lactation.....	2
I-4-Tarissement.....	3
I-5-Mécanismes de défenses.....	3
I-5-1-Les défenses passives.....	3
I-5-2-Les défenses actives.....	3

### Chapitre II : Etiologie des mammites.

II-1-Définition.....	4
II-2-Classification des mammites .....	4
II-2-1-Mammites cliniques .....	4
II-2-1-1-Mammites cliniques suraigües.....	4
II-2-1-2-Mammites cliniques aiguës .....	5
II-2-1-3-Mammites cliniques chroniques.....	5
II-2-2-Mammites subcliniques .....	5
II-3-Pathogénie .....	5
II-4-Etiologie.....	6
II-4-1-Les pathogènes majeurs.....	6
a-Les pathogènes contagieux.....	7
b-Les pathogènes environnementaux .....	7
II-4-2-Les pathogènes mineurs .....	7
II-4-3-Les pathogènes occasionnels .....	8

### Chapitre III : Diagnostic des mammites.

III-1-Diagnostic individuel .....	9
III-1-1-Diagnostic clinique .....	9

# Sommaire

---

III-1-2-Diagnostic expérimental .....	9
III-1-2-1-Techniques directes de numération cellulaire .....	9
III-1-2-2-techniques indirectes de numération cellulaire .....	10
a-Le Californian Mastitis Test (CMT) .....	10
b-Mesure de la conductivité électrique du lait .....	11
III-1-3-Diagnostic bactériologique .....	11
III-1-3-1-Le prélèvement .....	11
III-1-3-2-L'examen bactériologique .....	12
III-1-3-2-1-Ensemencement .....	12
III-1-3-2-2-Identification .....	13
III-1-4-Autres méthodes .....	13
III-1-4-1-Speed mam color .....	13
III-1-4-2-La polymérase chaine réaction (PCR) .....	13
III-1-4-3-Test immuno-enzymatique (ELISA) .....	14
III-1-5-Diagnostic biochimique .....	14
III-2-Diagnostic collectif .....	14
..	
<b>Chapitre IV : Traitement et prophylaxie</b>	
IV-1-Le traitement des mammites .....	16
IV-1-1-Le moment du traitement. ....	16
IV-1-1-1-Le traitement au tarissement (Dry Cow Therapy) .....	16
IV-1-1-2-Le traitement en lactation .....	16
IV-1-2-Voie du traitement .....	17
IV-1-2-1-Le traitement parentéral.....	17
IV-1-2-2-Les infusions mammaires .....	17
IV-1-3-Causes possibles de l'échec thérapeutique .....	17
IV-2-Prophylaxie des mammites.....	19
IV-2-1-Prophylaxie sanitaire .....	19
A-L'élimination des infections existantes .....	19
b-L'elimination des facteurs stressants .....	19
IV-2-2-Prophylaxie médicale .....	20

# Sommaire

---

## Partie expérimentale

I.1. Matériels.....	21
I.1.1. Echantillonnage .....	21
I.1.2. Matériels non biologique .....	21
I.1.3. Présentation du kit Speed <sup>®</sup> mam color .....	22
I.2. Méthodes .....	25
A. Mini galerie Speed <sup>®</sup> mam color.....	27
B. Protocole d'identification bactérienne (à l'échelle espèce) au moyen des méthodes classiques .....	30
I-2-1. Identification préliminaire .....	31
I-2-2. Identification spécifique par galeries API.....	33
I-2-3. Identification biochimique des entérobactéries .....	34
I-3. Résultats .....	35
I-3-1. Résultats du diagnostic cellulaire .....	35
I-3-2. Analyse bactériologique .....	36
I-3-3. Identification des souches bactériennes isolées.....	36
I-4. Discussion.....	40

## Recommandations

## Conclusion

# Introduction

---

Les mammites représentent une des pathologies les plus dominantes qui pénalisent la rentabilité des exploitations laitières par de lourdes pertes économiques correspondant au coût du traitement, aux réformes de vaches incurables et aux pertes de production laitière.

La mammite chez la vache laitière est une pathologie multifactorielle, parmi ces facteurs on a ceux qui sont liés à l'animal (l'hérédité, la conformation et la position de la mamelle, le niveau de la production laitière, le stade et le numéro de lactation), et les facteurs extrinsèques (la traite, le mauvais usage de la machine à traire et l'hygiène) ainsi que l'environnement qui correspond à la litière, logement et la saison (Baroun et al, 1999) ; diminuant ainsi la résistance de la mamelle à l'infection (Meissonier et al, 1992).

La connaissance des principales espèces bactériennes responsables de mammites, de leur fréquence ainsi que leurs pathogénies respectives représente un intérêt réel pour aider le praticien dans ses choix thérapeutiques en les adaptant au contexte épidémiologique propre à chaque élevage (Bouveron, 2001). L'utilisation du diagnostic bactériologique pour la caractérisation de l'agent causal demeure la seule méthode fiable mais limitée par son coût et sa durée pour l'instauration d'un traitement efficace (Manner, 2001)

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence les principaux germes pathogènes responsables des mammites cliniques dans un élevage de la wilaya de Blida au cours d'une période donnée pour cela nous avons opté pour :

- L'utilisation du kit (Speed mam color) comme méthode de screening.
- La méthode microbiologique classique pour isolement et identification des germes

# Partie bibliographique

# CHAPITRE I

Anatomie et physiologie de la mamelle

## I-1-Définition

La mamelle synthétise du lait destiné à la nourriture du nouveau-né, les glandes mammaires n'entrent normalement en fonction qu'à la fin de la gestation ; leur développement comme les phénomènes sécrétoires sont dépendants des hormones génitales. Sa fonction se caractérise par la production successive de deux sécrétions différentes : le colostrum et le lait, indispensables à la survie de la descendance des espèces (Fourar et al, 2007 ; Dérivaux et Ectors, 1980).

## I-2-Anatomie de la mamelle

### I-2-1-Morphologie externe

La vache possède deux paires de mamelles inguinales, deux quartiers antérieurs et deux quartiers postérieurs. Chaque mamelle se prolonge par un trayon au sommet duquel s'ouvre le canal du trayon (Hollmann, 1974). Les mamelles sont réunies extérieurement par une masse hémisphérique appelée le pis (Hanzen, 2000). En effet, ce dernier est volumineux, comportant quatre tétines ou trayons disposées en quadrilatère (Vaissaire, 1977). La peau a essentiellement un rôle d'emballage, elle n'intervient pas ou peu dans le support de la mamelle (Guy, 1986).

### I-2-2-Morphologie interne

Les quatre quartiers du pis sont séparés par un ligament médian de fixation et par des ligaments latéraux (profond et superficiel) de support qui les attachent à la paroi abdominale et au bassin. Les quartiers avant et arrière sont séparés par une fine membrane conjonctive (Hanzen, 2000).

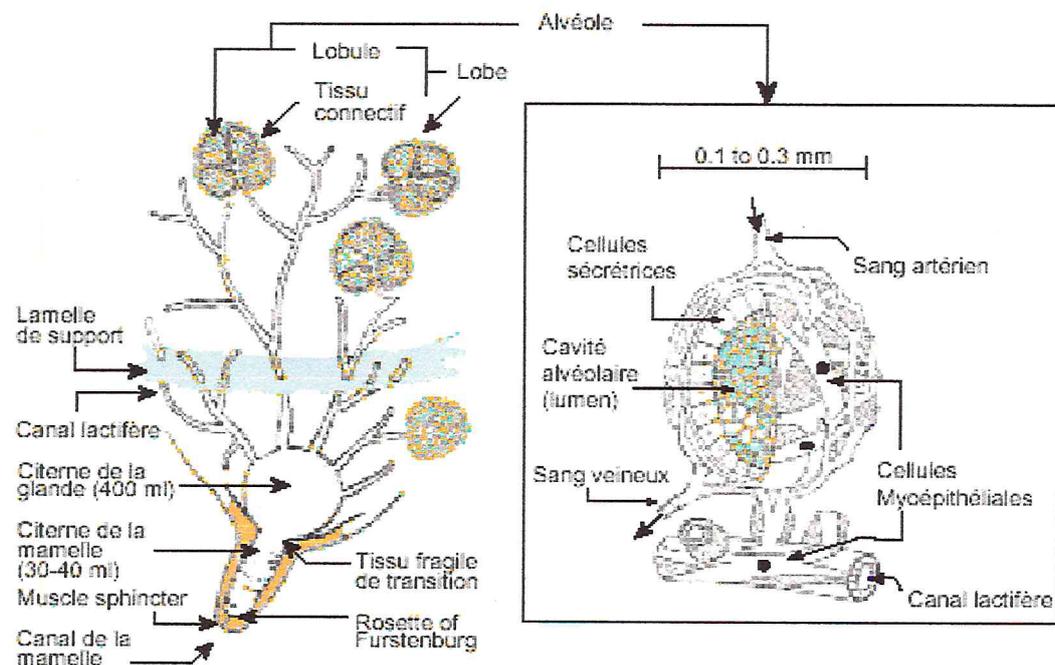
L'extrémité libre du trayon est percée au centre par le « méat du trayon » qui est fermé par un sphincter et se continue par un court conduit papillaire « le canal du trayon ». En allant vers les alvéoles, se trouve un repli muqueux la « Rosette de Fürstenberg » anneau tissulaire renfermant des lymphocytes, impliqué dans les premières étapes de la réponse immunitaire (reconnaissance de germe) elle constitue en cas d'infection mammaire le principal point de passage des leucocytes du sang vers le lait (Hanzen, 1999 ; Dosogne et al, 2001).

Le tissu glandulaire comprend des acini ou alvéoles de 100 à 300 microns de diamètre ; ils représentent l'unité sécrétoire de la glande mammaire ; et des organes conducteurs (canaux). Les alvéoles ont un épithélium constitué d'une seule couche de cellules. Le lait produit par

chaque alvéole est drainé par un petit canal. Les canaux excréteurs forment une arborisation touffue. Ils se terminent dans le sinus galactophore qui communique avec le canal du trayon (Guy, 1986).

Le système vasculaire apporte au pis les nutriments nécessaires à la production de lait et les hormones qui contrôlent son développement, la synthèse du lait, et régénération des cellules sécrétrices entre deux lactations et pendant la période de tarissement (Wattiaux, 1999).

Le système nerveux est composé de fibres sensibles. Il n'existe pas de nerf moteur mammaire et le fonctionnement mammaire est commandé par des mécanismes hormonaux (Derivaux et Ectors 1980). Le stroma est formé de tissu conjonctif et de tissu adipeux. Il s'insinue entre les quartiers sécrétoires et constitue la majorité des tissus des glandes non sécrétrices tandis que chez les femelles en lactation, il se réduit au profit du parenchyme sécrétoire (Capuco et al, 1995).



**Figure 01:** Les cellules sécrétrices (cellules alvéolaires) et les canaux formant ce système sécréteur de la glande mammaire (Wattiaux.1999).

### I-3-Physiologie de la lactation :

#### ► Galactopoïèse :

L'excitation extérieure du mamelon par succion ou par traite est transmise par voie nerveuse au niveau de la région hypothalamo-hypophysaire qui y répond par voie humorale en

secrétant la prolactine, l'ACTH et l'ocytocine qui sont déversés dans le milieu intérieur d'où elles agiront sur la glande mammaire.

L'ocytocine, déversée dans le sang, agit au niveau des cellules myoépithéliales des acini qui, en se contractant, poussent le lait dans les canaux galactophores (Derivaux et Ecrors, 1980).

#### **I-4-Tarissement :**

Le tarissement se définit comme une phase physiologique transitoire en fin de lactation ; il se produit par diminution des réflexes de stimulation, donc par chute des influences hormonales (Serieys, 1997).

#### **I-5-Mécanismes de défenses :**

On peut classer les défenses de la mamelle en deux grands types de mécanismes :

##### **I-5-1-Les défenses passives :**

Ce sont des mécanismes dont la fonction principale n'est pas une fonction de défense.

Ils siègent essentiellement au niveau du canal du trayon (Lebret et al, 1990).

##### **I-5-2-Les défenses actives :**

Ces mécanismes sont essentiellement ceux qui sont mis en jeu une fois que l'agent infectieux a dépassé le canal du trayon (Lebret et al, 1990).

Plusieurs protéines du lait sont douées d'activités antibactériennes non spécifiques dont le lysozyme, la lactoferrine, le système lactoperoxydase / thiocynate / peroxyde d'hydrogène, le système du complément, les anticorps, etc....

## CHAPITRE II

### Etiologie des mammites

## II-1-Définition

Une mammite est l'inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la glande mammaire (Poutre, 1985). Les mammites peuvent être provoquées par une blessure physique, chimique, biologique ou autre, mais la cause la plus fréquente est l'invasion de la glande par des bactéries ou d'autres micro organismes (des champignons, des moisissures) (Wattiaux, 2006). Elle se caractérise par des changements physiques et chimiques du lait et par des lésions pathologiques du tissu glandulaire. Les modifications les plus importantes du lait comprennent un changement de couleur, une présence de caillé et d'un grand nombre de leucocytes, alors que le plus souvent la maladie s'accompagne de gonflement, de rougeur, et d'induration de la glande mammaire (Blood et Henderson, 1976).

## II-2-Classification des mammites

Selon les symptômes, les mammites sont classées comme suit :

### II-2-1-Mammmites cliniques

Elles se traduisent par des signes locaux sur le lait (présence de grumeaux, anomalies de consistance, de couleur, d'odeur ...) avec une baisse importante de la production laitière, qui peut dans les cas extrêmes aller jusqu'à l'arrêt de celle-ci et/ou des signes visibles sur la mamelle (quartier chaud, congestionné, dur, rouge et sensible) (Dudouet et Christian, 1999).

Selon la gravité de l'infection, les mammites cliniques sont divisées en 3 catégories :

#### II-2-1-1-Mammmites cliniques suraigües

Elles sont caractérisées par une inflammation de la mamelle, apparaissent brutalement après le vêlage avec atteinte de l'état général de l'animal (fièvre, abattement ...) cette inflammation entraîne une forte congestion de la mamelle (quartier enflé, chaud, rouge, douloureux). Il y a soit une modification de la sécrétion laitière (aspect séreux, aqueux, hémorragique ou purulent) soit une interruption de celle ci (Lacasse, 2003). Elles sont rares mais souvent mortelles (Vestweber et Leipold, 1993).

Ce type de mammites présente deux formes :

La forme paraplégique : entraîne le décubitus de l'animal, provoquée par les coliformes et entraîne le syndrome d'hypothermie.

La forme gangréneuse : caractérisée par un quartier bleu, froid, avec une sécrétion nauséabonde. Les parties nécrosantes tombent du corps, provoquées par *Staphylococcus aureus* ou parfois par des bactéries anaérobies (*Clostridium*) (Hanzen et Pluvinage, 2007).

### **II-2-1-2-Mammmites cliniques aiguës**

Dans les cas extrêmes des mammites aiguës, la vache présente des signes généraux tels que la fièvre, l'abattement, un rythme cardiaque élevé, la perte d'appétit et parfois des troubles nerveux (Wattiaux, 2006). La production laitière est altérée en quantité et en qualité. Ce type de mammites peut survenir à tous les stades de la lactation et est déclenché par différentes bactéries ; si elles ne sont pas traitées, l'évolution vers la chronicité est fréquente (Lacasse, 2003).

### **II-2-1-3-Mammmites cliniques chroniques**

Ces mammites entraînent une inflammation modérée, mais persistante de la mamelle évoluant lentement sur plusieurs mois, parfois plusieurs années voire durant la vie entière de l'animal. Elles font suite à une mammite aiguë ou suraiguë. L'état général de l'animal n'est pas affecté, les symptômes locaux sont discrets et se traduisent par la présence dans le parenchyme mammaire de zones de fibrose de taille et de localisation variables, palpables après la traite. Le lait présente des grumeaux dans les premiers jets, la sécrétion diminue, le quartier s'indure et finit par se tarir complètement et s'atrophier (Vestweber et Leipold, 1993).

### **II-2-2-Mammmites subcliniques**

Beaucoup plus fréquentes que les mammites cliniques, correspondent à 98% des infections de la mamelle (Hanzen, 2000). L'état général de l'animal est normal, avec une mamelle saine et le lait ne présente pas de modifications macroscopiquement visibles. Le seul signe d'infection est la présence dans le lait de cellules somatiques et d'un nombre élevé de micro organismes (Wattiaux, 2006). Elles sont souvent dues à une seule espèce bactérienne parfois à deux et exceptionnellement à trois espèces présentes simultanément (Bruyas, 1997).

L'infection subclinique peut guérir spontanément ou rester à ce stade plusieurs mois, elle peut aussi s'aggraver (Levesque, 2000).

## **II-3-Pathogénie**

Le processus infectieux passe par trois phases :

**➤ Phase d'invasion**

Représentée par la pénétration des germes à partir du milieu extérieur vers le canal du trayon, sauf dans le cas des mammites tuberculeuses dans lesquelles la voie de pénétration peut être hématogène (Blood et Henderson, 1976).

Les germes franchissent le canal du trayon selon trois grandes modalités :

Soit pendant la traite par les mains de trayeurs ou lors de la préparation de la mamelle au moment de la traite (machine mal réglée ou contenant du lait contaminé).

Soit entre les traites par capillarité *via* le canal du trayon, principalement dans les 20 minutes qui suivent la traite.

Soit par l'introduction directe des germes dans le trayon lors d'un traitement par voie mammaire (Alexandre, 2005).

**➤ Phase d'infection**

Après l'invasion, les germes se multiplient rapidement dans le tissu glandulaire, certains peuvent être localisés dans le canal du trayon. La multiplication des germes s'accompagne par la production d'enzymes et de toxines qui entraînent la destruction du tissu sécrétoire, avec modification qualitative du lait (Serieys et Seegers, 2002).

**➤ Phase d'inflammation**

Lors d'infection, les lésions du tissu sécrétoire provoquent l'afflux massif de polynucléaires neutrophiles sanguins dans la glande par diapédèse. Ces derniers deviennent alors le type de cellule majoritaire dans le lait. Ils représentent de 50% des cellules lors d'une infection modérée, à 90% lors de mammites aiguës. L'afflux massif des polynucléaires modifie profondément la qualité de la sécrétion : le lait contient des caillots de fibrine et des grumeaux. (Noireterre, 2006).

**II-4-Etiologie****II-4-1-Les pathogènes majeurs**

Ils se divisent en deux sous groupes :

**a-Les pathogènes contagieux**

Les pathogènes contagieux peuvent être considérés comme des organismes adaptés à survivre et se proliférer sur la peau, au niveau des trayons et/ou dans le pis des vaches infectées. Ces microorganismes engendrent le plus souvent des mammites de type subclinique (Hanzen, 1999).

Les principaux représentants des germes contagieux sont :

- ***Staphylococcus aureus*** : C'est le pathogène mammaire prédominant, présent dans plus des 90 % des troupeaux laitiers. Ce germe provoque des mammites qui évoluent vers la forme subclinique, mais dans de nombreux cas, vers la forme clinique (Kerro *et al*, 2002).
- ***Streptococcus agalactiae*** : Les infections intra mammaires causées par ce germe sont de moins en moins fréquentes (Lacasse, 2003).

**b-Les pathogènes environnementaux**

Les pathogènes environnementaux sont décrits comme des envahisseurs opportunistes de la glande mammaire. La plupart pénètrent la glande, engendrent une réponse immunitaire et sont rapidement éliminés. On les retrouve dans l'environnement entourant la vache comme sur le sol, l'eau ... (Bradley, 2002). On compte plusieurs microorganismes dont les principaux sont :

- ***Escherichia coli*** : Souvent responsable de mammites en période de tarissement. La mammite à *E.coli* est habituellement de courte durée; moins de dix jours dans plus de 50% des cas et moins de trente jours dans près de 70% des cas. (Linton et Robinson, 1984).
- ***Streptococcus uberis*** : Ce germe cause des infections de courte durée, non contagieuses et ayant un effet beaucoup moins rude sur l'état général de la vache. Ses réservoirs principaux sont, le pis, les trayons et la litière. Les infections mammaires causées par *Streptococcus uberis* sont souvent en relation avec les saisons (la majorité des infections se déroulent en hiver), le cycle de lactation (durant la période de tarissement) et l'âge de l'animal (le plus souvent sur des vaches âgées). (Schukken *et al*, 1991).

**II-4-2-Les pathogènes mineurs**

Les pathogènes mineurs de la glande mammaire sont dénommés ainsi car ils causent généralement peu de problèmes. Ces germes sont des hôtes normaux des animaux. Ils englobent principalement les staphylocoques à coagulase négative. Les plus fréquemment isolés sont *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus hyicus*. Cependant, *S.warnen*,

*S.epidermis*, *S.simulans*, *Sxylopus*, *S.hominis* et *Sciuri* sont aussi rencontrées (Timms et Shuetz, 1987).

#### II-4-3-Les pathogènes occasionnels

Ce sont des microorganismes comme certaines levures et des mycoplasmes, organismes hautement contagieux tels que *Mycoplasma bovis* (Lacasse, 2003).

**Tableau I :** Classification des principaux germes responsables de mammites dans l'espèce bovine en fonction du pouvoir pathogène et du réservoir (Hanzen, 1999).

	Pathogènes majeurs	Pathogènes mineurs
<b>Germes contagieux</b>	Staphylocoques à coagulase positive <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>	Staphylocoques à coagulase négative. <i>Actinomyces bovis</i>
<b>Germes d'environnement</b>	<i>Escherichia coli.</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Hafnia</i> spp. <i>Citrobacter freundii</i> Levures Champignons

## CHAPITRE III

### Diagnostic des mammites

Chez les bovins, le diagnostic des affections de la mamelle, est non seulement une exigence fondamentale de l'hygiène, de la production laitière, mais il conditionne également le traitement et la prophylaxie des lésions risquant d'altérer le niveau de la production laitière (Rosenberger et al, 1979). Il est aussi la base fondamentale des programmes de contrôle et de suivi de la santé du pis dont l'objectif à long terme est de prévenir les nouvelles infections, et l'objectif à court terme est d'évaluer les protocoles de traitement ou de trouver la cause de l'infection (Wallace, 2007).

### **III-1-Diagnostic individuel**

#### **III-1-1-Diagnostic clinique**

Le diagnostic clinique d'une mammite repose sur l'évaluation de plusieurs critères (état général, appétit, température, consistance de la mamelle, aspect du lait et le niveau d'hydratation) (Renaud, 2002).

#### **III-1-2-Diagnostic expérimental**

Le diagnostic des mammites sub-cliniques nécessite la mise en évidence d'une augmentation du taux cellulaire du lait.

##### **III-1-2-1-Techniques directes de numération cellulaire**

###### **❖ Le counter coulter**

L'appareil comprend une sonde en verre munie d'un orifice calibré (100 microns). Deux électrodes entre lesquelles passe un courant électrique sont placées de chaque côté de l'orifice. Le passage d'une particule dans l'ouverture modifie la résistance électrique du milieu. La technique de comptage est basée sur la mesure des variations de conductivité liées au passage des cellules somatiques (Alexandre, 2005 ; Grappin et Jeunet, 1971)

###### **❖ Le fossomatic**

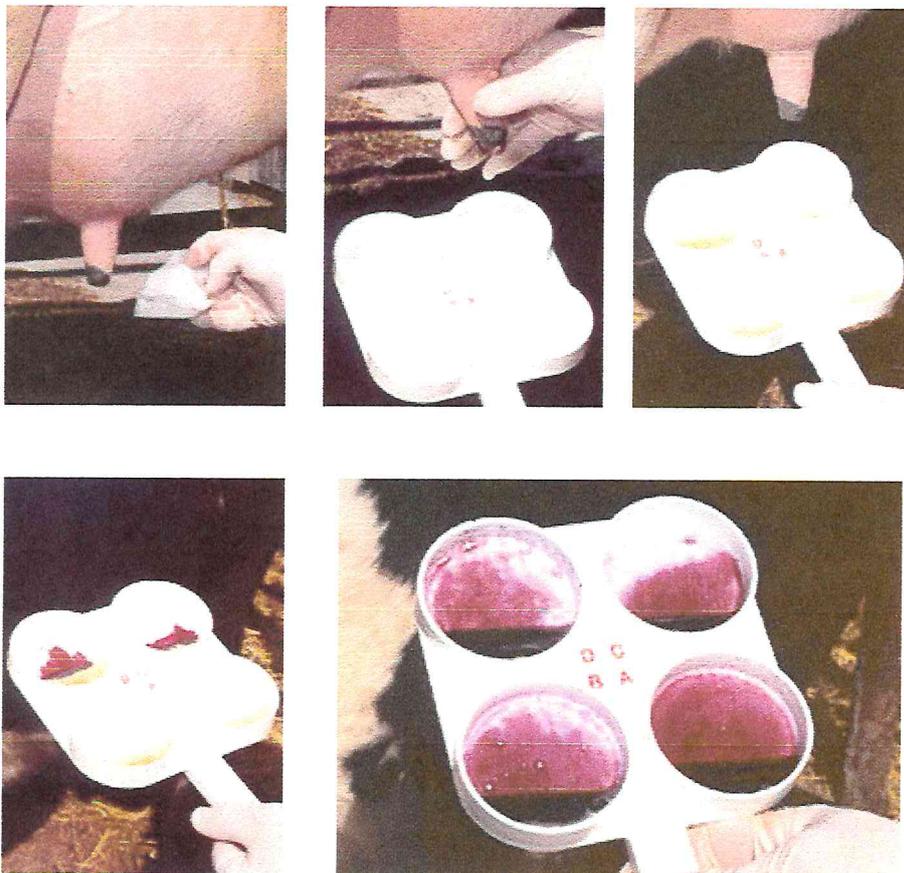
Il s'agit d'une méthode fluoro-optoélectrique. Le principe consiste à compter les noyaux des cellules du lait rendus fluorescents par coloration au bromure d'éthidium (agent intercalant de l'ADN). Le lait est disposé sur un disque. La fluorescence est émise par cellules après excitation à une longueur d'onde spécifique (Leray, 1990).

**III-1-2-2-techniques indirectes de numération cellulaire****a- Le Californian Mastitis Test (CMT)**

Le CMT permet un suivi plus fréquent des animaux car il peut être réalisé par l'éleveur lui-même en salle de traite et donne un résultat immédiat et quartier par quartier. Il peut être utilisé en l'absence de contrôle laitier ou en complément de celui-ci (Hanzen, 2006).

Il consiste à mélanger en quantités égales (2 ml) du lait issu de chaque quartier, après élimination des premiers jets, avec un réactif tensioactif (solution de Na-teepol) qui provoque l'éclatement des cellules et la précipitation de leur ADN et d'une solution de pourpre de bromocrésol à 1/10 000 qui joue le rôle d'indicateur de pH (Bennet, 1993 ; Bosse, 1982)

La consistance du mélange permet d'évaluer le taux cellulaire de chaque quartier. La lecture doit être immédiate. L'interprétation dépend de l'opérateur (Hanzen, 2006).



**Figure 02: Californian Mastitis Test (CMT)**

**b- Mesure de la conductivité électrique du lait**

Lors de mammite, la concentration du lait en éléments filtrés, notamment en ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ , augmente. Il en résulte une brusque augmentation de la conductivité électrique du lait. Mais en comparant cette méthode de détection des mammites sur le lait des quatre quartiers avec les autres pratiques de détection des mammites, on se rend compte que celle-ci manque à la fois de sensibilité et de spécificité (Billon et al, 2001). Par contre, la valeur prédictive positive augmente si l'on passe à l'échelle du quartier.

**III-1-3-Diagnostic bactériologique**

Les analyses bactériologiques permettent d'infirmier ou de confirmer le diagnostic dans le but d'extrapoler à l'ensemble du troupeau la responsabilité des espèces dominantes dans les problèmes constatés. Le recours à ces analyses s'avère intéressant pour passer du diagnostic épidémiologique au diagnostic étiologique et ainsi, mieux cibler les actions préventives par rapport à des espèces bactériennes bien déterminées (Faroult, 1994).

**III-1-3-1-Le prélèvement****Méthode de prélèvement**

La technique décrite ci-dessous doit être rigoureusement suivie :

Elle doit être effectuée avant la traite, car la sensibilité de détection est plus grande (Salat, 2008).

- ✓ lavage et séchage de la mamelle et des trayons.
- ✓ Désinfection de l'extrémité du trayon avec de l'alcool à 70° pendant au moins 20 secondes, il est important d'insister sur l'orifice du canal du trayon.
- ✓ Lorsque les prélèvements portent sur plusieurs quartiers, la désinfection commence par le plus éloigné et finit par le plus proche, la désinfection se prolonge tant que le tampon se salit au contact de l'extrémité du trayon.
- ✓ Elimination des premiers jets de traite ; possibilité pour certains germes de gagner la mamelle par voie ascendante).
- ✓ Prélèvement d'environ 10ml de sécrétion mammaire par traite dans un flacon stérile maintenu incliné presque horizontalement et manipulé en prenant les précautions rigoureuses d'asepsie.
- ✓ Les flacons sont identifiés, datés et expédiés au laboratoire.

Lorsque l'on prélève plusieurs quartiers, on respecte un ordre de prélèvement inverse de celui de la désinfection, afin d'éviter de toucher un trayon non encore prélevé avant de le prélever (Mialot, 1988 ; Leroux, 1982).

### **Conservation des prélèvements**

Les prélèvements doivent être amenés dans l'heure qui suit au laboratoire ou être conservés au réfrigérateur entre 2°C et 8°C, si l'analyse est effectuée dans les 24 heures. Au-delà les prélèvements doivent être congelés et maintenus à une température inférieure à -18°C (Manner, 2001).

### **III-1-3-2-L'examen bactériologique**

Le but de l'examen bactériologique est d'identifier les bactéries isolées afin de confirmer une suspicion épidémiologique d'un élevage (Faroult et Serieys, 2001). La caractérisation des bactéries présentes dans le prélèvement de lait provenant d'une vache atteinte de mammite passe par plusieurs étapes successives :

- ✓ Ensemencement direct ou indirect (avec enrichissement ou dilution préalable).
- ✓ Isolement et purification.
- ✓ Identification biochimique et éventuellement un antibiogramme.

#### **III-1-3-2-1-Ensemencement**

L'ensemencement se fait sur gélose de base, parfois enrichi au sang de cheval (Schukken et al. 1989) ou de mouton, ce qui permet la croissance de la plus part des espèces bactériennes (Poutrel, 1985 ; Messadi, 1990), y compris les bactéries réputées exigeantes. En outre, ces géloses au sang permettent d'avoir une première idée des germes en cause d'après l'aspect des colonies (Bouchout et al. 1985). La formation de pigment ainsi que la détection des zones d'hémolyse.

L'ensemencement direct du lait sur des milieux sélectifs est envisageable pour la recherche de certaines espèces bactériennes. L'incubation des boîtes ensemencées se fait en atmosphère aérobie (l'anaérobiose pour les Streptocoques et les Mycoplasmes) à la température de 37°C pendant 24 à 48 heures. Toute souche isolée est repiquée sur gélose jusqu'à purification.

### III-1-3-2-2-Identification

L'isolement et l'identification sont effectués suivant les normes habituelles (Feilloo et Martel, 1996).

Chaque microorganisme est identifié par les caractéristiques morphologiques et biochimiques des colonies (Ferney et al. 1994).

- ✓ La coloration de Gram et l'observation au microscope nous permettent d'orienter l'identification biochimique des espèces bactériennes.
- ✓ Un test de catalase est effectué pour les cocci Gram positif.
- ✓ Un test de l'oxydase pour les bacilles à Gram négatif.
- ✓ Identification biochimique : Les galeries classiques : Elles permettent de mettre en évidence les caractéristiques biochimiques des bactéries (Feney et al. 1994). Toutefois, il est à noter que leur utilisation tend à disparaître au profit des galeries API. Dans ces dernières chaque souche bactérienne est identifiée à l'aide d'une galerie comportant des cupules avec des réactifs différents dans lesquelles sont inoculées quelques gouttes de suspension bactériennes.

Après 24 heures d'incubation, on procède à la lecture et on attribue à chaque test un résultat. Un score qui tient compte de tous ces résultats est alors donné à étudier (combinaison à plusieurs chiffres). Le type moléculaire permet de vérifier l'identité des souches bactériennes (Henry, 2001)

### III-1-4-Autres méthodes

#### III-1-4-1-Speed mam color

C'est une galerie de micro-puits permettant une mise en culture spécifique et directe du prélèvement de lait sur une galerie portée à 35°C

En 24h, la lecture visuelle par 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, détectables à des concentrations bactériennes supérieures à  $10^3$  (Manner 2001).

#### III-1-4-2-La polymérase chaine réaction (PCR)

La PCR est une méthode moléculaire qui identifie l'agent pathogène par la présence d'ADN, utilisable seulement en laboratoire. La PCR s'effectue directement sur le lait ou

après enrichissement. Les avantages de la PCR sont que les bactéries peuvent être vivantes ou non, qu'on peut utiliser des échantillons contenant des antibiotiques et que les résultats sont disponibles en 24 heures. Par contre, ce test ne peut pas être réalisé à la ferme et est plus coûteux.

Actuellement la PCR n'est utilisée que pour la détection de certains organismes dans le lait (*S.aureus*, *Str.agalactia* et *Mycoplasma spp*) (Jodi, 2007).

#### **III-1-4-3-Test immuno-enzymatique (ELISA)**

Les tests enzymatiques peuvent mettre en évidence un antigène ou un anticorps, le complexe Ag-AC formé est révélé au moyen d'une réaction enzymatique colorée quantitativement mesurable.

La recherche des AC (IgG surtout) peut se faire sur le lait entier ou sur le lactosérum après coagulation, la spécificité de la méthode dépend essentiellement de la nature de l'Ag utilisé.

La recherche des Ag se fait habituellement sur le lait entier soit par la méthode Sandwich ou par les méthodes d'inhibition ou de compétition. La mise en évidence des Ag est souvent rendue difficile par la faible concentration en bactéries des laits infectés. Aussi, il est parfois nécessaire d'incuber les échantillons pendant quelques heures (Hanzen, 2009).

#### **III-1-5-Diagnostic biochimique**

Les modifications biochimiques de la composition du lait résultent d'une double modification de la fonction de synthèse et de filtration de la glande mammaire de certains éléments tels que les protéines, le lactose et certains ions. Les variations individuelles (en fonction de la race, du numéro et du stade de lactation, de l'alimentation...) telles que ces techniques sont difficilement utilisables en pratique (Hanzen et Plurvinage.2, 2007).

#### **III-2-Diagnostic collectif :**

Le diagnostic collectif est réalisé plusieurs fois par mois par la laiterie ou le contrôle laitier sur le lait de mélange, par mesure du taux cellulaire de tank (TCK) par le même genre d'appareil que pour la mesure du CCI individuel.

La mesure du TCT donne le niveau d'infection du troupeau et est important pour détecter un problème de mammites sub-cliniques dans le troupeau.

Le taux cellulaire de tank est très important pour l'éleveur puisqu'il est l'une des conditions de collecte et de paiement du lait (Noireterre, 2006).

## Chapitre IV

Traitement et prophylaxie

### IV-1-Le traitement des mammites

La mise en place d'une approche curative de la mammite dans un élevage n'est pas chose aisée. Elle doit prendre en considération divers paramètres relatif au :

- Diagnostic (symptomatique versus étiologique, précoce ou tardif, individuel ou d'élevage),
- Germe (localisation au niveau des réservoirs, résistance),
- Animaux (symptômes cliniques ou subcliniques),
- Antibiotique (propriétés pharmacodynamique et pharmacocinétique, interaction et efficacité),
- Moment du traitement (en lactation voir au tarissement),
- Aux conséquences du traitement (aspects économiques, résidus, bonnes pratiques vétérinaires).

Il n'est pas inutile de rappeler que la réussite d'une antibiothérapie est liée à une intervention rapide, massive et prolongée (Faoult. 2005).

#### IV-1-1-Le moment du traitement

Un traitement doit être aussi précoce que possible. Le choix dépendra des symptômes présentés par l'animal. On privilégiera le traitement en lactation pour les mammites cliniques et le traitement au tarissement pour les mammites sub-cliniques (Radostis, 1997).

##### IV-1-1-1-Le traitement au tarissement (Dry Cow Therapy) :

L'involution de la glande mammaire qui suit le tarissement s'accompagne d'une désorganisation des épithéliums de surface, ce qui permet une diffusion bien plus facile des antibiotiques à l'intérieur des tissus et favorise leur accès aux bactéries (Salat, 2008).

Donc, le traitement au tarissement pourra être plus efficace qu'un traitement au cours de la lactation, car on pourra utiliser une dose plus importante d'antibiotique sans crainte de résidus dans le lait et le contact sera étroit et prolongé avec le germe du fait de l'involution mammaire et de l'absence d'effet chasse-lait (Poirier, et Christen, 2008).

##### IV-1-1-2-Le traitement en lactation

Il doit être réservé aux mammites cliniques ou lorsqu'il présente un intérêt économique certain, par exemple en début de lactation, ou dans le cas de mammites à *Str. agalactiae*, dont l'efficacité d'un traitement en lactation est élevée (80 à 100%) mais faible contre les staphylocoques (15 à 60%) pour trois raisons :

- Sa capacité à survivre au sein des leucocytes échappant ainsi à l'action de la majorité des antibiotiques,
- La fibrose induite par cette infection qui rend difficile la diffusion de l'antibiotique,
- Enfin, la transformation du staphylocoque en forme L (Hanzen et pulvinage, 2008).

#### IV-1-2-Voie du traitement

Il existe deux types de voies de traitement à savoir la voie parentérale et la voie intramammaire.

##### IV-1-2-1-Le traitement parentéral

Il est conseillé dans tous les cas de mammites qui se traduisent par des signes généraux intenses, de façon à prévenir l'apparition d'une septicémie ou d'une bactériémie et aider à lutter contre l'infection glandulaire (Radostits et al, 1997).

##### IV-1-2-2-Les infusions mammaires

Du fait de leur commodité et de leur efficacité, les infusions mammaires sont les méthodes les plus en vigueur. Des tubes à usage unique contenant les antibiotiques au sein d'une crème hydrodispersible sont les plus faciles d'emploi pour le traitement de sujets isolés ; les infusions aqueuses sont convenables car moins chères, lorsqu'un grand nombre de quartiers est à traiter. La diffusion mammaire des substances infusées est souvent limitée par le blocage des conduits lactifères et des alvéoles par des débris inflammatoires. Une vidange complète la glande avant l'infusion par une injection d'ocytocine est très conseillée dans les mammites aiguës (Radostits et al, 1997).

##### IV-1-3-Causes possibles de l'échec thérapeutique

Malgré une antibiothérapie raisonnée et appropriée, des échecs thérapeutiques ou la non guérison bactériologique ne sont pas rare (Du Pérez 2000 ; Guerin-Fauble et al, 2003).

Ainsi, d'après FAROULT (1994), Les taux de guérison bactériologique suite au traitement, pendant la lactation, des infections à *Staphylococcus aureus* sont le plus souvent inférieurs à 50% voire 40%. Concernant les infections à *Streptococcus uberis*, les taux de guérison bactériologique sont de l'ordre de 80% ces résultats ne sont pas aussi élevés avec les autres espèces de streptocoques (Serieys, 2003).

Lors d'un traitement, l'efficacité des antibiotiques administrés doit atteindre les bactéries responsables de l'infection en concentration suffisante et pendant un temps suffisant. Les échecs de l'antibiothérapie des mammites peuvent être expliqués par un ou plusieurs des phénomènes suivants (Du Preez, 2000 ; Sandholm et Louhi, 1991).

- Les antibiotiques n'atteignent pas le site de l'infection à une concentration adéquate :

- ◇ Problèmes de maintien de la concentration suffisante pendant la période de temps requise, dose trop faible, intervalle trop grand entre deux injections, durées du traitement trop courtes.

- ◇ Limites pharmacocinétiques :

- Absorption, disponibilité, élimination,

- Interactions biologiques avec les constituants du lait (protéines,  $\text{Ca}^{++}$ ),

- Obstacles à la diffusion pendant le traitement intra mammaires (œdèmes, formation d'abcès, fibrose).

- Facteurs liés aux bactéries :

- ◇ Latence bactérienne : les bactéries ne se multiplient pas ne sont pas sensibles à la plus part des antibiotiques.

- ◇ Localisation des bactéries : La localisation intracellulaire et l'invasion tissulaire de certaines bactéries (notamment *S. aureus*) peuvent constituer un obstacle à leur atteinte par les antibiotiques ;

- ◇ Résistance innée chez certaines bactéries due à la forme et à la constitution de la paroi ou l'existence d'enzymes comme les bêta-lactamases.

- ◇ Résistance acquise ou émergence de nouvelles résistances aux antibiotiques, due à l'adaptation des bactéries suite aux traitements ou résultat de mutation. Cependant, de récentes études ont montré que les germes impliqués dans les infections intra-mammaires demeurent majoritairement sensibles aux principaux antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites (Ersking, et al, 2002 ; Guerin-Fauble, et al, 2003 ; Makovec, Ruegg, 2001 ; Pengov, Ceru, 2003). PENGOV et CERU (2003) arrivent à la conclusion que l'antibiorésistance ne peut expliquer les échecs thérapeutiques des mammites dues notamment aux souches de *S.aureus* dont les infections mammaires restent les plus difficiles à guérir. De même SANDERS (1999), MARTEL ET VANDAELE (1999) affirment que les

staphylocoques de la glande mammaire sont des bactéries très peu résistantes malgré l'usage fréquent des antibiotiques intra-mammaires.

#### **IV-2-Prophylaxie des mammites**

Le contrôle des mammites dans un élevage est beaucoup mieux accompli par la prévention que par le traitement.

En général, les infections existantes persistent même lorsqu'elles sont traitées ; les efforts doivent donc se concentrer sur la réduction de nouvelles infections, la lutte contre les mammites doit donc être un effort continu qui porte ces fruits à long terme parce qu'il est pratiquement impossible d'empêcher la transmission des micro-organismes qui provoquent la maladie (Wattiaux, 1999).

##### **IV-2-1-Prophylaxie sanitaire**

Le but est de maîtriser les sources des germes, les mécanismes de transmission et les facteurs propres de l'animal, chaque point critique correspond à une ou plusieurs mesures sanitaires (brouillet, Raguét, 1990).

##### **A-L'élimination des infections existantes**

Le quartier infecté est le réservoir infectieux par excellence, le lait mammitieux peut éliminer jusqu'à  $10^6$  de germes pathogènes par ml et ainsi contaminer le milieu ambiant, litière, appareils de traite, lavettes (Weisen, 1974). Il faut donc insister sur la détection et le traitement des cas cliniques, le traitement au tarissement et la réforme des incubations (Flache, 2002).

##### **b-l'élimination des facteurs stressants**

Dans la pratique surviennent fréquemment des facteurs qui usent la mamelle, la lèsent et finalement affaiblissent sa résistance. Ces facteurs se rapportent, par ordre d'importance, aux mauvaises pratiques de la traite, la défektivité de l'équipement, à une stabulation inadéquate et au mauvais rationnement alimentaire (Remond et al, 1997 ; Duval, 1995) :

- Les mauvaises pratiques de la traite et la défektivité des équipements peuvent être corrigés de la manière suivante :
  - Laver les trayons avec une solution de lavage du pis ou faire du pré trempage.
  - Assécher les trayons complètement avec une serviette individuelle.
  - Poser la trayeuse dans les deux minutes suivant le début de la stimulation.

- Ajuster la trayeuse au besoin pour obtenir un bon positionnement.
  - Fermer le vide avant le retrait de la trayeuse.
  - Après le retrait de la trayeuse, faire du post trempage.
  - Changement régulier des manchons (Flache, 2002).
- Stabulation inadéquate : une litière abondante évite les blessures au pis, limite l'exposition au plancher froid et humide et permet de limiter le contact du pis avec le fumier (Duval, 1995).
  - Mauvais rationnement alimentaire : en effet, l'effet immunodépresseur exercé par les corps cétoniques sur les lymphocytes et les neutrophiles a été souligné par de nombreux auteurs (Smith et al, 1999). Le déficit en fibres de cellulose dans la ration, reconnu pour être un facteur prédisposant de l'acidose du rumen s'avère également favoriser l'apparition de mammites. De même pour l'excès de protéines fermentescibles par rapport à l'énergie disponible dans le rumen qui augmente le risque d'alcalose suite à la transformation de ces protéines en ammoniac et en urée. L'activité bactéricide des phagocytes, est particulièrement dépendante d'apports suffisants en vitamine E et sélénium. La carence en ces derniers perturbe le fonctionnement des cellules du système immunitaire. L'administration journalière simultanée de 50 mg de sélénium et de 100 UI de vitamine E au cours des 3 semaines précédents le vêlage réduit de 62% la fréquence des mammites (Remond et al, 1997).

#### IV-2-2-Prophylaxie médicale

- Vaccin contre les mammites à coliformes (*E. coli*) : les effets bénéfiques connus d'une vaccination stratégique sont la baisse du nombre de cas de mammite clinique et une diminution de la sévérité des signes cliniques. Certaines études cliniques contrôlées ont démontré une incidence de mammite à coliformes quatre à cinq fois inférieure chez les vaches vaccinées par rapport aux vaches non vaccinées, sans toutefois prévenir les nouvelles infections intra mammaire subclinique. Il faut par contre mentionner que 67% des mammites subclinique se sont développées en mammites cliniques au début de la lactation chez les vaches non vaccinées par rapport à seulement 20% chez les animaux vaccinés (Hogan et Smith, 2003).

- Vaccin contre les mammites à *Staphylococcus aureus* : l'injection des fragments d'ADN qui simuleront la présence des bactéries stimule le système immunitaire des vaches. Les brins d'ADN choisis correspondent à des gènes responsables de la production de protéines spécifiquement associées à la virulence de *Staphylococcus aureus* (Forget, 2005).

# Partie expérimentale

La présente étude a pour objectif la mise en évidence les principaux pathogènes responsables des mammites cliniques dans un élevage bovin de la wilaya de Blida au cours d'une période donnée pour cela nous avons opté pour :

- L'utilisation du kit (Speed mam color) comme méthode de screening pour orienter la recherche.
- La méthode microbiologique classique pour isolement et identification des germes

### **Période de l'étude :**

L'étude a eu lieu au niveau de la commune de Chiffa wilaya de Blida dans un élevage de 126 vaches dont 95 en lactation avec un âge moyen de 5ans Notre expérimental s'est étalée de janvier 2012 à juin 2012. Les analyses bactériologiques ont été réalisées au sein du laboratoire de recherche de la faculté des sciences agro-vétérinaires de l'université Saâd Dahleb Blida.

### **I-1-Matériels**

#### **I-1-1-Echantillonnage :**

Nous avons réalisé l'examen bactériologique sur 16 échantillons de lait. Le choix de ces échantillons a été fait d'une manière aléatoire à savoir quatre échantillons par passage sur l'ensemble des mammites cliniques diagnostiquées, et ceci faute de moyens pour la réalisation de notre expérimental. Le suivi dans l'élevage et le diagnostic des mammites (signes cliniques et CMT) ont été réalisés par des étudiants vétérinaires dans le cadre de leur projet de fin d'études.

Les échantillons ont été prélevés aseptiquement et acheminés au laboratoire où ils ont été stockés à -18°C jusqu'à leur analyse.

#### **I-1-2-Matériels non biologiques :**

- Milieux et réactifs pour l'analyse bactériologique classique ainsi que le nécessaire du laboratoire (voir annexe I)
- Kits Speed<sup>®</sup> mam color : Chaque trousse contient :
  - 5 étuis de mini galerie individuelle Speed; avec étiquettes adhésives.
  - 5 flacons de milieu de culture stériles,

- 1 flacon supplément staph,
- Un flacon d'huile de paraffine,
- 5 pipettes stériles,
- 5 feuilles de résultats pour l'éleveur,
- 1 protocole.



**Figure 03** : Présentation du kit Speed® mam color (photos originale).

### **I-1-3-Présentation du kit Speed® mam color :**

La mini galerie de culture (Kit Speed mam color) se présente sous forme d'une plaque percée comportant :

- 3 puits témoins.
- 14 puits destinés à l'antibiogramme, servant à mettre en évidence la sensibilité et la résistance bactérienne vis-à-vis de 14 molécules d'antibiotiques (seules ou en association).
- 7 puits destinés pour l'identification bactérienne.

#### Témoins :

- Témoin IL (Incubation Limite) : Le virage du milieu de culture du rouge au jaune indique le moment de la lecture de l'antibiogramme (à partir de 18h d'incubation).
- Témoin (-) : Le milieu ne doit pas changer de couleur (rouge).
- Témoin de culture :
  - Culture + : virage du milieu du rouge au jaune indiquant une concentration  $\geq 10^3$  UFC/ml.
  - Culture - : Pas de changement de couleur du milieu (le prélèvement est considéré comme stérile).

Identification bactérienne :

Les puits (milieu de culture) permettent l'identification de six genres de bactéries, à l'échelle famille, genre ou espèce.

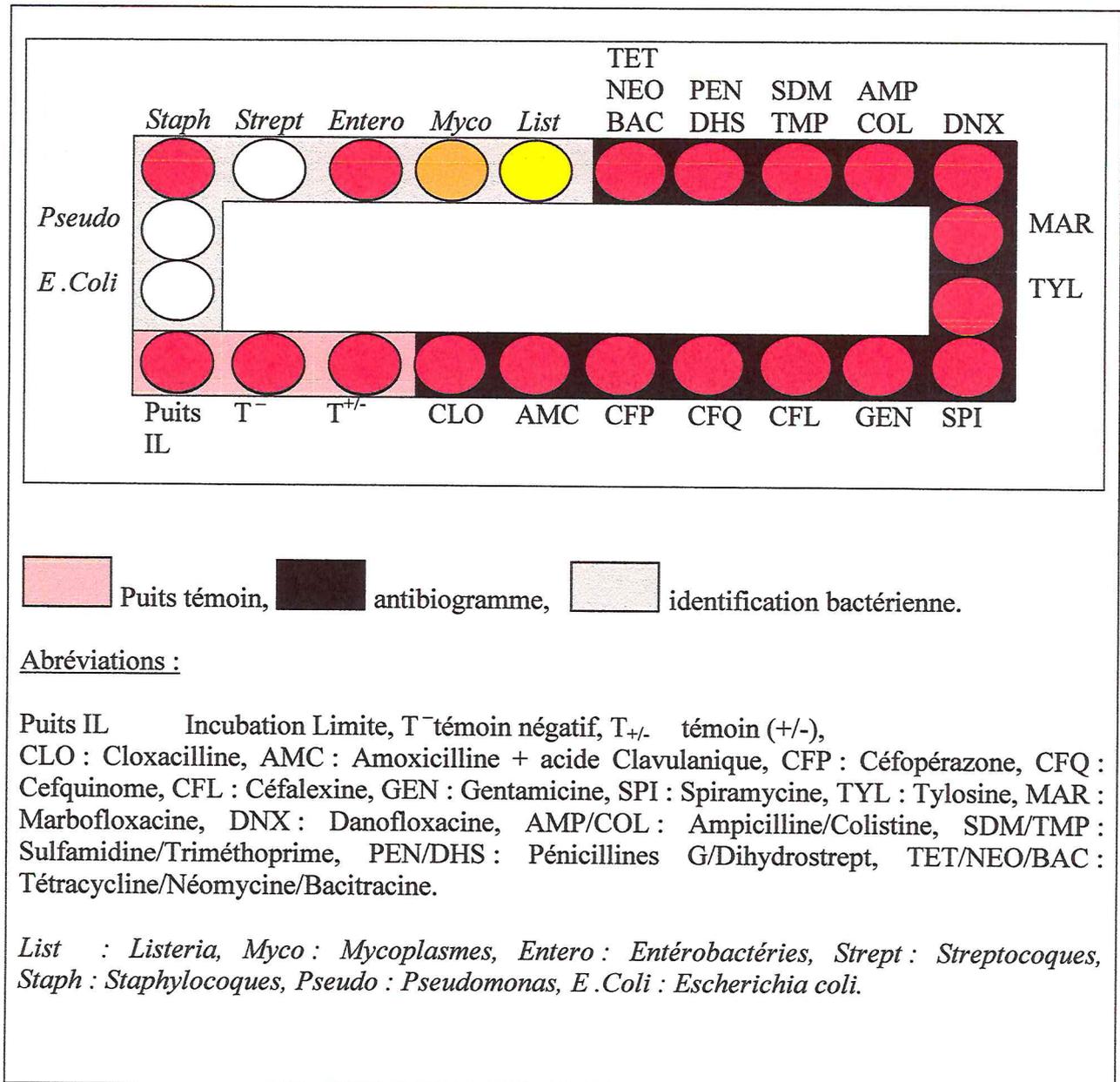
- Les entérobactéries à l'échelle Famille : 1 puit.
- *Escherichia coli* à l'échelle espèce : 1 puit.
- Les streptocoques à l'échelle genre : 1 puit.
- Les staphylocoques à l'échelle genre : 1 puit.
- Les mycoplasmes à l'échelle genre : 1 puit.
- Les *listeria* à l'échelle genre : 1 puit.
- Les *pseudomonas* à l'échelle genre : 1 puit.

Antibiogramme :

Les familles d'antibiotiques ciblées sont :

- Les pénicillines
  - Pénicillines G
  - Pénicillines A : Ampicilline, Amoxicilline
  - Pénicillines M : Cloxacilline
- Les Céphalosporines : Céfalexine, Céfopérazone, Cefquinome.
- Les Aminosides : Gentamicine, Néomycine, Dihydrostreptomycine
- Les Polypeptides : Bacitracine, Colistine
- Les Macrolides et apparentés : Spiramycine, Tylosine
- Les Tétracyclines : Tétracycline
- Les Quinolones : Marbofloxacin, Danofloxacin
- Les Sulfamides : Sulfamidine
- Les Triméthoprimes : Triméthoprime

Une représentation schématique est rapportée dans la figure ci-dessous.

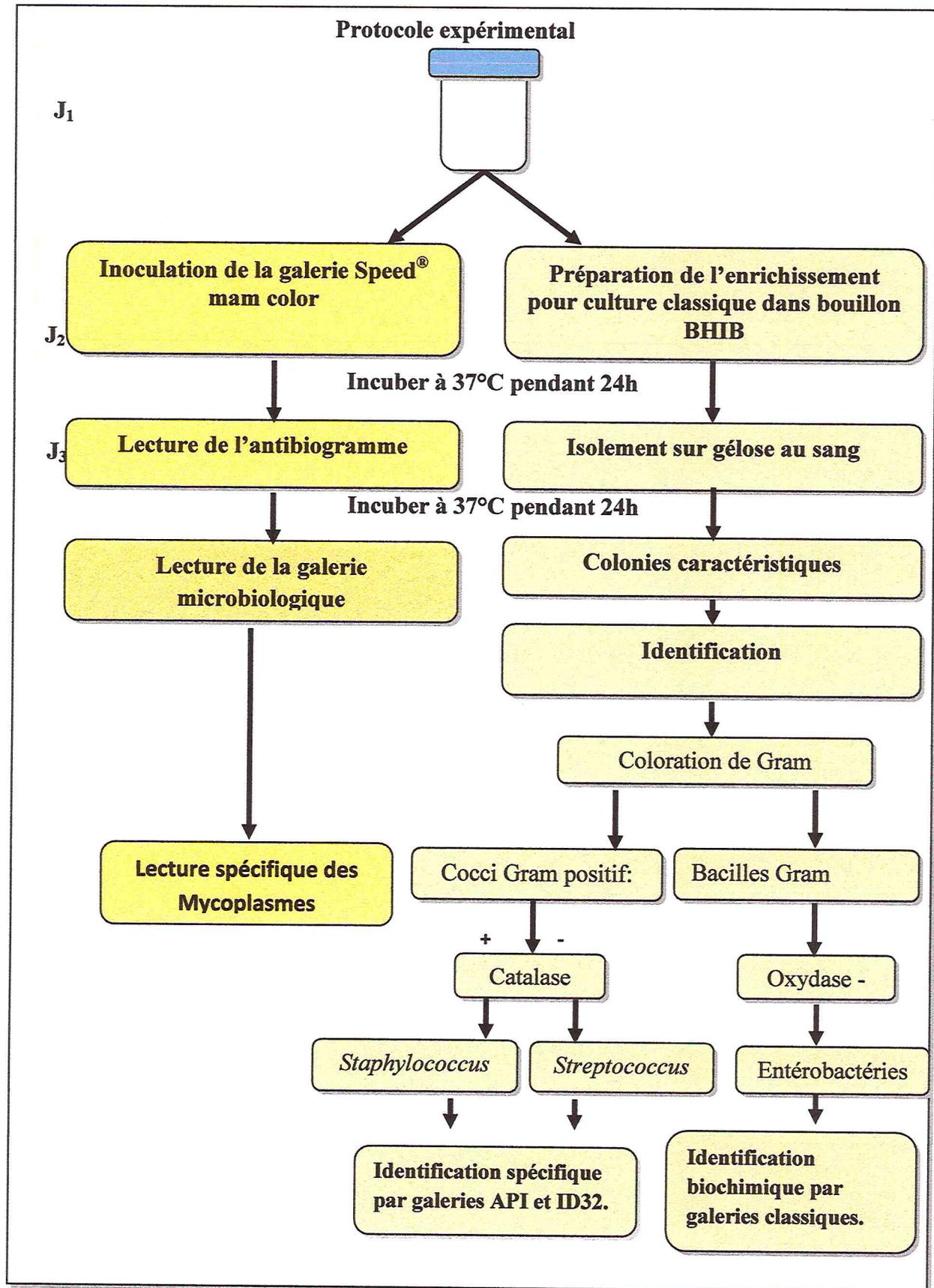


**Figure 04 :** Présentation de la galerie Speed® mam color.

**I-2- Méthodes :**

Nous avons opté pour l'utilisation du Speed color comme test de screening, pour une orientation rapide sur les germes à rechercher sur gélose par la méthode classique.

La démarche de diagnostic bactériologique adoptée est rapportée dans la figure ci-dessous.

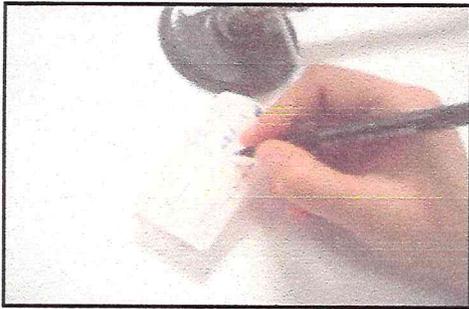


**Description de la méthode:**

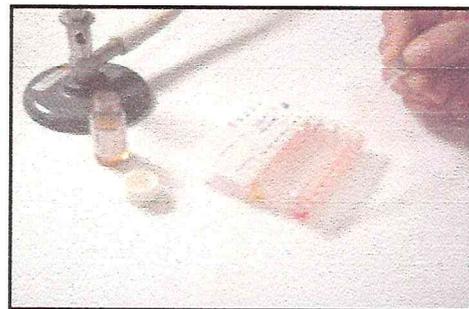
**A. Mini galerie Speed<sup>®</sup> mam color:**

**J<sub>1</sub>** : Ensemencement aseptique de la mini galerie.

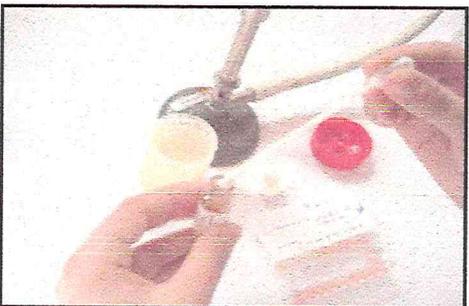
- Décongeler les prélèvements à analyser.
- Ouvrir le sachet de l'étui
- Identifier les minis galeries à utiliser.
- Déposer 3 gouttes du milieu de culture stérile fourni dans le puit témoin IL
- Déposer 3 gouttes de l'échantillon de lait homogénéisé avec la même pipette dans le flacon de milieu de culture et homogénéiser.
- Déposer 3 gouttes du milieu de culture inoculé dans chaque puit (à l'exception du témoin IL).
- Ajouter :
  - 2 gouttes du supplément (Staphylocoques) dans le puits Staphylocoques.
  - 2 gouttes d'huile de paraffine dans chaque puits, excepté les puits d' *E. Coli* et de *Pseudomonas*)
- Recouvrir la mini galerie avec l'étiquette adhésive.
- Mettre à incuber à 37°C pendant 18-24h.



**Figure 06:** Identification de la mini galerie (Photos originale).



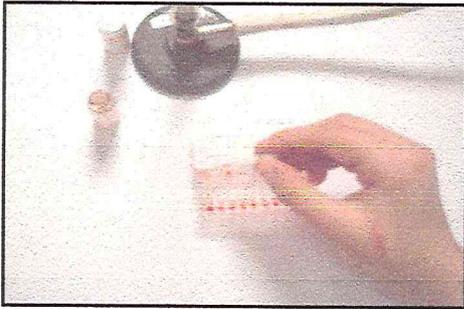
**Figure 07:** Inoculation du puits témoin IL (Photos originale).



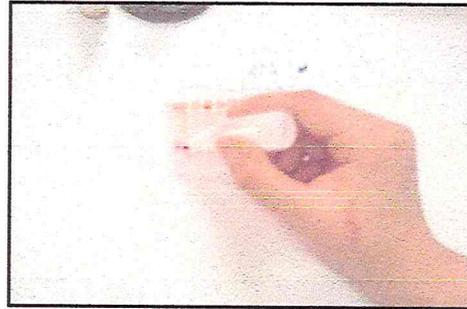
**Figure 08 :** Inoculation du milieu de culture stérile (Photos originale).



**Figure 09 :** Inoculation des autres puits (Photos originale).



**Figure 10:** L'ajout du supplément de staphylocoques. (Photos originale).

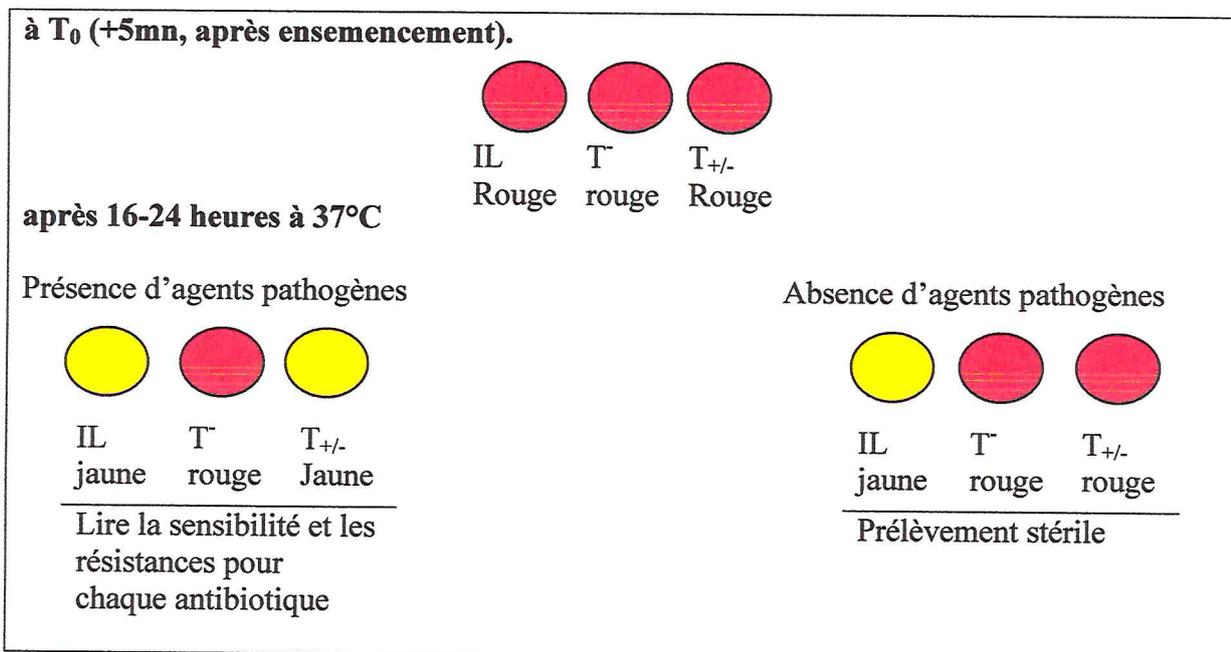


**Figure 11 :** L'ajout d'huile de Paraffine. (Photos originale).

**J<sub>2</sub> : Lecture des résultats de l'antibiogramme:**

- Lecture des puits témoins :

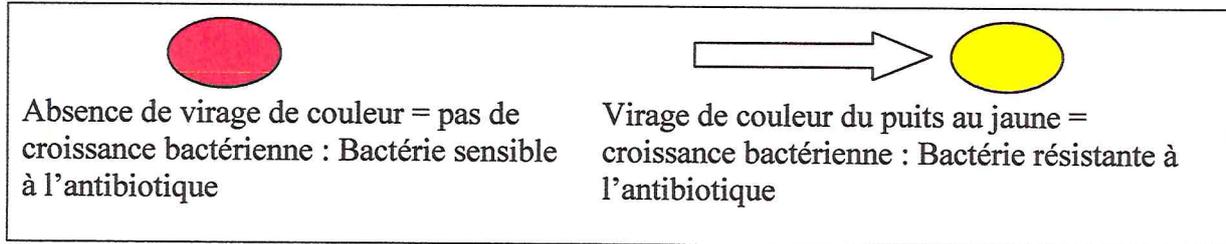
Il est recommandé de commencer la lecture des puits témoins IL (Incubation Limite) dont le virage indique le moment de la lecture de l'antibiogramme (à partir de 18h) selon la figure 16.



**Figure12 :** Lecture des puits témoins.

- Lecture de l'antibiogramme :

La lecture se fait par rapport au virage des puits du rouge au jaune, selon la figure 17. Il est à noter que pour les *Mycoplasme* et les *Pseudomonas*, il n'y a pas de profil antibiotique sur la galerie.



**Figure 13** : Lecture des puits des antibiotiques.

- Remettre à incuber la mini galerie pour 24h à 37°C.

### J<sub>3</sub> : Lecture des résultats de l'identification bactérienne :

La lecture des résultats d'identification se fait par rapport au puits témoins +/- :

- S'il ne vire pas au jaune après 18-24heures d'incubation, remettre en incubation et lire 18 à 24 heures après, beaucoup plus pour confirmer l'absence totale de germe pathogène dans le prélèvement.
- S'il vire au jaune après 18-24heures d'incubation, l'interprétation est faite comme rapportée dans la figure 18, à savoir :
  - Le virage au bleu en surface pour le puits *Escherichia coli* avec virage au jaune du puits Entérobactéries.
  - Le virage du puits Entérobactéries seul indique la présence des autres genres de la famille (*Escherichia, Klebsiella, Proteus...*).

Il est à noter que :

- Le puits *Mycoplasmes* ne peut se lire qu'au bout de 7 jours d'incubation.
- Les lectures d'association sont possibles.
- Dans de très rare cas, la présence de Streptocoques peut également entraîner le virage du puits *Listéria*.

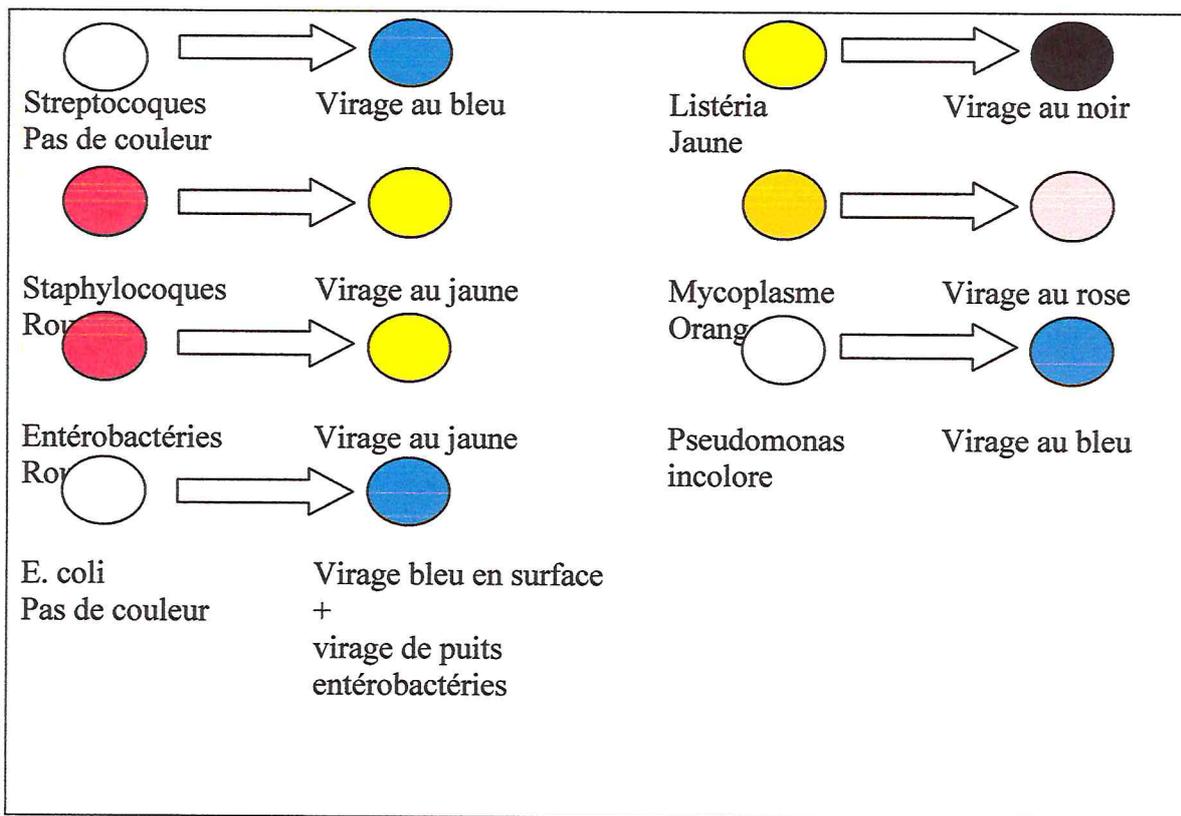


Figure 14 : Lecture des puits d'identification des germes.

### B. Protocole d'identification bactérienne au moyen des méthodes classiques pour :

- *Enterobactéries*
- Les Staphylocoques.
- Les Streptocoques.

#### J<sub>1</sub> : Préparation de l'enrichissement :

- Prélever 1ml de l'échantillon, l'introduire dans un tube de bouillon cœur-cervelle (BHIB) et incuber à 37°C pendant 24h.

#### J<sub>2</sub> : Isolement sur gélose au sang.

- à partir du bouillon d'enrichissement, faire un ensemencement sur une gélose au sang et incuber à 37°C pendant 24-48h.

J<sub>3</sub> : Identification spécifique de l'espèce *E. coli*, et des genres *Staphylococcus* et *Streptococcus* et leur repiquage pour conservation.

### I-2-1. Identification préliminaire :

Sur la base des résultats obtenus par le speed mam et l'aspect des colonies caractéristiques sur la gélose au sang des germes les plus fréquemment rencontrés (Staphylocoques, Streptocoques et Entérobactéries), nous avons pratiqué :

- Une coloration de Gram,
- La recherche de la catalase pour les genres Staphylocoques et Streptocoques,
- La recherche d'oxydase pour les bacilles Gram négatif

Les souches ainsi confirmées (mise en évidence par le Speed mam et identifiées par les méthodes classiques) sont conservées pour une identification spécifique par galeries API

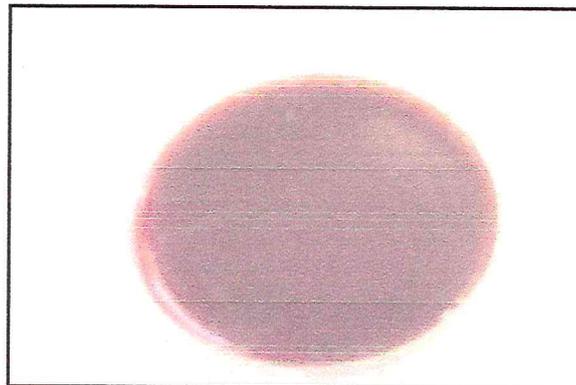


Figure 15 : Aspect de la culture sur gélose au sang (streptocoques). (Photos originale).

- **Coloration de Gram :**

Le principe : (Cf. annexe II) :

L'identification morphologique a été sur la base de l'observation au microscope optique au grossissement Gx100 comme suit :

- Genre *Staphylococcus* : Cocci Gram positif; souvent agencées en grappe de raisin.
- Genre *Streptococcus* : Cocci Gram positif; souvent agencées en chaînette
- Famille des Entérobactéries : Bacille Gram négatif.

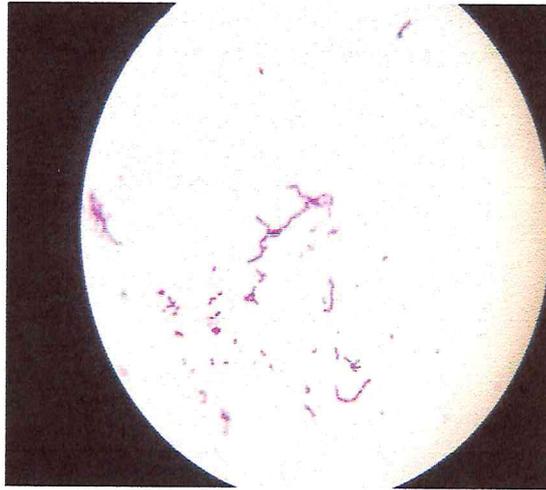


Figure 16 : observation des streptocoques (GR x 100) (photos originale).

- **Recherche de la catalase :**

Pour différencier le genre *streptococcus* et *staphylococcus*.

Sur une lame porte objet, déposer une goutte d'eau oxygénée à 10V, Emulsionner un peu de la colonie à identifier. Le dégagement de bulle de gaz indique une réaction positive, c'est-à-dire la présence de la catalase.



Figure 17 : catalase positive (Photos originale).

L'interprétation a été faite sur la base que les Staphylocoques sont catalase positive et les Streptocoques catalase négative.

- **Recherche de l'oxydase :**

A partir de la culture prendre une colonie bactérienne la déposer sur une plaque oxydase. Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet. Une absence

de coloration violette témoigne une absence d'oxydase. La famille des entérobactéries est oxydase négative, aucune coloration n'est obtenue (pas de virage au violet).

### I-2-2. Identification spécifique par galeries API :

- Préparation de la galerie : identification
- Préparation de l'inoculum et ensemencement : réalisation d'une suspension bactérienne dans de l'eau distillée selon la densité correspondante ; procéder ensuite à l'ensemencement et suivre les étapes prescrites dans la notice accompagnant les galeries utilisées à savoir : galerie classique pour entérobactéries, Api staph et Api strept,
- Incubation à 37°C pendant 24h
- Lecture de la galerie :
  - Lecture macroscopique des puits de la galerie
  - Lecture numérique à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™**



**Figure 18:** Ensemencement d'une galerie API (photo originale 2012).

**I-2-3. Identification biochimique des Entérobactéries :**

(Le principe et la technique sont rapportés en annexe II).

**Tableau II : L'identification biochimique des Entérobactéries**

<b>Caractères</b>	<b>Réactions de l'espèce</b>
Catalase	Bulles de gaz(+)
L'oxydase	Pas de couleur (-)
Gaz	Présence (+)
Glucose	Jaune, Jaune orangé (+)
Lactose	Jaune, Jaune orangé (+)
ONPG	Jaune (+)
Nitrate Réductase	Rouge(+)
Voges Proskauer (vp)	Jaune (-)
Rouge de Méthyle (RM)	Jaune (-)
Urée-Tryptophane	Orange (-)
Indole	Pas d'anneau (-)
TDA	Jaune orangé (-)
Citrate De Simmons	Bleue(+)
LDC	Violet (+)
H <sub>2</sub> S	Absence(-)

**I-3-RESULTATS :**

Nous traitons les résultats dans les tableaux ci-dessous :

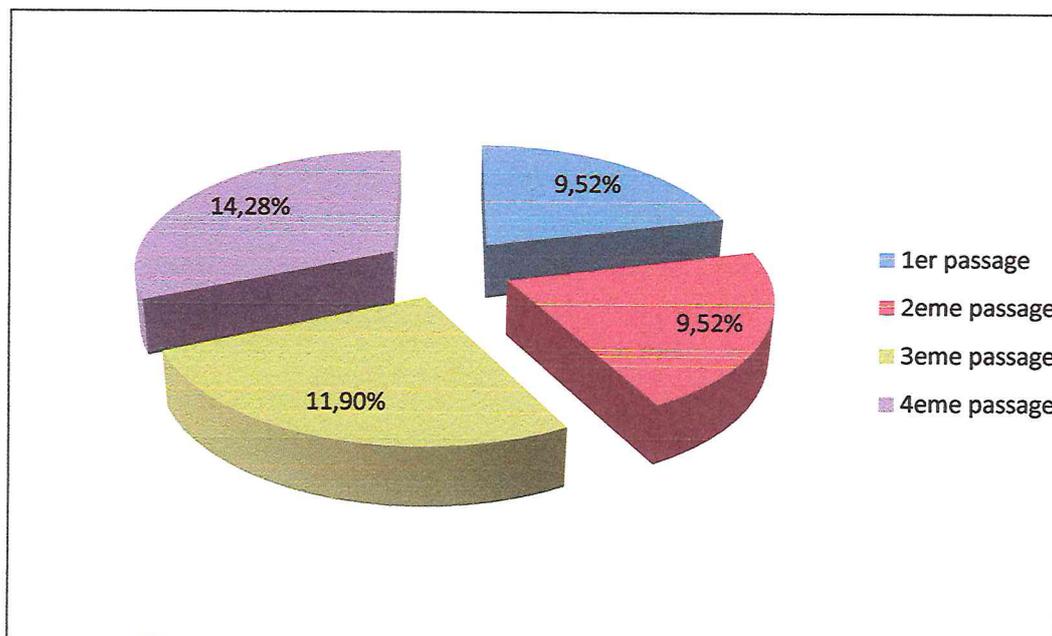
**I.3.1.Résultats du diagnostic cellulaire :**

Les résultats du diagnostic par CMT des 95 vaches en lactation au cours des différents passages sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau III** : Taux des mammites cliniques lors de chaque passage

	Date du passage	Aspect du lait anormal	CMT +++	Mammites cliniques	Pourcentage (%)
1 <sup>er</sup> passage	21/02/2012	4	11	4	9,52%
2 <sup>eme</sup> passage	20/03/2012	4	06	4	9,52%
3 <sup>eme</sup> passage	14/05/2012	5	10	5	11,90%
4 <sup>eme</sup> passage	16/06/2012	6	09	6	14,28%

Ces résultats sont représentés dans la figure suivante :

**Figure 19** : taux des mammites cliniques lors de quatre passages au sein d'un même élevage

Les résultats du CMT ont montré que lors des quatre passages les taux des mammites cliniques sont presque identiques

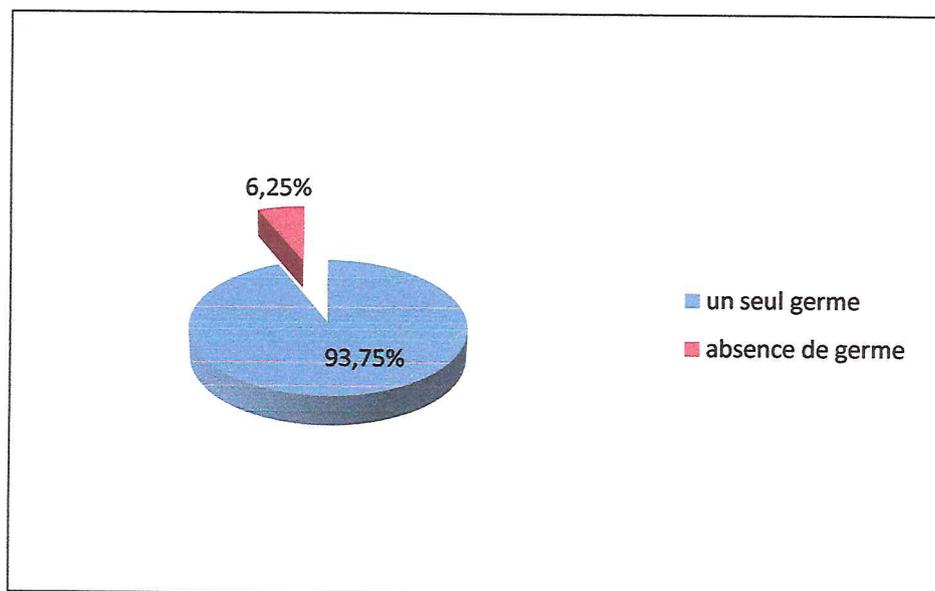
**I-3-2-Analyse bactériologique :**

Les analyses bactériologiques ont permis, à partir de 16 prélèvements de lait provenant de quartiers malades (un quartier par vache) d'obtenir :

**Tableau IV : Analyse bactériologiques**

Laits analysés	Nombre de prélèvements	Pourcentage (%)	Type de souche
Cultures positives	15	93,75	Monobactérienne
Cultures négatives	01	06,25	

Ces résultats sont présentés dans la figure suivante :

**Figure 20 : Résultats de la bactériologie.****I-3-4-Identification des souches bactériennes isolées :**

La mise en évidence des germes rares sur speed mam a révélée ce qui suit :

- Aucune culture positive pour les genres Pseudomonas, Listeria et Mycoplasme (après 7 jours d'incubation).

L'identification préliminaire des colonies caractéristiques sur gélose au sang a révélée les résultats rapportés dans le tableau IV.

A partir des 16 prélèvements, nous avons identifiés :

**Tableau V** : l'identification préliminaire des colonies caractéristiques sur gélose au sang.

Souches	Nombre	Pourcentage (%)
Genre <i>Staphylococcus</i>	4	26.67
Famille <i>Entérobactériacae</i>	1	6.67
Famille <i>Streptococacae</i>	6	40
Autre	4	26,67

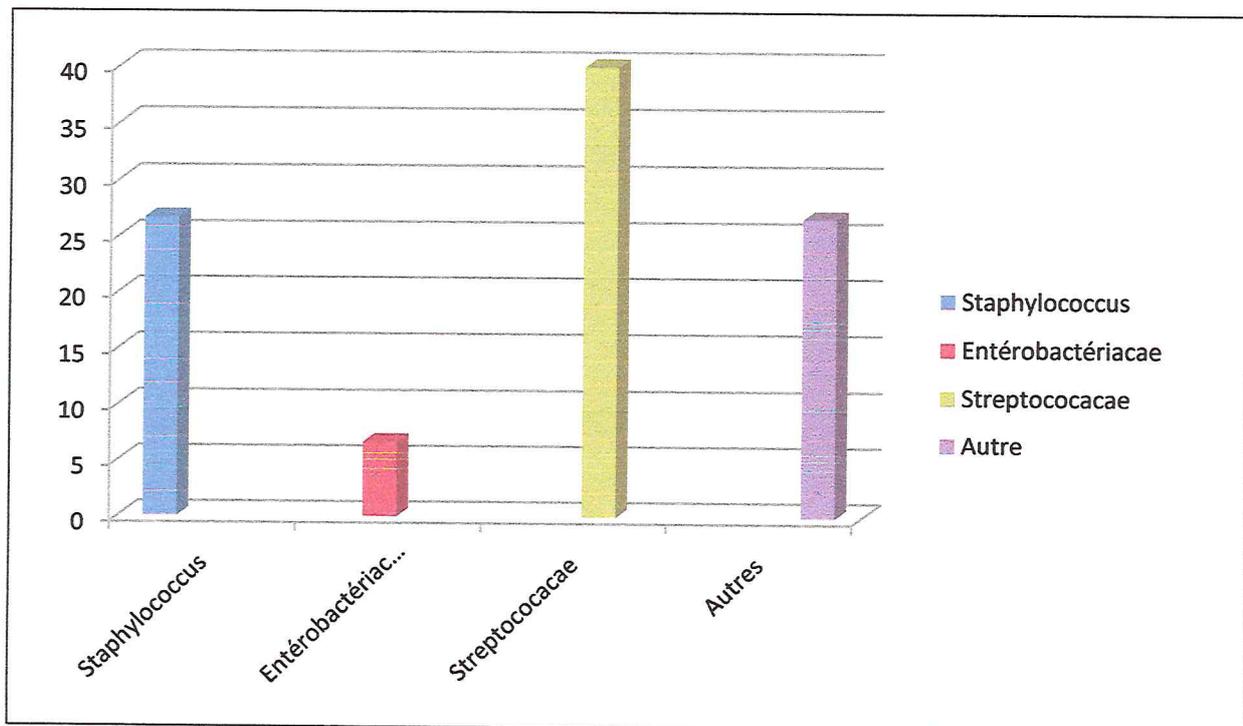
Les résultats obtenus, à partir des 15 cultures positives, ont révélés 15 souches se distribuant comme suit :

● 11 souches se distribuant comme suit :

- 06 souches appartenant a la famille des *Streptococacae*, soit 40%
- 04 souches appartenant au genre *Staphylococcus*, soit 26,67%
- 01 souche appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, soit 6,67%

● 04 autres, soit 26,67%

Ces résultats sont représentés dans la figure suivante :



**Figure 21** : représentation graphique des résultats de l'identification globale.

Les résultats de l'identification spécifique, par galerie API pour les staphylocoques et les streptocoques et galerie classique pour les entérobactéries, des 15 Souches isolées dans les cas de mammites sont rapportés dans le tableau.

**Tableau VI :** Les différentes espèces isolées d'un lait de vache présentant une mammite clinique.

Genres et familles	Souches	Nombre	Pourcentage (%)
Genre <i>Staphylococcus</i>	<i>S. lentus</i>	1	6.67
	<i>S. xylosus</i>	2	13.33
	<i>S. sciuri</i>	1	6.67
Famille <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia entero</i>	1	6.67
Famille <i>Streptococcaceae</i>	<i>Str. Agalactiae</i>	1	6.67
	<i>Enterococcus faecium</i>	2	13.33
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	6.67
	<i>Enterococcus durans</i>	2	13.33
Autres	<i>Pasteurella pneumotiofica</i>	1	6,67
	<i>Pasteurella spp.</i>	1	6,67
	<i>Cryseobacterium indofogéns</i>	1	6,67
	Bacille G <sup>+</sup> non sporulé	1	6,67

L'identification globale (Speed mam, préliminaire et spécifique) des 15 souches isolées à partir des 15 cultures positives, rapportée dans le tableau VI et représentée graphiquement dans la figure 24.

Le traitement des résultats fait ressortir que :

- Les Streptocoques au taux de 40% :
  - Les Enterocoques représenté par *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus durans* avec 13,33%, 6,67% et 13,33% respectivement) avec un taux de 33,33%.
  - Les autres Streptocoques au taux de 6,67% représentés par *Str. Agalactiae*.

- Les Staphylocoques à coagulase négative (*S. xylosus*, *S. lentus*, *S. sciuri* avec 13,33%, 6,67% et 6,67% respectivement) ont été isolés avec un taux de 26,67%.
- Les Enterobactéries au taux de 6,67% représentés par *Serratia odorifera*.
- Autres au taux de 26,67% représenté par *pasteurella pneumotiofica*, *pasteurella Spp*, *cryseobacterium indofogéns*, *bacille G<sup>+</sup> non sporulé*.

Une représentation graphique des résultats de l'identification globale est rapportée par la figure : 25.

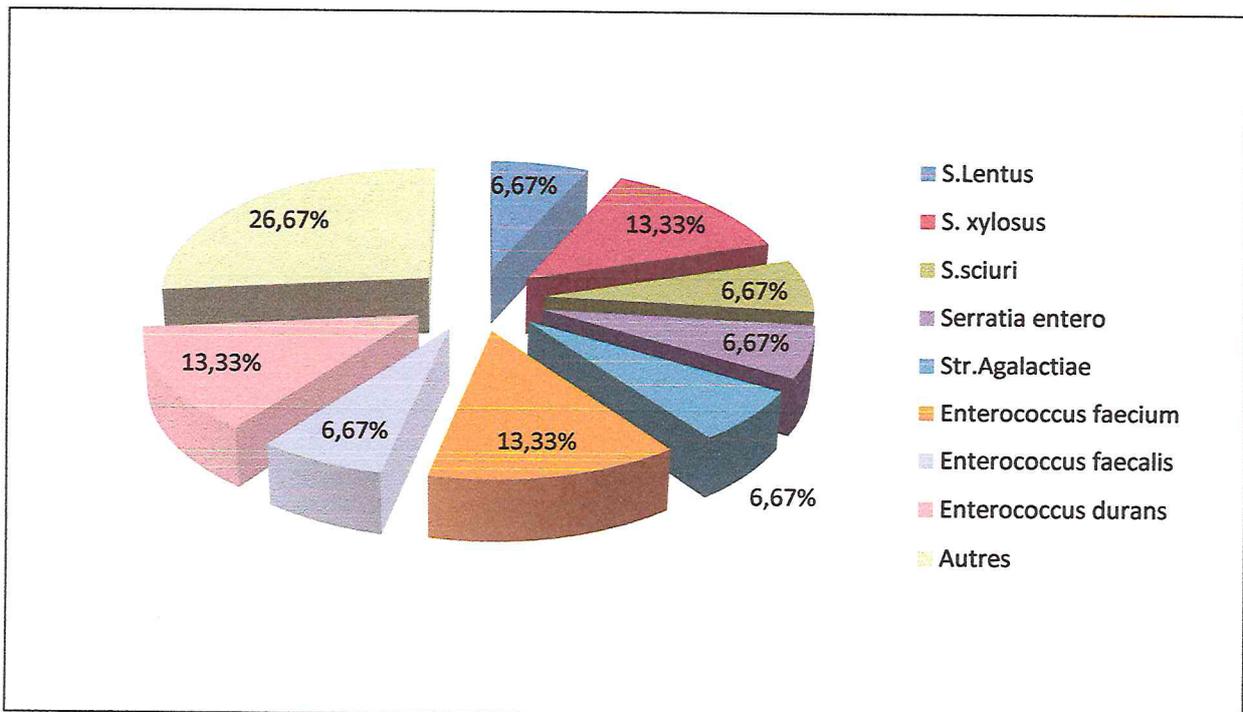


Figure 22 : Représentation graphique des résultats de l'identification bactérienne.

#### I-4-DISCUSSION :

Les résultats du diagnostic par CMT montrent des taux rapprochés de mammite clinique lors des quatre passages effectués sur 42 vaches en lactation.

Les analyses bactériologiques des 16 prélèvements effectués lors des quatre visites au sein d'un même élevage sur les vaches atteintes de mammite clinique ont montré différentes espèces.

Parmi les 16 prélèvements on a isolé 15 cultures positives, c'est le genre *Streptococcus* qui est le plus représenté avec une proportion de 40%, suivi du genre *Staphylococcus* avec une proportion de 26,67%, et en 3<sup>ème</sup> position les Entérobactéries avec une proportion de 06,66% et les autres germes avec une proportion de 26,67 et une culture négative avec une proportion de 6,25% .

Les cultures négatives :

Dans notre étude nous avons constaté une proportion de 6,25% de prélèvements négatifs, proportion proche des études de (Bidaud et al, 2007), (Argent et al, 1997), (Lurthu et al, 2006) et (Coulon et al,2002) qui sont respectivement : 8%, 8,59%, 10% et 11,76% et supérieur à ceux reportés par (Bennaceur et Benameur 2007) qui est de 1,96%.

Dans le cas des mammites cliniques ou les signes sont présents mais le prélèvement sont stériles, l'absence des germes peut s'expliquer selon les hypothèses suivantes :

- La présence des antibiotiques ou des résidus qui inhibent la croissance des germes.
- La mammite peut être d'origine virale, mycosique, ou traumatique.
- Le milieu de culture peut être inapproprié pour certaines espèces bactériennes aux exigences de cultures particulières.
- Les cas d'E. Coli et Actinomyces pyogènes qui résistent mal à la congélation des prélèvements (Schukken et al, 1989).
- On peut aussi envisager le cas d'une mammite infectieuse pour laquelle le lait est réellement sans germes au moment du prélèvement car le germe a été éliminé naturellement. Ceci est décrit dans le cas de mammites aiguës à entérobactéries, les bactéries produisent des endotoxines responsables des symptômes qui ne sont libérées qu'après la lyse des corps bactériens. Ainsi au moment où la mammite s'exprime cliniquement, la plupart des bactéries responsables sont déjà détruites (Eberhart et al. 1979).

Les cultures positives :

On note l'absence des cultures contaminées (cultures mixtes ou au minimum trois espèces bactériennes sont isolées) est expliqué par la bonne maîtrise de la pratique des prélèvements (Noirettere, 2006), (Fabre et al, 1997), (Sargeant et al, 1998), (Bouaziz, 2001), (Manner, 2001) (Flache, 2002), (Beroual, 2003) (Argente et al, 2005) et (Ericsson et al, 2009).

Le taux de cultures positives est de 93,75% représenté par :

- **Les streptocoques** : représente 40% des prélèvements.

Les différentes espèces :

*Enterococcus faecium* 13,33%, *Enterococcus durans* 13,33%, *Streptococcus agalactiae* 6,67%, *Enterococcus faecalis* 6,67%.

Avant tout on note dans notre étude l'isolement de *Streptococcus agalactiae* qui a disparu pendant longtemps en Europe, son absence est due à son éradication des élevages depuis une vingtaine d'années suite l'emploi systématique d'un traitement d'antibiotique au tarissement selon (Noirettere., 2006) et l'arrêt de la traite manuelle selon (Myllys et al, 1994) car les mains du trayeur, vecteur principal du germe ne sont plus au contact prolongé avec la mamelle.

Contrairement à notre étude ce germe n'a pas été isolé dans l'étude de Hezil (2010), et isolé avec un taux de 1,61% dans d'étude de Bennaceur, Benameur (2007).

C'est un germe pathogène majeur responsable des mammites subcliniques, mais provoque rarement les mammites aiguës, qui vit uniquement dans le pis de la vache.

Aucune souche de *Streptococcus dysgalactiae*, n'a été isolée dans la présente étude, contrairement aux études de Hezil (2010), Bennaceur et benameur (2007), avec des proportions de 3,70 et 8,06%.

Cette absence est souvent associée avec la mise en place des mesures de pré trempage des trayons lors de la préparation de la mamelle à la traite ainsi qu'au post-trempage des trayons en fin de traite.

Les Entérocoques : (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, et *Enterococcus durans*), se sont des pathogènes majeurs de l'environnement responsables de mammites cliniques. Généralement issus du tube digestifs de l'animal, ils ont pour réservoir primaire la litière ou ils vont se développer et persister sous l'influence de différents facteurs (conception ambiance et entretien de l'habitat) (Hanzen, 2008).

Notre étude à révélé la présence d'*E.facium* (13,33%) qui est lié au manque d'hygiène globale des élevages, particulièrement, celui de la litière qui constitue son réservoir primaire. Des taux respectifs de 1,20 à 19,1% ont été rapportés par (Pitkala et al, 2004) et (Maricato et al, 2005).

L'épidémiologie des infections mammaires dues aux *Enterococcus* sp est relativement indéfinie car le contrôle des mammites causées par ces germes tend à ne pas être pris en compte (Petersson-wolfe et al, 2008).

### **Les staphylocoques :**

La proportion des staphylocoques à coagulase négatives (SCN) est de 26,67%. Elle d'insère dans l'intervalle 41,76% et 11%, rapporté respectivement dans les études (Beroual, 2003), (Noireterre, 2006), (Flache, 2002), (Bennaceur et al,2007), (Hagnestam et al,2007),(Mekonnen et al,2005),(Bidaud et al, 2007) et (Bradley et al,2007). En effet, les SCN dits pathogènes mineurs contagieux ne sont normalement qu'exceptionnellement responsables de mammites cliniques mais plutôt responsables d'infections sub-cliniques (Ben Hassen, et al, 2003), longtemps considéré comme pathogènes mineurs comme décrit dans cette classification traditionnelle, ils sont devenus des pathogènes majeurs responsables de mammites cliniques et chroniques (Taponen et al, 2006), avec de forte inflammation de quartier ainsi que des mammites sub-cliniques, se sont des germes de la flore cutanée normale, la source d'infection et en général un défaut d'hygiène au moment de la traite, où ils colonisent le canal du trayon à la faveur d'une blessure (Van de Leemput, 2007) . Dans la présente étude les souches isolées sont : *S. xylosum*, *S. lentus*, et *S. scuri*, qui s'insèrent dans la gamme des espèces les plus fréquemment isolés.

On note l'absence des staphylocoques à coagulase positive (SCP) qui sont des germes pathogènes majeurs, cette absence peut être probablement due aux nombres de prélèvements effectués.

### **Les Entérobactéries :**

Avec une proportion de 6,67%, représenté par l'espèce *Serratia enterococcus*.

Une remarque très importante mérite d'être soulever : l'absence d'*Escherichia coli* et *Streptococcus uberis* considérés comme germes impliqués dans les mammites d'environnement. Selon les études de Noireterre (2006) et Argente (2005) sur les mammites cliniques ont montré la dominance des mammites d'environnement avec des taux de 23% , 22% et 12,34% respectivement pour *E.coli* et 31%,40% et 6,17% respectivement pour *Stp.uberis*, cette absence peut être dû aux guérisons spontanées fréquentes et aux effets de la congélation qui a fait baisser la prévalence d'*E.coli*, selon les prélèvements effectués par (Achache ,1988), (Berg, 2001), (Henry ,2001) et (Hezil ,2010).

# Annexe

## **Annexe I :**

Milieux et réactifs utilisés ainsi que le nécessaire du laboratoire

### **A. Matériels biologiques**

- Laits mammites
- Sang du mouton
- Plasma de lapin

### **B. Matériels non biologiques et réactifs**

- ✓ Kit Speed Mam Color
- ✓ Les milieux de cultures
  - Géloses nutritives
  - Gélose Chapman
- ✓ Bouillon de nitrate réductase
- ✓ Les milieux de Moeller des acides aminés
- ✓ Urée-tryptophane (ou urée indole)
- ✓ Milieu Clark et Lubs
- ✓ Citrate de Simmons
- ✓ Violet de Gentiane
- ✓ Lugol
- ✓ L'alcool
- ✓ Fuschine
- ✓ Eau distillée
- ✓ Eau oxygénée
- ✓ Les milieux T.S.I
- ✓ Les disques «OX»
- ✓ Les disques ONPG
- ✓ Réactif NIT (l'acide parasulfanilique en milieu acétique)
- ✓ Réactif NIT2 (alpha-naphtylamine en milieu acétique)
- ✓ Réactif VP1 (KOH ou de NaOH)
- ✓ Réactif VP2 (alpha-naphtol)
- ✓ Réactif de RM (rouge de méthyle)
- ✓ Microscope optique
- ✓ Verrerie de laboratoire
- ✓ Micropipette

- ✓ Etuve thermostatée
- ✓ Bec bunsen

## **Annexe II :**

### **Techniques et principes des tests d'identification**

#### **1. Principe de coloration de Gram :**

C'est la coloration la plus importante dans le laboratoire de biologie de bactériologie. Elle est mise au point en 1884, s'effectue en trois temps.

Dans un premier temps, les bactéries sont colorées en violet par un colorant basique tel que le violet de Gentiane puis par une solution de lugol (mordançage). Les bactéries peuvent être divisées en micro-organismes de Gram positifs et en micro-organismes de Gram négatifs.

Les bactéries de Gram positif retiennent la coloration violette du violet de Gentiane (ou du cristal violet) et auront une teinte violette au microscope.

Les bactéries de Gram négatif peuvent être décolorées, leur enlevant ainsi la coloration du violet de Gentiane avec une solution d'alcool-acétone.

Les bactéries sont ensuite colorées en rouges avec la Fushine. Parce que la coloration de Gram est très importante, elle doit être accomplie avec le plus grand soin.

#### **Matériels et réactifs utilisés :**

Microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100

Huile d'immersion

Coffret de colorant de Gram contenant :

- Violet de Gentiane
- Solution du lugol
- Solution de décolorant alcool acétone
- Fushine basique.

Lame porte-objet

Papier buvard

Flacon d'eau distillée Bac de coloration

### **Procédures de coloration :**

On utilise une lame propre, et on l'identifie

On étale l'échantillon en un frottis mince sur la lame pour la faire sécher

Lorsque la lame est complètement séchée,

On recouvre le frottis de la lame avec le violet de Gentiane pendant 30 à 40 secondes

On verse le surplus de la solution de violet de Gentiane et on rince la lame avec un jet d'eau faible.

On égoutte l'excès d'eau.

On recouvre la lame avec la solution, lugol pendant 30 à 40 secondes.

On verse la solution de lugol de la lame et on rince avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau.

On recouvre le frottis avec la solution de Fushine pendant 60s (2fois plus longtemps que les autres étapes).

On verse la fushine, on rince la lame avec du papier buvard.

### **Interprétation de la coloration de Gram :**

La clé de l'interprétation de la coloration de Gram est d'identifier la morphologie des micro-organismes (exp. Cocci, bacilles) ainsi que leur relation les un par rapport aux autres (exp. Cellules isolées, en paire, en chainettes et en grappes).

La reconnaissance de ces caractéristiques peut aider à l'interprétation de la coloration de gram

## **2. La catalase :**

La catalase est une enzyme présente chez la plupart de bactéries aérobies strictes et aussi anaérobies facultatives

Sa recherche permet de différencier des genres bactériens

Exemple : Micrococcus, Kocuria et Staphylocoques sont catalase +

Streptococcus, Lactococcus et Enterococcus sont catalase -

### **Principe**

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes. La catalase est une enzyme qui catalyse :

-----  
La plupart des micro-organismes aérobies possèdent une catalase, en particulier les bacilles Gram négatifs aérobies. Son absence est donc un critère d'identification intéressant. Par exemple, parmi les coques Gram + aérobies, seuls les Streptococcaceae sont catalase négative. Lactobacillus et

erysipelothrix sont les seuls groupes de bacilles Gram + aérobies non sporulés dépourvus de catalase.

### Technique

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes,
- A l'aide d'une pipette pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien
- Observer immédiatement.
- Observer immédiatement.

### Lecture

- Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : **catalase +**
- Pas de bulles : **catalase -**

## 3. La coagulase libre :

### Principe

La coagulase libre est une enzyme qui permet de catalyser la transformation du fibrinogène (soluble) en fibrine (insoluble).

Il suffit pour cela d'utiliser du plasma du lapin.

La formation d'un coagulum attestera de la présence d'une coagulase libre.

Le plasma contrairement au sérum contient du fibrinogène.

Le fibrinogène soluble .quand il est scindé, lors du processus de coagulation, polymérise pour former la fibrine insoluble. Ces fibres de fibrine permettant d'emprisonner les globules rouges. Le coagulum ainsi formé joue le rôle de bouchon permettant aux mammifères de ne pas perdre leur sang.

S.aureus produit une exoenzyme la coagulase libre. Cette enzyme est capable de réaliser cette transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble.

### Technique

Dans un tube à hémolyse stérile :

- Verser 0.5 ml de bouillon Cœur-Cerveilleensemencé et incubé 24h à 37°C
- Verser 0.5 ml de plasma oxalaté.
- Homogénéiser et incubé de 6 à 24h à 37°C

### Lecture

Coagulum parfait coagulase +

Dès qu'il y a une coagulation le test se considère comme positif

Le mélange reste liquide coagulase -

- Si le plasma est coagulé (pas d'écoulement) le fibrinogène a été transformé en fibrine : Staphylococcus aureus.
- Si le plasma n'est pas coagulé, espèce autre que Staphylococcus aureus. Poursuivre avec d'autres tests biochimiques tels que la catalase, l'indole ou faire une indentification.

#### 4 . Le milieu T.S.I (TRIPLE SUGAR TRON) :

Milieu décrit par Hajna pour l'identification rapide des entérobactéries.

Il permet de mettre en évidence l'attaque du glucose, du lactose, du saccharose, la production de gaz et la production d'H<sub>2</sub>S

Le test est surtout utilisé pour différencier entre les différents groupes genres et espèces des Enterobacteriaceae.

Le but de ce test est de mettre en évidence cinq caractères :

- La fermentation du glucose,
- La fermentation du saccharose
- La fermentation du lactose
- La production de gaz
- La production de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) à partir du thiosulfate dans un environnement acide

#### Principe

Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH)

Pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose , la concentration de ce sucre a été abaissée au 1 /10 Emme de celle du lactose ou du saccharose , de telle façon que la faible quantité d'acide produite sur la pente pendant la fermentation s'oxyde rapidement ,ce qui entraine un retour rapide à la coloration rouge ou bien à une ré alcalinisation plus prononcée . Par contre, la réaction acide (couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot du tube.

- Les germes qui fermentent le lactose ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube.
- Les microorganismes ne fermentant aucun des trois sucres ne modifient pas la couleur du milieu.
- La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.

- La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

#### La technique :

- Ensemencer le culot par piqure centrale et la surface inclinée par des stries serrées
- Incuber à 37°C pendant 24 heures (capsules desserrées) de manière à favoriser les échanges gazeux.

#### La lecture :

- Culot rouge : glucose non fermenté
- Culot jaune : glucose fermenté
- Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés
- Pente inclinée jaune : lactose et /ou saccharose fermenté(s)
- Formation de gaz traduit par la présence de poche gazeuse décollant le culot.
- Formation d'H<sub>2</sub>S traduit par une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqure

#### Lecture :

- **L'attaque de l'un des sucres** contenus dans le milieu se traduit par une acidification, donc un virage au jaune du rouge de phénol.
- **La production du gaz**, se traduit par l'apparition de bulles dans le culot.
- **La production d'H<sub>2</sub>S**, se traduit par un précipité noir.

### 5. L'Oxydase

Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes porteurs de coenzymes hémiques.

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employées pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette recherche consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacé.

L'activité oxydasique ainsi déterminée est difficile à attribuer à tel ou tel élément de la chaîne respiratoire bien qu'une correspondance avec un cytochrome c soit avancée par plusieurs auteurs. Pour un certain nombre de bactéries oxydase négative, possédant donc une chaîne respiratoire complète et fonctionnelle comme les micro-organismes aérobies comme les entérobactéries, le cytochrome c est remplacé par un autre cytochrome oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène (ou un autre oxydant minéral) .

Le terme d'oxydase est, d'autre part, réservé aux enzymes utilisant l'oxygène comme substrat.

... En bactériologie, il faut donc comprendre le terme d'oxygène comme enzyme réagissant avec un dérivé du paraphénylène

### Principe

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : **la phénylène diamine oxydase** des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : **le n diméthyl paraphénylène diamine**

Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air.

Réactif incolore ----- phénylène diamine oxydase -----> composé rosé

### **Causes d'erreurs :**

Oxydase faussement positive :

- si utilisation d'une oëse métallique
- si l'inoculum provient d'un milieu coloré
- si l'inoculum provient d'une culture sur gélose au sang
- si lecture tardive

Oxydase faussement négative :

- si l'inoculum est trop faible
- si la réaction est lente

### La technique :

- ajouter quelques gouttes de la suspension bactérienne préparée à un ml environ d'eau physiologique dans un tube à hémolyse
- ajouter un disque << OX >> imprégné d'un réactif l'oxalate de diméthyl paraphénylène diamine

### **La lecture :**

Apparition de la couleur rose violette après 30 à 60 seconde et persiste pendant 15 minutes environ si la bactérie possède une oxydase (test oxydase positif) la coloration n'est pas modifiée dans le cas contraire.

## **6. Nitrate réductase :**

En absence d'oxydase, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne.

### **Principe :**

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme : la nitrate- réductase par la bactérie. Cette étude va donc consister à mettre en évidence le métabolisme nitrite ou la disparition des nitrites initiaux.

Certaines bactéries (entérobactéries, pseudomonas) ont la capacité de réduire les nitrates en nitrite, puis par fois en diazote (N<sub>2</sub>) elles peuvent :

Soit seulement assimiler le nitrite c'est une action assimilatrice sous la dépendance d'une nitratase ;

Soit les assimiler et les respirer

### 1<sup>er</sup> cas présence de nitrites

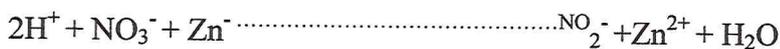
L'apparition d'une coloration rouge Franche immédiate en présence d'acide sulfanilique et de naphthylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de GRIESS., le test nitrate réductase +

### 2<sup>ème</sup> cas l'absence de nitrite,

Le milieu reste incolore rechercher la disparition des nitrates par addition d'une pincé de zinc pur en poudre (épreuve de Zo-Bell)

Bien mélanger et laisser reposer en observant :

\* Si une teinture rouge apparait, les nitrates n'ont pas été réduits par la bactérie mais le Zinc



### Test nitrate réductase -,

\* Si le milieu reste incolore, les nitrates ont été complètement réduits au-delà du stade nitrite la présence de bulles gazeux dans la culture témoigne de la réduction des nitrates en azote gazeux le test nitrate réductase+.

### La technique :

-cultiver la bactérie dans un bouillon nitraté.

-incuber à 37°C jusqu'à l'obtention d'une culture abondante.

-ajouter une ou deux gouttes d'acide parasulfanilique en milieu acétique (réactif NIT2). Mélanger, observer.

### La lecture :

•Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède un nitrate réductase. Résultat NR+

• le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que le nitrate réductase vis-à-vis des nitrites.

• Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. Résultat NR-

•pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR+

## 7. Test ONPG (orthonitrophényl-beta-D-galactopyranoside) :

### Principe :

La B gal peut être mise en évidence facilement car elle est capable d'hydrolyser toute molécule analogue du lactose.

En laboratoire, on utilise l'ONPG ou Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside.

L'hydrolyse de l'ONPG libère de l'ortho-nitro-phénol qui présente une coloration jaune très stable.

La réaction utilisant l'ONPG n'est pas parfaite ; des bactéries possèdent une activité ONPG-hydrolase tout en étant incapables d'hydrolyser le lactose ; elles sont ONPG<sup>+</sup> et lactase<sup>-</sup>. On peut penser qu'elles possèdent une enzyme qui reconnaît le substrat est donc préférable au terme de B galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En résumé :

ONPG hydrolase<sup>-</sup> = B galactosidase<sup>-</sup> en général

ONPG hydrolase<sup>+</sup> = lactase<sup>-</sup> ou lactase<sup>+</sup>

### La technique :

- réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée .

-incuber à 37°C, pendant 24h

### La lecture :

Apparition d'une coloration jaune : bactérie ONPG positive.

Absence de coloration, bactérie ONPG négative.

## 8. test Décarboxylase ODC, LDC, ADC ... et des dihydrolase ADH bactériennes Test LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase) et ADH (argininedihydrolase)

### Composition :

Les milieux utilisés (milieu de moeller) ne contiennent qu'un seul acide aminé (lysine, ornithine ou arginine), du glucose, des extraits de levure, du chlorure de sodium et un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol). (Zone de virage du violet au jaune entre pH (5,4 et 7)

### Principe :

La recherche de ces enzymes n'est effectuée que pour des bactéries à métabolisme fermentatif. Dans un premier temps, les bactéries fermentent le glucose et les milieux s'acidifient (virage au jaune du pourpre de bromocrésol). A pH acide, la synthèse des décarboxylases est favorisée et ces enzymes présentent une activité maximale. Dans un second temps, la production éventuelle d'une décarboxylase conduit à la formation de composés alcalins et à l'alcalinisation du milieu ce qui provoque le virage au rouge du ouge phénol

-une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu, et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune.

-une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante, et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu. Le milieu restera violet.

#### **La technique :**

-verser le milieu de Moeller dans un tube à hémolyse stérile.

-Ensemencer chacun des trois tubes avec une goutte de suspension bactérienne.

-Réaliser une anaérobiose en recouvrant la surface du milieu d'huile de paraffine.

-Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

La lecture :

Apparition d'une coloration jaune (acidification du milieu) : réaction négative.

Apparition d'une coloration violette (alcalinisation du milieu) : réaction positive

#### **9. milieu Urée- tryptophane(ou urée-indole) :**

Trois activités enzymatiques peuvent être recherchées à partir de ce milieu

•L'uréase, enzyme hydrolysant l'urée, activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation.

•Le tryptophane désaminase (TDA), après addition de chlorure de fer<sup>3+</sup>. Le fer ferrique forme un complexe avec le produit de l'activité de la TDA, l'acide indole-pyruvique, complexe décelable par la formation d'un précipité marron

•La tryptophanase, après addition du réactif de Kovacs. Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge.

La formule en g/L d'eau :

L-tryptophane	3g
Urée	20g
Hydrogénophosphate de potassium	1g
Dihydrogénophosphate de potassium	1g
NaCl	5g
Alcool à 95 °	10mL
Rouge de phénol	25mg
Eau distillé (qsp)	1L

Résultats :

•Uréase :

-la coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée : Uréase+

- La coloration orange ou jaune montre l'absence d'hydrolyse de l'urée : Uréase-

•**Tryptophane désaminase (TDA) :**

Ajouter le réactif chlorure de Fer III dans un aliquote du milieu Urée Tryptophane ensemencé et incubé. en présence d'acide indole-pyruvique il y a formation d'un complexe acide indole pyruvique/ Fer III qui précipite. La lecture est immédiate.

-Absence de précipité : TDA-

•**Tryptophanase :**

Le réactif utilisé pour détecter l'activité de la tryptophanase est le réactif de Kovacs, dont la composition est la suivante :

Diméthyl-amino-4-benzaldéhyde	50g
Acide chlorhydrique pur	250mL
Pentanol-1(qsp)	1000mL

**Ce réactif est toxique. Manipuler avec précaution.**

**La technique :**

Réaliser une suspension bactérienne dans le milieu Urée-tryptophane et incuber 24h à 37°C

**10. Réaction de Voges-Proskauer et la Réaction de rouge méthyle :**

**La technique :**

-a partir de la suspension préparé, ensemencer un tube de milieu Clark et Lubs

-l'incuber 24h à 37°C

-diviser le volume en deux parties dont l'une est réservée pour le test VP et l'autre pour le test RM

**Test VP :**

-Ajouter 0,5mL de KOH ou de NaOH (réactif VP1) et 0,5mL d'alpha-naphtol (réactif VP2)

-Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation

-Attendez quelques min à 1 heure

Si Rouge : VP+

Si jaune : VP-

**Test RM**

-ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle

- la lecture est immédiate

Si rouge : RM+

Si jaune : RM-

**11. Citrate de Simmons :**

**Principe :**

Certaines bactéries sont capables d'assimiler le citrate, c'est-à-dire capables d'utiliser le citrate comme unique source de carbone et d'énergie. Ces bactéries possèdent une citrate perméase et les enzymes du catabolisme du citrate. De telles bactéries sont capables de croître sur un milieu synthétique, Le milieu au citrate de Simmon, dont l'unique source de carbone est le citrate de sodium. Ce milieu contient également des sels d'ammonium comme unique source d'azote et du bleu de bromothymol comme indicateur de pH.

Initialement, le pH du milieu est de 7 et à un tel pH, le bleu de bromothymol a une teinte verte

La croissance sur le milieu au citrate de Simmon s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage au bleu (bleu outre-mer) du bleu de bromothymol.

Milieu au Citrate de Simmon conforme au norme NF V 08-017

Formule en g/L d'eau distillée	Citrate de sodium	1
	Chlorure de sodium	5
	Sulfate de magnésium	0,2
	Dihydrogenophosphate d'ammonium	1
	Monohydrogenophosphate de potassium	1
	Bleu de bromothymol	0,08
	Agar	13

**La technique :**

Incuber à 37°c pendant 24h

**La lecture :**

Culture avec bleuissement : Citrate +

Ni culture ni bleuissement de milieu : Citrate -

**Annexes III :**

Tableau conventionnel de différenciation de quelques genres et espèces d'entérobactéries

Entérobactéries	LA C	ONP G	LD C	CI T	H <sub>2</sub> S	UR E	TD A	IN D	V P	GL U	MA N	O X	N O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MO B
Citrobacter Freundii	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+

Enterobacter Hafinia	+	+	V	V	-	-	-	V	+	+	+	-	+	-	+
E.coli	+	+	+		-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	V
Klebsiella Oxytoca	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Klebsiella Pneumoniae	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
Proteus Morganelle	-	-	-	V	V	+	+	V	-	+	+	-	+	-	+
Providencia	-	-	-	+		V	+	+	-	+	V	-	+	-	+
Salmonella Arizonae	V	+	+	V	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Salmonella Spp	-	+	+	V	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Serratia	-	+	+	+	-	-	V	-	V	+	+	-	+	-	+

+ : caractère biochimique moyennement fiable.

- : caractère biochimique négatif assez fiable.

V : caractère variable suivant les germes ou les espèces.

#### Annexe IV :

Tableau de quelques études sur les mammites cliniques :

Etudes	Nombres des échantillons	Staphylocoques		Streptocoques	Entéro		Autres pathogènes association	Aucune croissance	
		SCP	SCN		E.coli	Autres			
01	117	50,55	41,76	-	7,69	-	-	1,12	23,08
02	51	4,83	19,35	14,5	25,8	16,12	19,35	23,52	1,96
03	108	29,3	8,0	66,8	25,3	2,7	1,3	5,3	35,0
04	117	6	21	34	23	7	9	3,7	17
05	76	45,9	20,5	25,4	6,8	-	-	13,2	17,1
06	480	10,8	11	34	26,9	-	11,9	5,4	-
07	1580	12	6,2	10,3	9,6	-	17	9,1	35,9
08	624	11	18	19	16	5	6	25	-
09	464	13	14	25	18	9	21	25	8
10	138	40,6	-	8,7	26,1	-	17,3	-	-
11	30	53,3	-	0	46,7	-	-	40	10
12	68	20,59	4,41	41,2	11,76	-	5,89	-	11,76
13	320	17,81	5,63	52,5	18,75	3,75	1,65		8,59
14	71	18,31	14,08	33,8	15,49	-	18,31		

01 : (Beroual k, 2003). 02 : (Bennaceur.I et Benameur.I 2007). 03 : (Manner.Y, 2001).04 : (Noireterre ph, 2006). 05 : (Flache H, 2002). 06 : (Bradley et al, 2007). 07 : ( Richardr O et al,2006). 08 : (Hagnestam.c.,et al,2007). 09 : (Bidaud O., et al, 2005/2007). 10 : (Azmi.H et al,

2008). 11 : (Lurthu R et al, 2006). 12 : (Coulon et al, 2002). 13 : (Argente et al, 1997). 14 : (Mekonnen.H et al,2005).

## Liste des références

- Achache, S. (1982)** : Choix de l'antibiotique dans le traitement des mammites bovines. Etude bibliographique du sujet, suivie d'une pratique de quelques prélèvements de lait mammitieux dans la région d'Alger. Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur vétérinaire. 131p.
- Alexandre, A. (2005)**. Utilisation des comptages cellulaires dans la comparaison de deux préparations hors-lactation. Thèse de diplôme de Docteur Vétérinaire. Université Claude-Bernard-Lyon. 94p.
- Argente., Le Guern.B, Le Moine.H 1997** : Les mammites cliniques en Cote d'Armor 1996-1997 in les mammites en élevage bovin 1<sup>ère</sup> édition. Edition F.D.G.D.S, 191 p.
- Argente, G., Lardoux, S., Le Berre, K et Labbe J-F. (2005)**. Valeur de l'observation clinique des symptômes simples de mammitite pour prédire les bactéries en cause. Bull. Group. Tech. Vét., 32, 39-46.
- Baroun J., Geromegnance N., Chassane M. Door N., Sabatier P., 1999** ; Facteur structurels de variations des niveaux de comptage cellulaire du lait et de fréquence des mammites cliniques dans 500 élevages bovins.
- Benhassen S, Messadi L, Benhassen A., 2003**: Identification et caractérisation des espèces des Staphylococcus isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammites .In : document en ligne : Annales de médecine vétérinaires, 2003, 147 41-47(<http://Facmu.ulg.ac.be/amo/articles>), 2003-147-1-04.Pdf) (consulté le 18-07.2007).
- Bennaceur.I et Benameur.I 2007** : La recherche des pathogènes majeurs dans les mammites cliniques bovines dans la wilaya de Blida. Memoir en microbiologie, 61p.
- Bennet G., 1993**; What to expect from sire selection to lower somatic cell count. In: 32<sup>nd</sup> Annual Meeting National Mastitis Council, Kansas City, KS, USA, 4-7 October, p. 65-72.
- Berg, C.2001**: Infections intramammaires des vaches laitières en fin de lactation : Nature et sensibilité aux antibiotiques des bactéries pathogènes isolées. Thèse de Doctorat vétérinaire, ENV Nantes, 101p

**Beroual Katiba, 2003** : Caractérisation des germes d'origine bactérienne responsables des mammites bovines dans la région de la Mitidja. Mémoire de magister en sciences vétérinaires USDB.

**Bidaud O., Houffschmitt P., Viguerie Y., Services techniques Intervet, 49071 Beaucozé 2005/2007:** Etiologie des mammites bovines en France entre 2005 et 2007.

**Billon P., Menard J.L., Berny F., Gaudin V., 2001** ; La détection des mammites par la mesure de conductivité électrique du lait. Bullen G.T.V. n°12. Sep-Nov. 35/39.

**Blood D.C et Henderson J.A., 1976** ; Médecine vétérinaire. Edition Vigot Frère, 2<sup>ème</sup> édition. 1079 p.

**Bosse P., 1982** ; Basse d'un plan de prévention des mammites bovines et difficulté de mise en place. Thèse Doc. Vét. Faculté Médecine Créteil, France. 65 p.

**Bouaziz, O. (2001).** Prévalence des différents germes responsables des mammites clinique de la vache dans l'est algérien. SIPSA (Mai 2001). Laboratoire de Recherche de Pathologie Animal de Développement des Elevages et Surveillance de la chine alimentaire de D.A.O.A.

**Bouchot, M.C., Catel, J., Chirol, C., Ganière, J.P et le Menec, M. (1985).** Diagnostic bactériologique des infections mammaires des bovins. Recueil Médecine Vétérinaire ; 567-576.

**Bouveron O** : Evaluation de la résistance aux antibiotiques de streptocoques responsables de mammites cliniques chez la vache, thèse pour obtention de grade de Docteur Vétérinaire .Ecole nationale vétérinaire Lyon,(2001) .

Repartis dans 21 départements français. I .N.R.A. Prod. Anim., 12,39-48.

**Bradly A. J., 2002;** Bovine mastitis: An Evolving Disease. The Veterinary Journal, 164, 116-128.

**Bradly et al, 2007** : Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. The Veterinary Reord (2007) 160 : 253-258. ( [http:// www.au-coeur-du-lait.fr](http://www.au-coeur-du-lait.fr)).

**Brouillet P., Raguet Y., « Logements et environnement des vaches laitières et qualité de lait ».** Bulletin GTV4, (1990) .8.

- Bruyas, J.F.(1997).** Mammites bovines. Cours de gynécologie, ENV Nantes.
- Capuco A.V., Smith JJ., Waldo D.R., Rexrodad C.E.,** «Influence of prepubertal dietary regimen on mammary growth of Holstein heifers ». *Journal of dairy sciences*, (1995), 78, 2709-2725.
- Coulon., J-B, Gasqui.P, Barnouin.J,Ollier.A, Pradel. P, Pomiès.D, 2002 :** Effet of mastitis and related-germ on milk yield and composition during naturally occurring udder infections in dairy cows  
*Anim. Res.* 51(2002) 383-393  
INRA, EDP Sciences, 2002  
DOI : 10,1051/ animals : 2002-031
- Dervaux J, Ecrors F :** « Physiologie de la gestation et obstétrique vétérinaire ». Les éditions Point vétérinaire, (1980), p 273.
- Dosogne H., Arendt J., Gabriel A., Burvenich C.** « Aspects physiologiques de la sécrétion laitière par la mamelle bovine ». *An.Méd.Vét .* (2000), 144, 357-382.
- Du Preez J.H.,** « Bovine mastitis therapy and why it fails ». *J.S.Afr. Vet. Assoc.*, (2000), 71(3), 201-208.
- Dudouet. Chistian, 1999 :** La production des bovins allaitants. Edition France Agricole, 384p.
- Duval J.,** « Soigner la mammite sans antibiotiques ». *Projet pour une agriculture écologique*, (1995), 370-11.
- Eberhart, R.J, Natzke, R.P et Newbould, F.H.J. (1979).** Coliform mastitis. A review. *J.Dairy Sci.*, 62, 1-22.
- Ericsson Unnerstad H., Lindberg A., Persson Waller K., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Ost M., Bengtsson B,** “Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors”. *Veterinary Microbiology*, (2009) 13, 790-97.
- Erskine R.J., Walker R.D., Bollin C.A. Bartlett P.C., White D.G.,** “Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period”. *J. Dairy Sci.*, (2002), 85: 1111-1118.

**Fabre, J.M., Morvan, H., Lebreux, B., Houffschmitt, P.H et Berthelot, X. (1997).** Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France, partie 1 : mammites cliniques. Bull. Group. Tech. Vét., 3-B, 17-23.

**Faroult B., 1994 ;** Méthodologie d'approches des infections mammaires en troupeau laitière et maîtrise de la qualité hygiénique du lait. Rec. Vet : 170(6/7), 469-478.

**Faroult, B et Seryes, F. (2001).** Référentiel Vétérinaire GTV partenaire : Bonnes pratiques vétérinaires pour la définition d'un plan de traitement des mammites dans le troupeau. SNGTV paris, novembre 2001.

**Faroult, B et Seryes, F. (2005).** Référentiel vétérinaire GTV partenaire : Bonnes pratiques vétérinaires pour la définition d'un plan de traitement des mammites dans le troupeau. SNGTV.Paris.

**Feillo C. et Mertel J.L., 1996 ;** Isolement et identification des principaux germes de mammites des ruminants. Programme d'accréditation N° 116.

**Ferney C., Oudar J., Saint Aubert G., 1994 ;** Diagnostic bactériologique des mammites. Revues de médecine vétérinaire. 117, 10, 845-857.

**Flache H.,** « Cinétique des comptages cellulaires de quartiers après mammites cliniques chez la vache laitière ». Thèse de docteur vétérinaire, ENV de Lyon (2002), 72p.

**Forget D.,** « Un vaccin contre la mammite bovine ». Science clip, (2005).

**Fourar Nabil, Belkacem Yasmine :** Dépistage et diagnostic bactériologique et électro phorétique des mammites sub-clinique. PFE Blida 2007.

**Grappin. R. et Jeunet R.,** « Essais de l'appareil « Compteur Coulter » utilisé pour la détermination du nombre de cellules totales des laits de troupeaux, I.N.R.A., Station Expérimentale Laitière (39) Poligny ». LE LAIT, (1971), 505-506.

- Guerin-Fauble V., Carret G., Houffschmitt P.,** « In vitro activity of 10 agents againts bacteria isolated from cows with clinical mastitis ». *The Veterinary Record*, (2003), 466-471.
- Guy C., 1986 ;** Les productions laitières, volume 1 : les bases de la production. Édition technique et documentation Lavoisier. 348 p.
- Hagnestam.C.,Emanuelson.1 U,et Berglund.B 2007 :** Yield Losses Associated With Clinical Mastitis Occurring in Different Weeks of Lactation  
*J.Dairy Sci.*90:2260-2270  
Doi :10.3168/jds.2006-583  
American Dairy Science Association, 2007.
- Hanzen C.H. (1999)** « Pathologie de la glande mammaire de la vache laitière. Aspects individuels et d'élevage. Université de Liège.
- Hanzen C.H.2000** « Propédeutique et pathologie de la reproduction male et femelle, biotechnologie de la reproduction et pathologie de la glande mammaire ». 4<sup>ème</sup> édition (2000), Université de Liège.
- Hanzen, 2006 ;** Site de la faculté de Médecine Vétérinaire de Liège, pathologie infectieuse de la glande mammaire.
- Hanzen C.H et Pulvinage, P.H. (2007).** La pathologie infectieuse de la glande mammaire approche individuelle 29p.
- Hanzen, CH et Pulvinage, P.H.(2008).** La pathologie infectieuse de la glande mammaire approche individuelle.
- Hanzen,CH. (2009).** La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Etio-pathogénie et traitements. Approche individuelle et de troupeau. Université de Liège.
- Henry I., 2001 ;** Fréquence étiologique des infections intra mammaires des vaches laitières primipares autour du vêlage. Thèse pour le diplôme de docteur vétérinaire. Nantes.
- Hogan J.S., Smith K.L.,** "Coliform mastitis". *Vet. Res.* (2003), 34(5), 507-19.

**Hollmann, K. (1974).** Cytology and fine structure of mammary gland. In Larson B.L.Smith.V.R , lactation IA. Comprehensive treatise. Academic Piers. New York. 3.95.

**Jodi, W. (2007).** Diagnostiquer la mammite, in : Le producteur de lait Québécois, Sept 2007.

**Kerro D.O., Van Dijk J.E., et Nederbragt H., 2002 ;** Factors involved in the early pathogenesis of bovine staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. Vet. Q. Dec ; 24(4) : 181-98.

**Lacasse P., 2003 ;** Biologie de lactation, cours sur la biologie de lactation, département de biologie, université de Sherbook, immunologie de la glande mammaire se mammite.

**Lebret P. Berthelot X. Petit C. (1990),** connaissances fondamentales. Les infections mammaires de la vache laitière, 1,49 pp.

**Leray, 1999 ;** Méthodes de comptage des cellules du lait et contrôle qualité In : Cellules somatiques du lait, Journées nationales Groupements techniques Vétérinaires I.N.R.A., Nantes, 26-27-28 mai, 85-90.

**Leroux, P.C.M. (1982).** Germes des laits de mammites bovines : Evolution de leur résistance aux anti-infectieux. Thèse de doctorat. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.

**Linton A., Het Robinson T.C.,** “ Studies on the association of Escherichia coli in bovine mastitis”. Br. Vet.J., (1984), 140,368-373.

**Lurthu Reetha., Babu.M, Pugazhenth.T-R et Johnson Rajeswar.J 2006 :** Clinical mastitis in cows and their response to in vitro sensitivity Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences 2(4) 140-141, July- August 2006 .

**Makovec J.A., Ruegg P.L.,** “Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8905 samples (1994-2001)”.J.am.Vét. Med. Assoc., 2003, 222(11), 1582-1589.

**Maricato E., Lange C.C. Brito., M.A.V.P, Brito J.R.F., Cerqueira M.M.O.P.,** “ Characterisation and Antibiotic Susceptibility patterns of catalase-negative gram positive Cocci isolated From Bovine Mastitis In Brazil” . ISAH-Warsaw, Poland, (2005), Vol 1.

**Martel J.L., Vandeale E.,** « Epidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez les bovins ». *Point Vét.*, (1999), 30(198), 15-22.

**Meissonier L.E., David C., Chamsseur A.,** 1992 ; Nutrition, maladies métabolique et mammites chez les vaches laitières colloque de la société française de laitière. Paris.

**Messadi, L., Chemli, J., Ben Salem, F., Mallek, F et Chebil, S. (1999).** Mammites cliniques chez la vache : Principaux germes isolés et antibiorésistance. *Proceeding du colloque : lait, qualité et santé.* Tunisie.

**Manner Y.,** 2001 ; Méthode de bactériologie des mammites cliniques bibliographie. Thèse de diplôme de docteur vétérinaire. Nantes.

**Mialot, J.P. (1983).** Technique de prélèvement de lait pour examen bactériologique. *Rec. Méd. Vét.*, 159,(11), 1057-1058.

**Myllys V., Honkanen-Busalski T., Huovinen P., Sandholm M., Nurmi E.,** "Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machine and antibacterial drugs". *Acta vet. Scand.*, (1994), 35, (4), 363-369.

**Noireterre, P. (2006).** Suivis de comptages cellulaires et d'examen bactériologiques lors de Bizet de Poisy. Thèse de diplôme de Docteur Vétérinaire. ENV Lyon.

**Pengov A., Ceru S.,** « Antimicrobial drug susceptibility of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine and ovine mammary glands ». *J. Dairy Sci.*, (2003), 86, 3157-3163.

**Petersson-Wolf C.S., Adams S., Wolf S.L. and Hogan J.S.,** "Genomic Typing of Enterococci Isolated from Bovine Mammary glands and Environmental Sources" *J. Dairy Sci.*, (2008), 91, 615-619.

**Pitkala A., Haveri M., Pyorala S., Myllys V., Honkanen-Buzalki T.,** "Bovine mastitis in finland 2001- prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance". *J. Dairy Sci.*, (2004), 87, 2433-2441.

**Poirier, E., Scholl, D et Anne-Marie Christen. (2008).** Le traitement au tarissement. Y a-t-il un risque réel d'antibiorésistance ? Février 2008. Le producteur de lait québécois.

**Poutrel B., 1985 ;** Généralité sur les mammites des vaches laitières. Processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthode de contrôle. Rec.Med.Vet.161.p497-510.

**Serieys F.** « Le tarissement des vaches laitières. Une période clé pour la santé, la production et la rentabilité du troupeau ». Editions Frances Agricole, (1997), P224.

**Radostis. (1997).** Veterinary médecine, Huitième édition.

**Radostis O.M., Blood D.C et Gay C.C.A,** « Text book of diseases of cattle, pigs, goats and horses ». Veterinary, Medecine,(1997), 15,576.

**Remond B., Kerouanton J., Brocard V.,** « Effets de la réduction de la durée de la période sèche ou de son omission sur les performances des vaches laitières ». INRA, Prood. Anim., (1997).

**Renaud, T. (2002).** Méthodes de diagnostic des mammites. L'action vétérinaire, 1614, 21-25.

**Richard Olde Riekerink et Harman Barkema,2006 :**La mammite au Canada. Santé Animal. Le Producteur De Lait Québécois, 34-36p. RMV 158\_100\_105.

**Rosenberger. Gustave, Gerrit. Dirksen, Hans-Dieter. Grunder, Emberhard. Grunert, Dietrich. Krause, Mathieu's Sober 1979:** Examen Clinique des Bovines éditions points vétérinaire 526p.

**Salat, O. (2008).** Gestion des mammites à S. aureus en élevage. Le Point Vétérinaire/ Janvier-février 2008/n°282.

**Sanders P.,** « Traitements thérapeutiques et antébiorésistance ». Point Vét., (1999), 30, (198), 23-30.

l'antibiothérapie ? Mammites des vaches laitières ». Société Française de Buatrie,(1991), 88-97.

**Sargeant, J.M., Morgan-Scott, H., Leslie, K.E., Ireland, M.J et Bashiri, A. (1998).** Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: Frequency of occurrence and bacteriological isolates. Can. Vet. J., 39, 33-38.

**Schukken, Y.H., Smith, J.A.H., Grommers, F.J., Vandegeer, D et Brand, A. (1989).** Effects of freezing on bacteriologic culturing of mastitis samples. *J. Dairy Sci*, 72: 1900-1906.

**Schukken Y.H., Grommers F.J., Van de Geer D., Erb H.N., Brand A.,** “ Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk somatic cell count. 2 Risk factors for *Echerichia coli* and *Staphylococcus aureus*”. *J. Dairy Sci.*, (1991), 74.

**Serieys F., Seegers H.,** « Intervention du vétérinaire face à un problème de mammites ». In : Journées nationales GTV, Tours, (2002), 139-156.

**Serieys F.,** « Abord du traitement des infections à *Str. Uberis* ». *Point Vét.*, (2003), 34, (239), 36-37.

**Smith. K.L. et al.,** « Etude de sélénium et de la vitamine E sur la fonction des cellules phagocytaires et le control des mammites ». (1999).

**Taponens, Koort j, Bjorkroth j, Saldcimi H, 2006:** Pyoralas-Bovine intramammary infections caused by coagulase negative staphylococci may presort throughout lactation according to amplified fragment taught polymorphisme based analyses *journal of Dairy Science* 2006,90:3301-3307.

**Timms L.L., et Shuetz H.,** « Dynamics and signifiance of coagulase negative Syaphylococci intramammaire infection » *J Dairy sci.*, (1987), 70, 2648-2657.

**Vaissaire J.P., 1977 ;** Sexualité et production des mammifères domestiques et de laboratoire. Edition Maloine.

**Van De Leempute E,2007 :** Analyse bactériologique du lait conférence organisée par laboratoire PFIZER pour les vétérinaires en exercice, Mantes, Mai 2007.

**Vestweber et Leipold HW ; 1994,** symptômes lors de mammites ; modifié d’après Vestweber 1993.

**Wallace Jodi, 2007 :** Diagnostiquer la mammite *MEDECINE VETERINAIRE le producteur de lait québécois* septembre 2007, 47-49p.

**Wattiaux M.A.** « Reproduction et sélection génétique. Chapitre 12 : évaluation de la condition corporelle ». (1999). Institut Babcock pour la recherche et le développement international du secteur laitier. University Wisconsin-Madison.

**Wattiaux M.A., 2006;** The board of regents of the university of wisconsin system.

**Weisen 1974,** Prophylaxie des mammites, 2, dépistage des mammites. Edition Vigot frères.

#### **Sites d'internet**

1. <http://babcock.wisc.edu/node/204>
2. <http://infovets.com/demo/demo/dairy/D100.HTM>
3. <http://Facmu.ulg.ac.be/amo/articles>