

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie Alimentaire Santé



Réf

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Isolement des souches de staphylocoques à
partir de lait de vaches mammiteuses**

Présenté par :

BENLABED Nour el houda & ZAIDI Yacine

Soutenu le : 17 juin 2017

Devant le jury composé de :

Mme. YAHIAOUI.H
Mr. BENDJEDDOU.K
Mme. TETILI.F

MAA
MCB
MAA

Présidente
Examinateur
Promotrice

Année universitaire : 2016/2017



Dédicaces

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

*A mes chers parents pour leur amour et leur support continu,
Je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies. Je suis très
heureuse et fière de votre présence à mon côté. Mon cher père, que dieu
l'accueille dans son vaste paradis*

Ma mère

A mon cher frère abd el khalak

A toute ma famille

A tous mes enseignants du primaire, du secondaire et du supérieur

*A tous mes très chers ami(e)s
«lina ,zina , hadjer , sara ,hayet, karima »*

Mes camarades de la promo de Biologie 2016-2017

*Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement santé, bonheur et
tranquillité.*

Merci mon Dieu !

Benlabed.N



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A moi-même, a ma famille

A mes amis spécialement :

Celia, Nesrine, Nafaa, Meriem

Et à toute la promotion MAS 2016/2017

Zaidi.Y



Remerciements



On remercie, Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la foi qui nous a guidés jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce projet.

On tient à remercier notre promotrice, Mme TETELI, pour le suivi qu'elle nous a accordé durant le déroulement de ce mémoire. Son soutien et sa patience, nous a permis de mener à bien ce travail.

On remercie les membres du jury (Mme YAHIAOUI et Mr BENDJEDDOU) d'avoir consacré de leurs temps à la lecture de ce manuscrit, et d'accepter d'évaluer ce travail.

Une grande reconnaissance aux techniciennes du laboratoire pour leur aide et leur gentillesse.

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

LISTE DES ABREVIATIONS

BHIB: Brain-Heart Infusion Broth

BP: Baird Parker Agar

CCSI : comptages cellulaires somatiques individuels

CMT : California Mastitis Test

GN : Gélose nutritive

G - : Gram négatif

G+ : Gram positif

HCl : Acide chlorhydrique

IgG : Immunoglobuline G

RM : Rouge de méthyle

SCN : Staphylocoque à Coagulase Négative

TIA : Toxi-infection Alimentaire

TSST-1 : Toxic shock syndromtoxin-1

TSI : Triple Sugar Iron

VP : Voges-Proskauer

LISTE DES FIGURES :

Figure 01 : Mécanismes de virulence de <i>S. aureus</i>	5
Figure 02 : Mammite gangreneuse : formation du liseré	7
Figure 03 : Mammite d'été ou mammite purulent : les quatre quartiers sont atteints, ce qui n'est pas fréquente	7
Figure 04 : Mammite colibacillaire : le quartier est très enflé. A ce stade, la perte du quartier est inéluctable	8
Figure 05 : Isolement et purification de <i>Staphylococcus aureus</i> à partir de lait	18
Figure 06 : Schéma du test de catalase réalisé sur une lame en verre.....	19
Figure 07 : Aspect sur milieu de (GC + TK) après incubation à 37°C pendant 24h.....	22
Figure 08 : Aspect des colonies sur milieu Baird Parker(A) colonies vu d'en haut (B) colonies vu d'en bas.....	23
Figure 09 : Aspect des colonies sur gélose nutritive.....	23
Figure 10 : Aspect des colonies sur milieu Chapman à droite colonies jaunes (<i>S. aureus</i>) à gauche colonies blanches (Staphylocoques blanc.....	24
Figure 11 : Test de la catalase, effervescence lors de l'ajout du H ₂ O ₂	24
Figure 12 : Aspect d'une souche de staphylocoque observé sous microscope optique (grossissement x 100).....	25
Figure 13 : Résultat du test de la coagulase après 2 heures d'incubation	26
Figure 14 : les statistiques de la CAZEL (Bejaia).....	28

Liste des figures en annexes

Figure 01 : Les différentes structures interne de la mamelle.

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau I : Principaux facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Tableau II : Modification chimique du lait en cas de mammite composition en g.kg ⁻¹	13
Tableau III : Les différentes régions ou les échantillons ont été prélevés et leur traitements.....	15
Tableau IV : Différents tests d'identification effectués	20
Tableau V : Caractères biochimiques différentiels des staphylocoques.....	25
Tableau VI : Les statistiques du Dr Benyahia sur les mammites.....	29

Liste des tableaux en annexes

Tableau I : Statistiques EPE CAZEL (2014)

Tableau II : Statistiques EPE CAZEL (2015)

Tableau III : Statistiques EPE CAZEL (2016)

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Synthèse Bibliographique

I. <i>Staphylococcus aureus</i>	2
I.1. Historique	2
I.2. Caractères généraux.....	2
I.2.1. Caractères morphologiques et culturels	2
I.2.3. Caractère structuraux.....	3
I.2.4. Caractère biochimique.....	3
I.3. Epidémiologie.....	3
I.3.1. Réservoir.....	3
I.3.2. Mode de transmission.....	4
I.4. Facteurs de virulence.....	4
II. Mammites	6
II.1. Définition	6
II.2. Classification des mammites.....	6
II.2.1. Mammites cliniques.....	6
II.2.2. Mammites subcliniques	9
III. Bactéries impliquées dans les mammites	9
III.1. Agents pathogènes majeurs	9
III.2. Agents pathogènes mineurs	9
III.3. Principaux facteurs qui causent la mammite	9
III.3.1. La traite	9
III.3.2. Les traumatismes et blessures de la mamelle	9
III.3.3. Les conditions de vie	10
III.4. Evolution des mammites.....	10
III.4.1. Phase d'invasion	10
III.4.2. Phase d'infection	11

III.4.3. Phase d'inflammation	11
III.5. Modifications liées à la mammité	12
V. Impact de la mammité	12
V.1. Impact de la mammité sur la mamelle.....	12
V.2. Impact de la mammité sur le lait	12
V.2.1. modification chimique	12
V.2.2. Modifications physiques	13

Matériels et méthodes

I. Lieu de stage	15
II. Prélèvement.....	15
II.1. Méthode de prélèvement du lait de vache mammitéuse	16
II.1.1. Nettoyage de la mamelle	16
II.1.2. Essuyage des trayons	16
II.1.3. Elimination des premiers jets.....	16
II.1.4. Recueillir une petite quantité de lait.....	17
II.1.5. Conservation du tube et transport.....	17
III. L'enrichissement	17
IV. L'isolement	17
V. Purification.....	17
VI. Vérification de la pureté des souches.....	19
VI.1. Examen macroscopique.....	19
VI.2. Etude microscopique.....	19
VI.3. Test de la catalase	19
VII. Identification	20
VIII. Autres tests	21
VIII.1. Test de la coagulase	21
VIII.2. Test de la DNAase	21

Résultats et discussion

I. L'enrichissement.....	22
II. L'isolement.....	23
Test de catalase.....	24
Coloration de Gram	25
III. Tests d'identification les <i>Staphylocoques</i>	25
Statistiques.....	28
Conclusion et perspectives.....	30

Introduction

La consommation du lait repose essentiellement sur sa qualité bactériologique et physico-chimique. Pour mieux consommer ce produit, il est important de veiller sur une qualité optimale depuis la traite jusqu'au stade du produit fini.

Depuis que l'homme a domestiqué la vache, les mammites ont toujours été présentes. Malgré les progrès accomplis par les sciences modernes, elles subsistent encore aujourd'hui dans la plupart des troupeaux. Les coûts annuels des mammites dans le monde entier seraient estimés à 130 \$/150 € par vache. Ces coûts représentent la production du lait réduite ainsi que sa qualité, le frais des traitements et des honoraires vétérinaires, des pertes pour les laits jetés frais et la réforme des animaux infectés (**Duval, 2008**).

La mammite bovine est une maladie infectieuse complexe et économiquement importante pour les bovins laitiers à travers le monde, ce qui peut entraîner des pertes importantes en raison de la réduction du rendement du lait, et augmenter les taux d'abattage et les dépenses vétérinaires (**Miles et al., 1992**). La mammite subclinique, sans aucun signe d'inflammation par rapport à la mammite clinique, est la principale forme de la maladie et représente la majorité des cas de mammite bovine chez les troupeaux laitiers (**Oliver et al., 2004**). L'une des causes les plus importantes de la mammite subclinique bovine est l'infection intramammaire (IMI) causée par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), difficile à éradiquer (**Østeras et al., 2006 ; Ferguson et al., 2007**).

L'espèce bactérienne la plus fréquemment incriminée dans les toxi-infections impliquant le lait cru et les produits laitiers demeure *S. aureus* (**De Buyser et al., 2001**), et l'une des principales contamination du lait cru par *S. aureus* reste la mammite subclinique (**Normanno et al., 2007**).

L'objectif de cette étude et de pouvoir isoler des souches de staphylocoques à partir de lait de vaches mamiteuses de différentes régions.

Il apparaît évident qu'une meilleure compréhension de l'épidémiologie de *S. aureus* est nécessaire pour l'amélioration des protocoles actuels de contrôle de la mammite et la connaissance précise de l'interaction entre la bactérie et le tissu mammaire pour permettre de lutter plus efficacement contre ces infections.

Le traitement et la prévention de cette infection requière l'utilisation massive d'antibiotiques, ce qui est en partie responsable de l'émergence de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques chez les troupeaux laitiers (**Lollai et al., 2008**).

Synthèse

bibliographique

I. *Staphylococcus aureus*

I.1. Historique

Observés par Pasteur dans un pus de furoncle en 1880, les staphylocoques doivent leur nom à Ogston (1881), qui les a mis en évidence dans un abcès aigue et chronique très fréquent en pathologie, particulièrement au cours des suppurations. En 1884, s'était le tour de Rosenbache qui a pu arriver à obtenir des cultures pures de ces bactéries. Il a divisé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon la coloration des colonies (blanche ou dorée). En 1954, Baber a fait une relation entre les empoisonnements alimentaires à *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), et la production de toxines (Elliot, 2001).

Les Staphylocoques sont des germes ubiquitaires qui colonisent plusieurs milieux (sol, eau, air). Ils appartiennent à la flore commensale des peaux et des muqueuses. Le Staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène, elle est responsable d'intoxications alimentaires (Elliot, 2001).

I.2. Caractères généraux

I.2.1. Caractères morphologiques et cultureux

S. aureus est une bactérie coccoïde à Gram positif, d'environ 1µm de diamètre et apparaît en amas à l'examen microscopique.

Ce sont des cellules immobiles, non sporulées, et l'examen au microscope optique ne permet pas de visualiser une capsule (Matos et al., 1991). *S. aureus* est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C en fonction des souches (température minimale : entre 5 et 10°C ; température maximale : environ 45°C).

Elle est capable de se multiplier à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un pH optimal de croissance de 7 à 7,5. Elle est halotolérante et peut se multiplier en présence de concentrations élevées de chlorure de sodium (en général jusqu'à 10 %) (Sutra et al., 1998).

Elle tolère une activité de l'eau (aw) exceptionnellement basse pour une bactérie puisque sa croissance est inhibée à partir de valeur d'aw comprise entre 0,95 et 0,91. Sa culture est facile, elle se fait en milieu aérobie comme en milieu anaérobie, en milieu solide, les colonies de *S. aureus* mesurent 2 à 3 millimètres de diamètre, elles

sont lisses, bombées et luisantes, les colonies peuvent parfois prendre une coloration jaune or, d'où son nom de « Staphylocoque doré » (Sutra et al., 1998).

I.2.3. Caractère structuraux

Certains *S. aureus* sont capables de produire des polysaccharides et des protéines qui forment une microcapsule. L'excrétion de polysaccharides et de protéines capsulaires est dépendante du milieu de culture: les bactéries synthétisent une capsule lorsqu'elles se développent dans des milieux riches en sucres.

Chez les bactéries encapsulées, on note une résistance à la phagocytose et parfois une augmentation de la virulence des souches. La capsule est responsable de la formation de biofilms qui favorisent la résistance de la bactérie vis à vis du système immunitaire de l'hôte (Euzéby, 2008).

I.2.4. Caractère biochimique

S.aureus est capable de fermenter le glucose et la plupart des sucres (notamment, le mannitol et le tréhalose). La présence d'une coagulase permet d'identifier le *S.aureus*. Il existe deux formes de coagulases : la « coagulase libre » et la « coagulase liée» (Sutra et al., 1998).

I.3. Epidémiologie

I.3.1. Réservoir

Les principaux réservoirs de *S. aureus* sont la peau et les muqueuses de l'homme et de l'animal puisqu'il s'agit d'une bactérie de la flore commensale.

En effet, 30 à 50 % des personnes n'ayant aucun signe d'infection sont porteurs de la bactérie: il s'agit de porteurs sains. Chez l'Homme, c'est l'épithélium nasal qui est le plus chargé en *S. aureus* (Sivaraman, 2009).

Chez les animaux domestiques, on retrouve le portage sain cutané et au niveau de la muqueuse de l'arbre respiratoire supérieur, mais aussi au niveau de l'appareil urogénital (Biberstein, 1984).

I.3.2. Mode de transmission

La transmission se fait majoritairement par le biais de mains contaminées, transmission dite «manuportée» (soit parce que la personne est porteuse saine soit parce qu'elle s'est transitoirement contaminée auprès d'un autre réservoir). La contamination par contact avec des sources environnementales est rare (**Biberstein, 1984**).

I.4. Facteurs de virulence

La virulence de *S. aureus* est liée à la production d'enzymes et de toxines et à la présence de protéines de surface (adhésion), de protéines de liaisons au fibrinogènes et à sa capacité de former des biofilms par production d'exopolysaccharides (**Tableau I**) (**Fox et al., 2005**).

Tableau I: les facteurs de virulence *S.aureus* (**Novick, 2003 cité par Aloumar, 2007**).

Facteur de virulence	Propriété et fonction
Toxine	
Hémolysine α , γ , β , δ	action sur la membrane cellulaire, effet cytotoxique et ou cytolytique.
Leucocidine panto-valentin	action lytique sur les leucocytes : induction de nécrose cellulaire.
Exfoliative A et B	Epidermolyse : activité mitogène sur les lymphocytes T : responsable de staphylococcies cutané bulleuse.
Toxine du syndrome du choc toxique (TSST)	Activité super antigénique, responsable du syndrome du choc toxique.
Entérotoxines A-E(SEA-SEE)	Activité super antigénique et émétique : impliqué dans les intoxications alimentaires.
Enzymes	
Coagulase libre	Coagulase du plasma, rôle protecteur contre la phagocytose.

Enzymes modifiant les acides gras (FAME)	Estérification des acides gras.
Lipase / estérase	Hydrolyse des lipides, rôle nutritionnel.
Staphylokinase	Active le plasminogène en plasmine et provoque la lyse de la fibrine.
Nucléases	5' phosphate exo et endonucléase active sur les acide nucléique ; rôle nutritionnel
Hyaluronidase	Lyse des tissus conjonctifs : diffusion tissulaire de <i>S.aureus</i> .
Composition de surfaces	
Protéine A	Fixe le fragment Fe des immunoglobulines résistantes à la phagocytose.
Fibronectine binding protéine A et B	Liaison à la fibronectine : adhésion et colonisation.
Protéine de liaison au fibrinogène	Fixation au fibrinogène ; adhésion et colonisation.
Protéine de liaison au collagène	Fixation au collagène ; colonisation.
Cumping factors A et B	Fixation au fibrinogène ; colonisation.
Polysaccharide de capsule	Lutte contre la phagocytose.

Les principaux facteurs de virulence sont indiqués par la figure 01 :

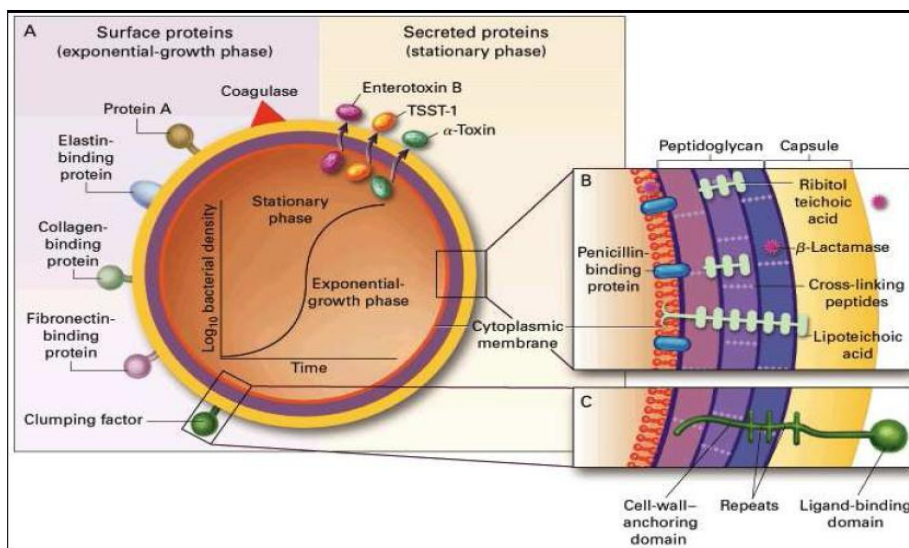


Figure 01 : Mécanismes de virulence de *S. aureus* (Lowy, 1998).

II. Mammites

II.1. Définition

La mammite est une inflammation de la mamelle dont l'origine la plus fréquente est la pénétration d'une bactérie dans un quartier par le canal du trayon. On différencie la mammite clinique (entraînant une modification systématique de l'aspect du lait, avec présence ou non de signes locaux sur la mamelle et de signes généraux), de la mammite subclinique que l'on met en évidence a posteriori, grâce aux comptages cellulaires somatiques individuels (CCSI) ou a ceux du cartier, *S. aureus* est l'agent étiologique des mammites cliniques et sub-cliniques le plus prépondérant et le plus contagieux (**Bosquet et al., 2010**).

II.2. Classification des mammites

Les mammites sont classées selon les modifications de la mamelle (chaleur, douleur, rougeur, gonflement), la composition du lait (grumeaux, couleur) (**Faroult, 2000**).

II.2.1. Mammites cliniques

Les mammites cliniques s'accompagnent parfois d'une très grande forte réaction inflammatoire et de symptômes graves qui peuvent être spectaculaire (congestion, œdème, sécrétion du lait décomposée ou purulente, abcès, fistule, gangrène...) et parfois sont associées à des signes généraux plus ou moins intenses (hyperthermie, trouble nerveux, amaigrissement...) (**Faroult, 2000**).

Ces mammites entraînent toujours une chute importante de production. Quelquefois, la perte d'un quartier ou plusieurs quartiers qui conduisent à la réforme et exceptionnellement à la mort de l'animal. La sévérité et l'évolution de l'infection dépendent à la fois du pouvoir pathogène du microorganisme en cause et de l'efficacité de la défense immunitaire de l'hôte (**Faroult, 2000**).

On distingue quatre types de mammites cliniques :

a) Mammite gangreneuse

C'est une infection mammaire due le plus souvent à des souches de *S.aureus* productrices de l'hémolysine α . Cette toxine provoque de la vasoconstriction locale prolongée qui empêche l'irrigation sanguine de la partie distale du quartier infecté, entraînant la nécrose des tissus. Cette forme de mammite est plus fréquente chez les

jeunes vaches que chez les vaches âgées qui disposent plus souvent d'anticorps contre l'hémolysine α . Des signes de gangrène ont également été observés dans le cas de mammites à *Bacillus cereus* et au colibacillaire (**Figure 02**) (**Faroult, 2000**).



Figure 02 : Mammite gangreneuse (**Bosquet et al., 2010**).

b) Mammite d'été

Elle est causée par *Arcanobactérium pyogenes*. Cette forme de mammite est particulièrement fréquente entre juin et septembre. Elle atteint plus particulièrement les génisses et les vaches laitières taries. Elle se traduit par la formation d'abcès dans le quartier, qui devient enflé et douloureux, et par la production abondante d'un pus nauséabond (**Figure 03**) (**Faroult, 2000**).



Figure 03: Mammite d'été ou mammite purulent (**Bosquet et al., 2010**).

c) Mammite à *Nocardia astéroïdes*

Elle atteint généralement les vaches en troisième et quatrième lactation dans le mois qui suit le vêlage. Elle se manifeste par des quartiers enflés et très durs avec des abcès. La sécrétion est souvent dénaturée, formant un dépôt jaunâtre et un surnageant incolore. La vache présente une température élevée et persistante; elle ne s'alimente plus et maigrit rapidement (Faroult, 2000).

d) Mammite colibacillaire

Elle s'évolue sous forme subaiguës ou suraiguës. Elle dépend principalement de l'efficacité de la réaction immunitaire: précoce, intensité, efficacité bactéricide. Si cette réaction est trop tardive ou insuffisante, les colibacilles se multiplient activement dans le lait et leurs endotoxines provoquent chez l'animal un état de choc. La vache en position couchée est prostrée, présente de la diarrhée, la déshydratation et l'hyperthermie. La sécrétion des quartiers atteints est souvent réduite et le lait prend un aspect aqueux et jaunâtre (Figure 04) (Faroult, 2000).



Figure 04 : Mammite colibacillaire (Bosquet et al., 2010).

II.2.2. Mammites subcliniques

Il n'y a pas d'inflammation macroscopique évidente, mais l'examen du lait révèle l'existence d'une infection, une augmentation du comptage cellulaire et également une altération des propriétés chimiques du lait (**Poutrel, 1985**).

III. Bactéries impliquées dans les mammites

III.1. Agents pathogènes majeurs

Ils sont responsables aussi bien des mammites subcliniques que des mammites cliniques plus moins graves. Par la fréquence, la persistance ou la sévérité des infections qu'ils provoquent, trois espèces bactériennes ont une importance capitale : *S.aureus*, des espèces de *Streptococcus* (*agalactiae*, *dysgalactiae*, *uberis*) et des entérobactéries notamment *E. coli*, *Klebsiella sp.* On leur adjoint parfois des agents plus rares comme *Actinomyces pyogènes*, *Bacillus cereus*, *Mycoplasma bovis*, *Nocardia asteroides* (**Badinand, 1994**).

III.2. Agents pathogènes mineurs

Ils entraînent le plus souvent une réaction modérée de la mamelle, se comportant à la limite entre les agents saprophytes et les agents pathogènes. Cependant, ils peuvent être parfois à l'origine de mammites cliniques aiguës. Il s'agit, en particulier, parmi les plus fréquents, des staphylocoques à coagulase négative, *Micrococcus varians*, *Actinomyces pyogènes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella hemolytica*, *Corynébactérium bovis*, divers *Bacillus*, *Cryptococcus neoformans* et des levures (**Badinand, 1994**).

III.3. Principaux facteurs qui causent la mammite

III.3.1. La traite

Une mauvaise hygiène de la traite ; un réglage défectueux de la machine à traire favorisant la pénétration et la propagation des microbes (**Jolly, 2007**).

III.3.2. Les traumatismes et blessures de la mamelle

Ils sont occasionnés par la machine à traire, les barbelés... ; l'efficacité de la barrière du trayon en est amoindri (**Jolly, 2007**).

III.3.3. Les conditions de vie

Malpropreté du logement, inconfort.

III.4. Evolution des mammites

L'établissement de l'infection et le déclenchement de la mammite dépendent à la fois de la virulence des microorganismes et des capacités de la défense naturelle ou induite de l'hôte. La sensibilité de la mamelle aux infections est liée à la période péripartum (colostrogénèse) et au début de lactation. A cette période, l'activité fonctionnelle des polynucléaires est limitée, la protection à lactoferrine s'affaiblit (**Rainard et Poutrel, 1989**), l'ouverture du sphincter et l'écoulement du lait peuvent favoriser la diffusion de l'infection (**Poutrel, 1984**).

L'infection peut guérir spontanément ou évoluer vers une forme plus sévère avec des signes cliniques (mammites cliniques) ou bien encore persister sous une forme inapparente (mammites subcliniques) (**Poutrel, 1985**).

Plusieurs étapes se succèdent lors du processus infectieux :

III.4.1. Phase d'invasion

Elle se déroule en deux étapes :

a) Exposition de la mamelle à l'agent pathogène

L'infection de la mamelle par voie endogène est exceptionnelle. Cependant l'excrétion de microorganismes viables dans le lait sans qu'il y ait réellement mammites, est parfois rencontrée dans certaines pathologies : brucellose, tuberculose, paratuberculose, salmonellose et chlamydiose (**Poutrel, 1985**).

En général, le processus infectieux commence par la contamination de l'extrémité du trayon surtout entre les traitees ou pendant la traite. Dans le premier cas, les facteurs tels que les logements, le climat et la litière jouent un rôle déterminant. Ils peuvent, dans des circonstances défavorables, contribuer à la multiplication des bactéries dans le milieu extérieur. Dans le deuxième cas, il a été démontré que la contamination du trayon est largement influencée par la morphologie de la mamelle et ces trayons. D'une manière générale, les mamelles pendulaires, les longs trayons et les trayons cylindriques réduisent les distances par rapport au sol et augmentent les risques de traumatismes accidentels. Or, les lésions ainsi créées constituent des réservoirs de microorganismes qui augmentent les probabilités d'infection des quartiers (**Poutrel, 1985**).

b) Pénétration des microorganismes

Les bactéries peuvent franchir le canal du trayon, d'une part par des erreurs de traite, notamment sur traite ou vide trop important qui provoque la destruction partielle de la kératine du canal du trayon en favorisant l'impact de gouttelettes de lait chargées en bactéries (**Ledu, 1985**), D'autre part, les animaux ayant les diamètres du canal les plus larges seraient plus exposés aux infections ainsi que les lésions ou les coupures profondes qui transforment les trayons en des réservoirs importants pour les microorganismes pathogènes comme *S. aureus* et les streptocoques (**Poutel, 1985**).

III.4.2. Phase d'infection

C'est le stade où les germes passent de la partie inférieure du sinus du trayon au sinus de la mamelle, aux canaux et canalicules lactifères et finalement aux acini mammaires. Les germes vont coloniser la mamelle et les enzymes et les toxines qui sont élaborées lors de leur multiplication vont d'une part entraîner des lésions du tissu sécrétoires avec pour conséquence des modifications quantitatives et qualitatives de la production, d'autre part, initier une réaction inflammatoire dans la composante principale est l'afflux de polynucléaires neutrophiles (**Poutel, 1985**).

III.4.3. Phase d'inflammation

L'inflammation est la réponse de l'organisme face aux bactéries. Rapidement, il met en fonction un ensemble de mesures bien adaptées à l'importance de l'agent agresseur, aux dommages cellulaires et tissulaires. Cette réaction inflammatoire est caractérisée par la sécrétion locale de substances immunomodulatrices (cytokines) et par l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium des alvéoles, préalable à l'afflux dans le lait de cellules phagocytaires et de diverses substances effectrices (Immunoglobulines, complément, lactoferrine,...) en provenance de la circulation sanguine (**Faroult, 2000**).

L'inflammation peut s'accompagner de signes cliniques locaux tels que la présence de grumeaux dans le lait, de quartiers durs, enflés ou douloureux, mais, le plus souvent, l'inflammation est subclinique, sans aucune anomalie directement perceptible du lait, de la mamelle ou de l'état général (**Faroult, 2000**).

III.5. Modifications liées à la mammite

Il ya des signes cliniques liés à la mammite classés en quatre catégories :

- Une simple modification de la sécrétion (diminution de production et augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait) sans signes cliniques. Dans ce premier cas, la mammite est qualifiée de sub-clinique.
- Une modification de la sécrétion accompagnée de signes clinique fonctionnels (grumeaux, sang ou caillots sanguins, pus dans le lait).
- Une modification de la sécrétion accompagne de signes locaux (gonflement, chaleur, douleur, rougeur), sans signes fonctionnels.
- Une modification de la sécrétion avec des signes cliniques fonctionnels et des signes locaux.

Dans les quatre cas, la mammite est qualifiée de mammite clinique subaigüe (**Bosquet et al., 2010**).

IV. Impact de la mammite

IV.1. Impact de la mammite sur la mamelle

En cas des mammites, il se produit une détérioration des cellules sécrétrices et une accumulation de lait dans la mamelle due à l'occlusion de certains canaux sécréteurs. Ces détériorations ont pour conséquences une diminution des synthéases et une augmentation de la perméabilité des tissus malades qui entraînent une résorption du lactose et une infiltration de sérum sanguin (**Bosquet et al., 2010**).

IV.2. Impact de la mammite sur le lait

IV.2.1. Modification chimique

Une mammite provoque un trouble de la sécrétion lactée. Plus la mammite est grave, plus la composition du lait se rapproche de celle du plasma sanguin, il ya diminution des molécules élaborées et augmentation des molécules filtrées (**Tableau II**) (**Keilling et De Wilde, 1985**).

Tableau II : Modification chimique du lait en cas de mammite composition en g/kg (Keilling et De Wilde, 1985).

	Plasma sanguin	Lait normal	Modification en cas de mammite
Lactose	0	48	Diminution
Protéine solubles	76	6,5	Augmentation
Caséines	0	27	Diminution
Lipides totaux	4,5	38,5	Diminution
Triglycérides	0,5	38	
Cholestérides	1,7	Traces	
Matièresminérales	9,3	7,5	Augmentation
Phosphore	0,1	1	
Calcium	0,1	1,2	
Sodium	3,4	1	
Potassium	0,3	1,5	
Chlore	3,5	1	
Acide citrique	traces	2	Diminution

IV.2.2. Modifications physiques

a) Aptitude à l'acidification

Le lait de mammite n'est pas un bon milieu nutritif pour certaines souches de bactéries lactiques. La forte teneur en cellules et/ou la composition chimique modifiée du lait en sont cause. L'éventualité pratique d'un ralentissement de l'acidification du lait de mélange, ralentissement qui résulterait de l'influence du lait de mammite, est moins clairement établie et aussi moins probable. Tout dépend naturellement du pourcentage de lait de mammite présent dans le mélange et du degré de modifications chimiques du lait (Coulibaly, 1986).

b). Aptitude à la coagulation du lait de mammite :

Le temps de coagulation du lait de mammite peut être prolongé, la fermeté de son caillé amoindrie et l'expulsion de son sérum influencée. Il faudrait des recherches plus

approfondies pour examiner en quelle mesure l'addition d'ions de calcium améliorerait l'aptitude à la coagulation du lait de mammite et du lait de mélange. La moindre aptitude à la coagulation d'un lait de mélange contenant du lait normal et du lait de mammite dépendra dans une large mesure du pourcentage et de la nature du lait de mammite entrant dans le mélange (**Coulibaly, 1986**).

*Matériels et
méthodes*

I. Lieu de stage

Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie 1 (**bloc 9**) de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, durant une période de 3 mois allant de (mars jusqu'au 30 mai), le but de ce travail est :

- L'isolement de Staphylocoques à partir de lait de vaches mammites.

II. Prélèvement

Les échantillons de lait de mammites qui ont servi pour l'isolement des staphylocoques sont recueillis de plusieurs régions (tableau III).

Tableau 03 : Les différentes régions où les échantillons de lait de vaches mammites ont été prélevés, et les traitements utilisés.

Echantillons	Origines	Traitement
E 01 E 02	Aokas (Bejaia)	Mammitel Colaxaciline Butylhydroxyanisol
E 03	Sidi-Aiche (Bejaia)	Mammitel Colaxaciline Butylhydroxyanisol
E 04 E 05 E 06 E 07 E 08 E 09 E 10 E 11 E 12 E 13	EPE CAZEL (Bejaia)	- Applicateur intra mammaire (multijet) : Pénicilline procaïne streptomycine sulfate Néomycine sulfate Prédnisolone - 5 grammes chaque 12 heures pendant 2 jours, plus injection de pénicilline streptomycine pendant 3 jours.

E 14 E 15 E 16	Jijel (Bejaia)	Injection par sulfamide + trimitoprine
E 17	Oued-ghir (Bejaia)	Céphalosporine
E 18, 19, 20, 21, 22	Timezrit (Bejaia)	Oxytetracycline

II.1. Méthode de prélèvement du lait de vache mammitieuse

II.1.1. Nettoyage de la mamelle

Il existe plusieurs techniques de nettoyage des trayons. Le choix se fera en fonction des problèmes rencontrés dans l'élevage, du coût, de l'état de propreté des vaches et du type de système de traite. La méthode la plus utilisée est celle des lavettes individuelles, mais, il faut respecter les règles hygiéniques et techniques pour réussir le nettoyage. Sous prétexte d'améliorer la qualité de nettoyage, les éleveurs ajoutent du savon dans l'eau de nettoyage (**Fourichon et al., 1998**).

II.1.2. Essuyage des trayons :

L'essuyage des trayons par la même lavette de nettoyage après rinçage est une pratique d'essuyage non conseillée. L'utilisation des papiers à usage unique pour l'essuyage des trayons est plus hygiénique et limite la transmission des germes entre les vaches malades et saines et entre les quartiers infectés et sains (**Fourichon et al., 1998**).

II.1.3. Elimination des premiers jets

Les premiers jets contiennent généralement une charge microbienne importante, même si la vache est saine, qui peut être un des facteurs de contamination du lait de mélange. Donc, il est indispensable de les écarter avant la traite. Cette pratique facilite la détection des cas d'infection mammaire et par conséquent l'écartement du lait des vaches mammitieuses, car ce lait peut être l'origine d'une élévation du taux cellulaire dans le lait de mélange (**Fourichon et al., 1998**).

II.1.4. Recueillir une petite quantité de lait

Après élimination des premiers jets, 10 millilitres de lait sont recueillis dans un tube en verre stérile.

II.1.5. Conservation du tube et transport

Il faut assurer la conservation du lait recueilli au froid (4°C) jusqu'à son utilisation, et le transporter a une température appropriée.

III. L'enrichissement

Généralement, on utilise le milieu de (GC) Giolliti-Cantoni, (Biokar, France), qui est un milieu d'enrichissement pour faciliter la culture des Staphylocoques. Cet enrichissement a pour but de favoriser la croissance d'une espèce en petit nombre (Guiraud et Galzy, 1980). 1ml de lait cru est mis dans 9ml de (GC + téllurite de potassium), des gouttes d'huile de paraffine sont additionnées jusqu'à constituer la couche a la surface, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h, (figure 05).

IV. L'isolement

Il s'agit de prendre une goutte d'une suspension bactérienne dans le tube préalablement enrichit à l'aide d'une anse de platine, puis l'ensemencer par stries sur une boîte de Pétri qui contient la gélose Baird Parker (Conda, Espagne). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures, (figure 05).

V. Purification

A l'aide d'une anse de platine on prend une colonie bien isolée à partir de milieu Baird Parker et l'introduit dans un tube de Bouillon nutritif, puis on incube à 37°C pendant 24h, (figure 07), après incubation on prend à l'aide d'une anse de platine une goutte à partir de la suspension dans le tube de Bouillon nutritif et on l'ensemence sur milieu Gélose nutritive puis incubé à 37°C pendant 24h, (figure 05).

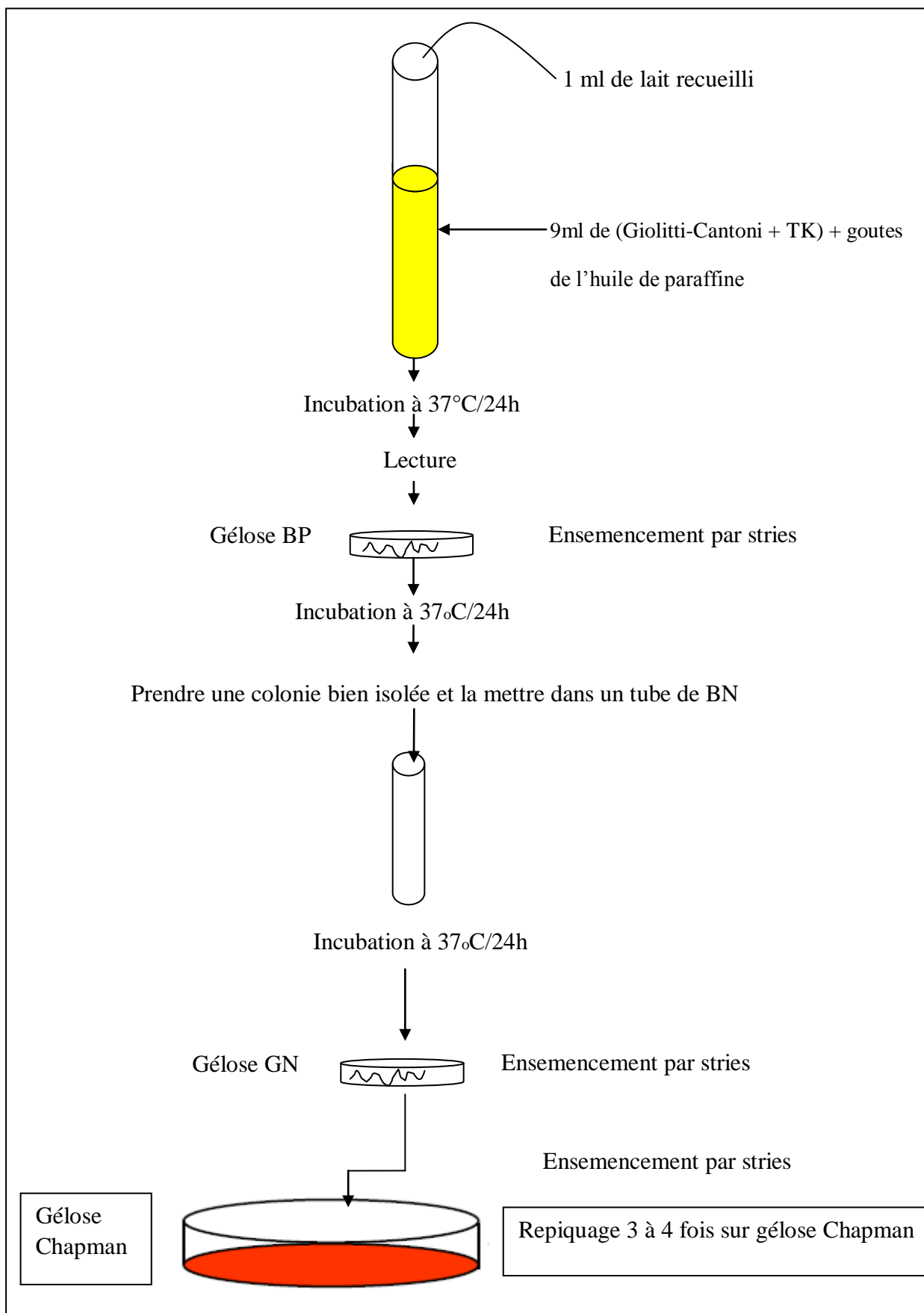


Figure 05 : Isolement et purification de *Staphylococcus aureus* à partir de lait.

VI. Vérification de la pureté des souches

Avant toute utilisation d'une souche, une vérification de sa pureté est indispensable. Après trois repiquages successifs sur les milieux gélose nutritive et Chapman, la pureté des souches est vérifiée en réalisant les tests suivants :

VI.1. Examen macroscopique

Consiste à étudier la forme, l'aspect, le contour, la surface et la couleur des colonies sur les milieux gélose nutritive et Chapman.

VI.2. Etude microscopique

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

VI.3. Test de la catalase

A partir d'un isolement, une colonie de culture bactérienne est prélevée, puis placée sur une lame. On fait réagir la colonie avec une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), (figure 06) (Garnier et Denis, 2007).

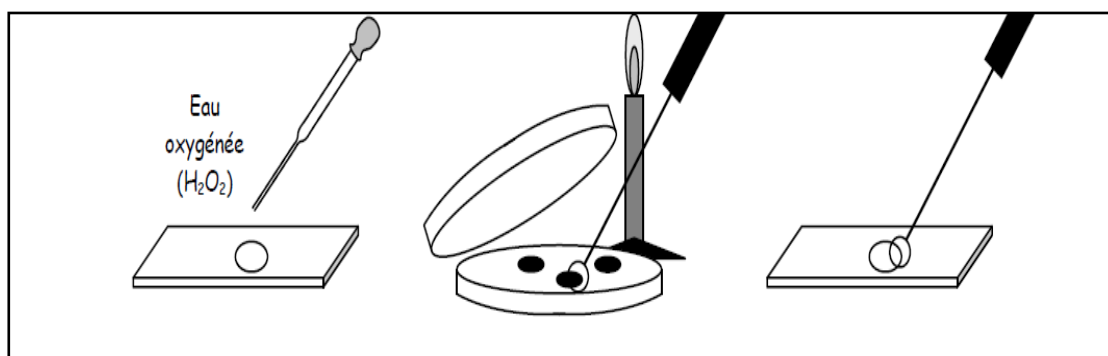
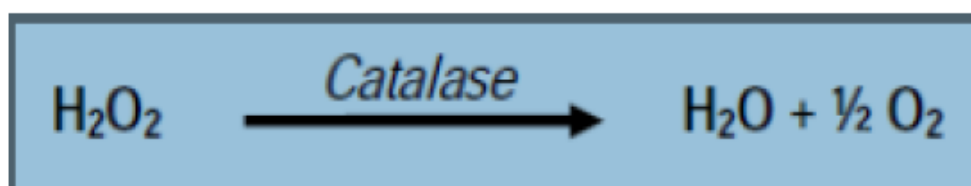


Figure 06 : Schéma du test de catalase réalisé sur une lame en verre.

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène), la réaction se fait selon l'équation :



VII. Identification (Obréa; Buttaux, 1982)

Les souches purifiées ont subit certains tests d'identification (tableau 05).

Tableau 05 : Différents tests d'identification effectués :

Test	Procédure
Test de VP et RM	<p>A partir d'une suspension bactérienne, prendre une colonie et introduire dans le tube de Clark et Lubs.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Incubation a 37°C/24 heures. - Apparition d'un trouble après incubation.
Test de VP	<p>Après l'incubation :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ajout de 3 gouttes VP1 -Et 3 gouttes de VP2 -La lecture ce fait après 10 à 15 minutes. - Un résultat positif se manifeste par le changement de couleur du milieu vers le rouge.
Test de RM	<p>Après l'incubation :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 3 gouttes de rouge de méthyle, -La lecture est immédiate. -- Un résultat positif se manifeste par le changement de couleur du milieu vers le rouge.
Test de Citrate de Simmons	<ul style="list-style-type: none"> -A partir d'une suspension bactérienne, prendre une colonie et ensemencer par stries sur la pente à l'aide d'une pipette pasteur fermée. - Incuber 24 heures à 37°C. - Un résultat positif se manifeste par le changement de couleur, du vert vers le bleu.
Test TSI (Triple sugar iron)	<ul style="list-style-type: none"> -A l'aide d'une pipette Pasteur, on prend une goutte de la suspension bactérienne et on l'introduit jusqu'à au fond du culot ensuite ensemencer en strie sur la pente.

VIII. Autres tests

Toutes les souches isolées sont repiqués sur les deux géloses Baird Parker + jaune d'œuf + TK, et la gélose Chapman.

VIII.1. Test de la coagulase

C'est une enzyme libérée dans le milieu par *S. aureus*. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *S. aureus*. Cette enzyme est capable de coaguler le plasma de lapin (**Hulya et al., 2005**).

Dans un tube à hémolyse stérile, 0,5 ml de plasma citraté et 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon BHIB sont mélangés, puis incubés à 37°C. Des lectures doivent être effectuées tout les quarts d'heures au moins pendant les cinq premières heures en cas de coagulase réversible (**Hulya et al., 2005**).

Après incubation à 37°C, les souches ayant l'aspect de *S. aureus* ont subit deux autres tests complémentaires.

VII.2. Test de la DNAase

Certaines bactéries sont capables de dégrader l'acide désoxyribonucléique inclus dans le milieu de culture grâce à la DNAse, les cultures fraîches

Ensemencer les cultures fraîches des souches de staphylococcus de 18h dans la gélose à ADN par stries, puis Incuber à l'étuve à 37°C pendant 24h (**Marshal, 1979**).

La révélation de l'activité se fait en vaporisant à la surface de la gélose une solution d'acide chlorhydrique (HCl). L'apparition d'une zone claire autour de la strie indique la présence d'une DNAse (**Guiraud et Rosec, 2004**).

*Résultats et
discussion*

I. Enrichissement

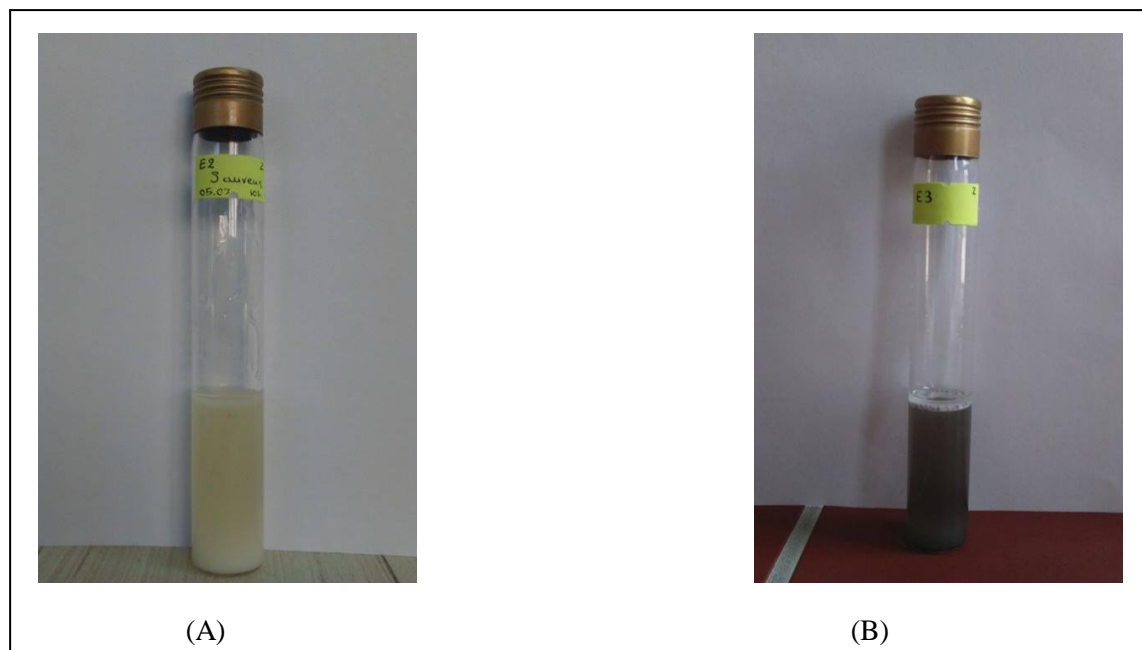


Figure 07 : Aspect sur milieu (GC + Téliurite de potassium) après incubation à 37°C pendant 24h

(A : négative) (B : positif)

21 sur un total de 22 échantillons sont positifs, avec apparition d'un noircissement du contenu du tube. Cela est dû à la réduction de téllurite en téllure par les souches de staphylocoque (95,45%), dans l'autre tube on en a conclu que cette mammite était due à des agents microbiens autre que des staphylocoques.

Une étude réalisée à Rio de Janeiro sur les mammites bovines causées par *S. aureus*, a montré que les 98 échantillons de lait collectés sont tous issus de vaches atteintes de mammites subcliniques (Coelho et al., 2009).

Une enquête menée à Jijel a permis de déceler par le test de CMT (California Mastitis Test), la présence de mammite chez 80% des vaches dans 15 exploitations, 95% de ces mammites étaient subcliniques (Rahal et al., 2009).

II. Isolement

Aspect des colonies sur milieu Baird Parker

On observe après 24 heures d'incubation à 37°C des colonies de petites tailles noirâtres entourées d'un halo d'éclaircissement d'environ 2 à 3 millimètres de diamètre, qui correspond à des souches de *S. aureus* (**Figure 08**).

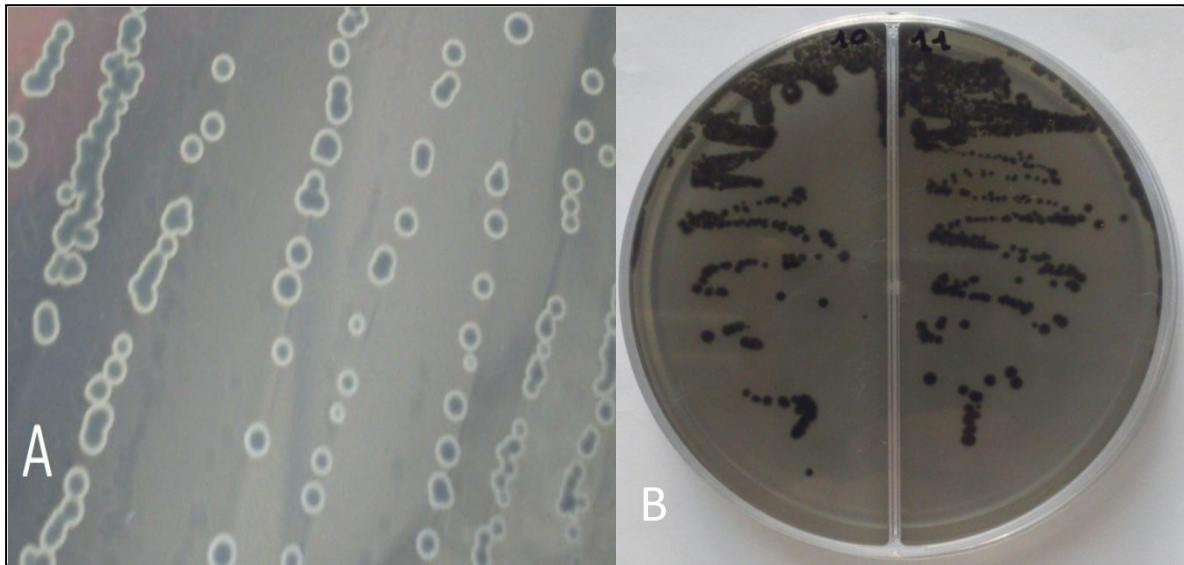


Figure 08 : Aspect des colonies sur milieu Baird Parker.

(A) colonies vu d'en haut (B) colonies vu d'en bas

Aspect des colonies sur Gélose nutritive

Après 24h d'incubation, on a observé des colonies arrondies bombées, opaque à contour nets (**Figure 09**).



Figure 09 : Aspect des colonies sur gélose nutritive.

Aspect des colonies sur milieu Chapman

Après 24h d'incubation à 37°C, on observe:

- Des colonies jaunes avec virage de la couleur du milieu, il s'agit probablement de *S. aureus*.
- Des colonies blanches sans virage de milieu, il s'agit des staphylocoques blancs (**Figure 10**).

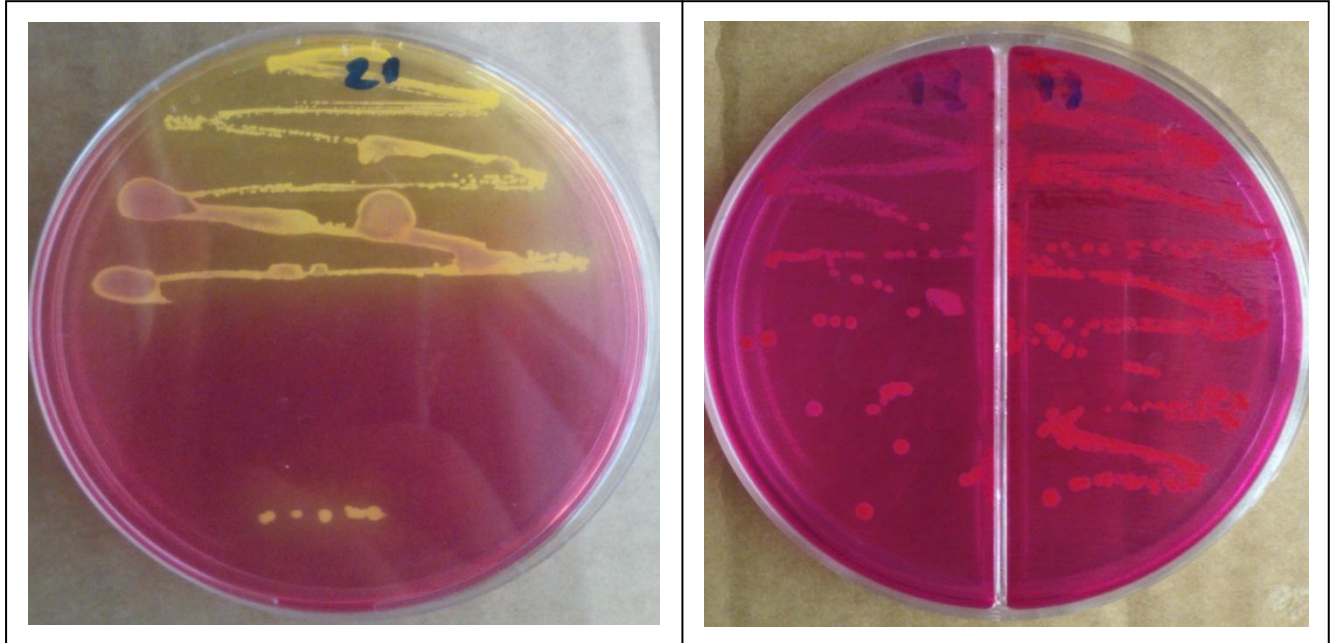


Figure 10 : Aspect des colonies sur milieu Chapman

A droite colonies jaunes, à gauche colonies blanches (Staphylocoques blanc)

Test de la catalase

Toutes les souches isolées ont subi le test de la catalase (**Figure 11**).



Figure 11 : Test de la catalase, effervescence lors de l'ajout du H₂O₂.

Toutes les souches isolées étaient à Gram positif et catalase positive.

Résultats et Discussions

Les résultats du test de la catalase est positif pour les 21 échantillons, ce qui représente un pourcentage 100%. Au cour d'une étude réaliser par (**Moslimin et al., 2017**), sur la base de 33 échantillons de mammites positifs, ont montré qu'il y avait vingt échantillons (60,6%) contenant *Staphylococcus sp.*

Coloration de Gram

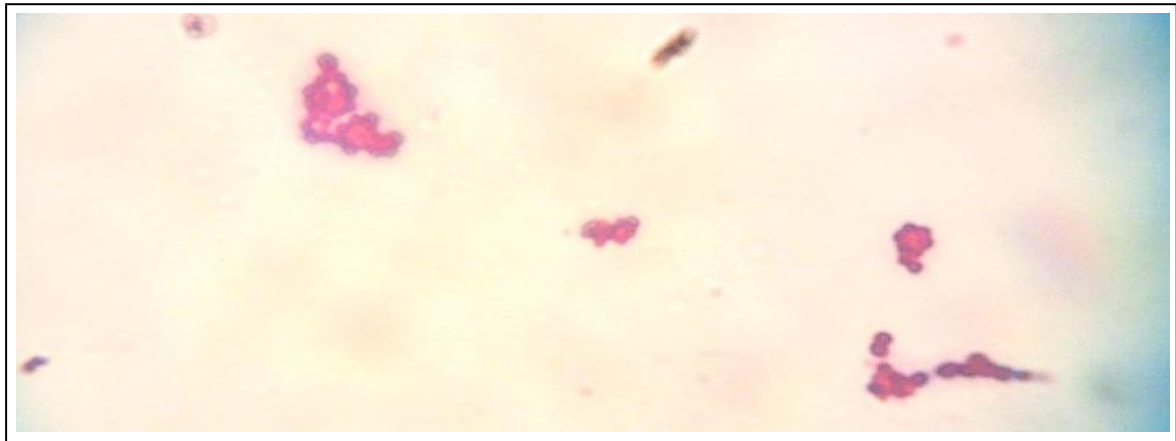


Figure 12 : Aspect d'une souche de staphylocoque observée sous microscope optique (grossissement x 100).

III. Tests d'identification les *Staphylocoques*

Les résultats obtenus sont résumé dans le tableau ci-dessous

Tableau V : Caractères biochimiques différentiels des staphylocoques

Test Echantillon	VP	RM	citrate de Simmons	coagulase	DANas e	Fermentation des sucres			H2S	CO2
						GLU	sach	Lac		
01	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
03	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
04	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
16	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
17	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
17'			-	-	+	+	+	+	-	-
18			-	-	-	-	-	-	-	-
19			-	-	+	+	+	+	-	-
20			-	+	+	+	+	+	-	+
21			-	+	+	+	+	+	-	+
22			-	+	+	+	+	+	-	+

Résultats et Discussions

Les tests d'identification ont permis de confirmer l'appartenance de 6 souches à l'espèce *S. aureus*, elles étaient toutes isolées à partir des vaches de la CAZEL atteintes de mammites subcliniques qui recevaient un traitement intra-mammaire. Sur ces échantillons de lait de vaches mammitesuses, 54,6% sont dues à *S. aureus*, 45,4% étaient dues à des staphylocoques à coagulase négative.

Dans les Pyrénées-Atlantiques (France) et le rayon de Roquefort, les cas sporadiques de mammites cliniques bovines sont principalement dus à *S. aureus*. En seconde position, on note l'importance des staphylocoques à coagulase négative (Deverriere, 2007).

Ces figures suivantes représentent le résultat du test de la coagulase et de la DNase

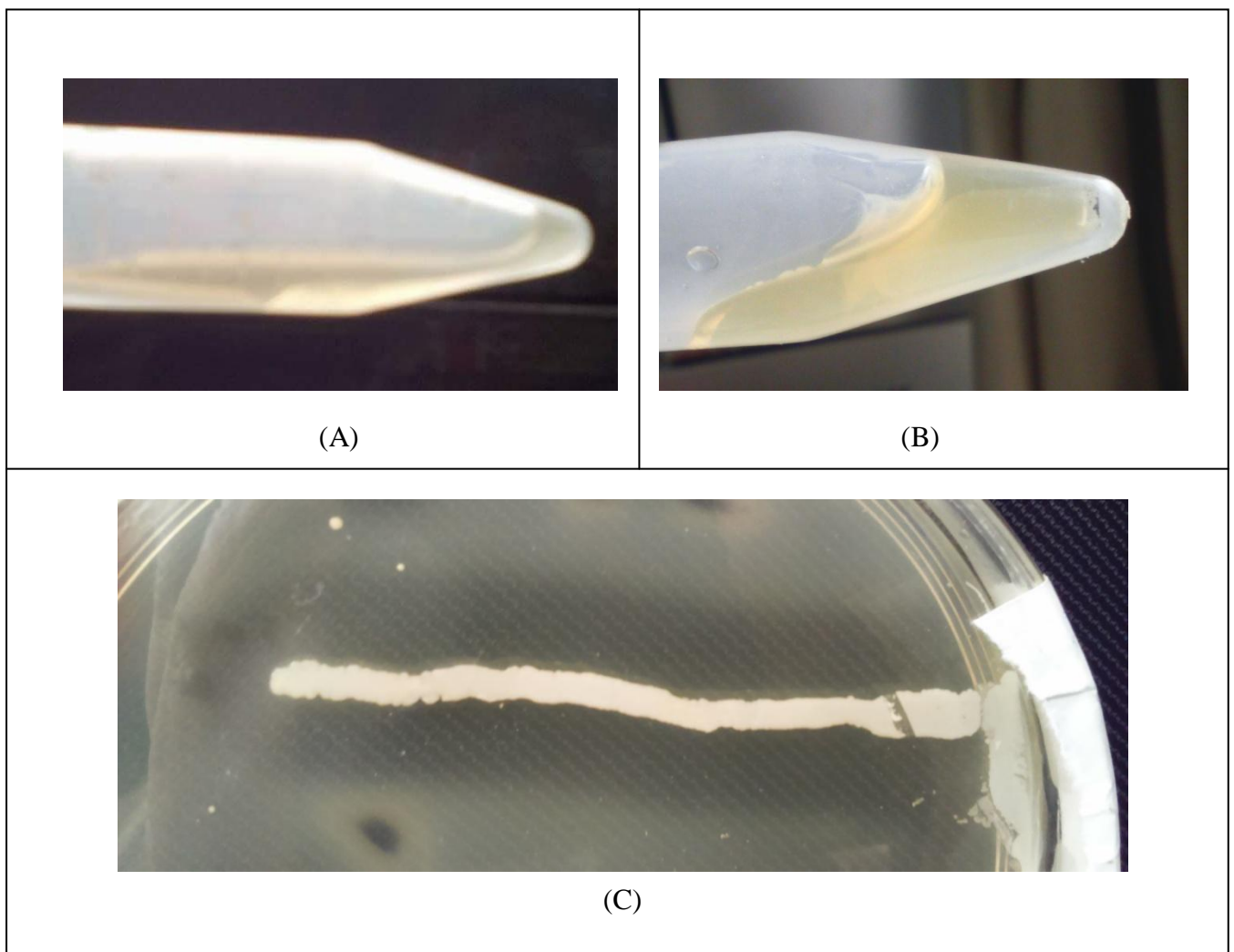


Figure 13: Résultat du test de la coagulase après 2 heures d'incubation et du test de la DNase.

(A : Résultat négatif / B: Résultat positif / C : Résultat positif de la DNase)

Après avoir suivis les tubes incubés à 37°C et cela tout les quarts d'heures, la coagulation est apparue au bout de 2h sur (6) échantillons ce qui représente (55%), tandis que les (5) autres échantillons étaient négatif (45%), même après 24h d'incubation.

Une étude réalisée à Alger, qui a porté sur 69 vaches laitières appartenant à 22 élevages distincts, a permis d'aboutir aux résultats suivants : les analyses bactériologiques des échantillons de lait ont montré la présence de coques à Gram positif, notamment des staphylocoques à coagulase positive (7%), des staphylocoques à coagulase négative (1%) et des streptocoques (7%) (**Boulbina et al., 2009**).

En plus de l'implication des mammites dans les pertes financières, il ne faut pas négliger leur incidence en santé publique. L'utilisation intensive des antibiotiques pour le traitement et la prévention des mammites constitue une menace pour la santé humaine par l'émergence de souches antibio-résistantes qui, par le biais du lait sont introduites dans la chaîne alimentaire (**Werckenthin et al., 2001**).

Statistiques

Les statistiques de la CAZEL (Complexe Agro-Zootechnique & d'Elevage) Bejaia

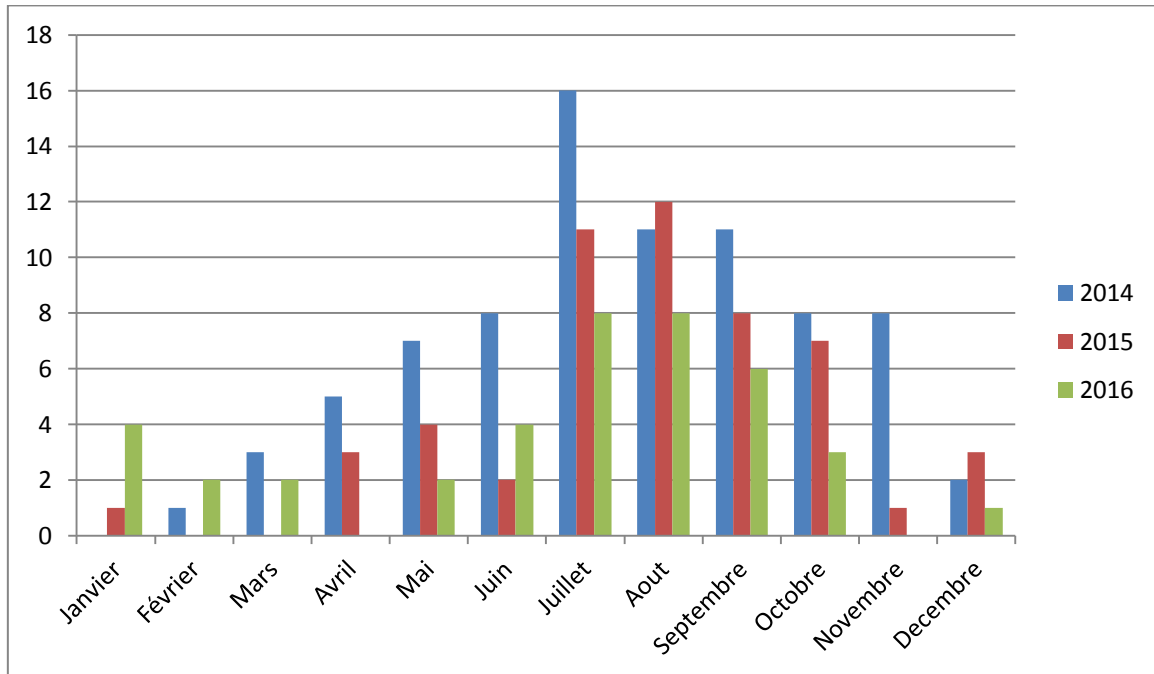


Figure 14 : statistiques des vaches mammites de la CAZEL, site : souk el tnin.

On remarque une hausse de cas de mammites à partir du mois de juin jusqu'au mois de septembre, cela est due à la chaleur d'été d'où le nom de mammites d'été. La cause de cette hausse c'est les mouches qui transportent des bactéries et qui contaminent les vaches.

Selon les données du vétérinaire de la CAZEL, 18 cas de mammites ont été enregistrés au mois de juillet 2014 ce qui est le nombre maximal jamais enregistré. Des mesures de précautions ont été prises afin de réduire les mammites d'été, les statistiques des années suivantes montrent une baisse progressive de celle-ci.

Les statistiques du Dr Maouche Toufik (Bejaia)

Selon le vétérinaire les mammites sont plus fréquentes en été qu'en hiver, car en été la transmission des bactéries est plus fréquente. Les problèmes de garde et d'alimentation sont tout aussi responsables de ce phénomène estival que le manque d'hygiène, les mouches sont aussi responsables de la hausse de transmission de pathogènes. Le vétérinaire a enregistré un ratio de 5 cas durant les mois d'été contre un ratio de 0.5 cas en hiver (1 cas chaque 2 mois).

Les statistiques du Dr Benyahia (Aamriw – Bejaia)

Le tableau suivant contient les données enregistré par le vétérinaire des cas de mammites observés depuis l'année 2015.

Tableau VI : les statistiques du Dr Benyahia sur les mammites

Date	Vaches inspectées	Vaches atteintes de mammites
2015	85	35
2016	90	30
Janvier 2017	5	2
Février 2017	6	3
Mars 2017	10	3
Avril 2017	15	7
Mai 2017	20	10

*Conclusion et
perspectives*

Au cours de ce travail, 22 échantillons de lait collectés provenant de vaches mamiteuses de plusieurs régions ont subi différents tests afin de démontrer la présence des staphylocoques. Les tests réalisés sur les 22 échantillons prélevés démontrent que 21 de ces derniers ont été positifs à l'enrichissement, dont 11 d'entre eux sont apparus sous forme de colonies jaunes sur milieu Chapman. Des tests supplémentaires ont été réalisés afin de différencier entre les différentes espèces du genre *Staphylococcus*.

Au vu des résultats obtenus, six souches sont considérées être des *S. aureus* (54.6%) tandis que les (45.4%) restantes étaient des coagulases négatives.

En conclusion, les résultats suggèrent que les vaches mamiteuses contiennent systématiquement des staphylocoques.

Le traitement et la prévention de cette infection nécessitent d'ouvrir les perspectives suivantes :

- de traiter systématiquement les mammites cliniques en respectant les règles de bases (traitement antibiotique précoce et massif)
- le traitement au tarissement qui présente, en Europe, un impératif incontournable de tout programme de lutte contre les mammites subcliniques mérite une étude plus approfondie en Algérie.

Annexes

Annexe I : Donnée bibliographiques

I. Anatomie de la mamelle

La mamelle de vache laitière est constituée de quatre quartiers séparés qui comportent chacun un trayon, ils contiennent des alvéoles glandulaires ou acini mammaires qui sont formés de lactocyte. Ces alvéoles sont entourées par un tissu parenchymateux et sont reliées à la citerne de la glande d'un volume moyen de 400 ml via les tubules et les canaux galactophores. Le lait sécrété dans une des glandes ne peut pas passer par une autre glande. Les quatre quartiers sont séparés physiquement par différentes structures dont les ligaments médians. La mamelle est irriguée par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Cinq cents litres de sang doivent circuler dans la glande mammaire pour produire un litre de lait. Lorsqu'une vache produit 60 litres de lait par jour, cela signifie que 30000 litres de sang ont circulé à travers la mamelle. Cet organe possède aussi un système lymphatique qui transporte les déchets à l'extérieur de la glande. Quelquefois, au moment d'un premier vêlage, les génisses peuvent souffrir d'œdème due en partie à la présence de lait dans la mamelle qui comprend les différents vaisseaux et bloque la lymphe dans l'organe (Bosquet *et al.*, 2010).

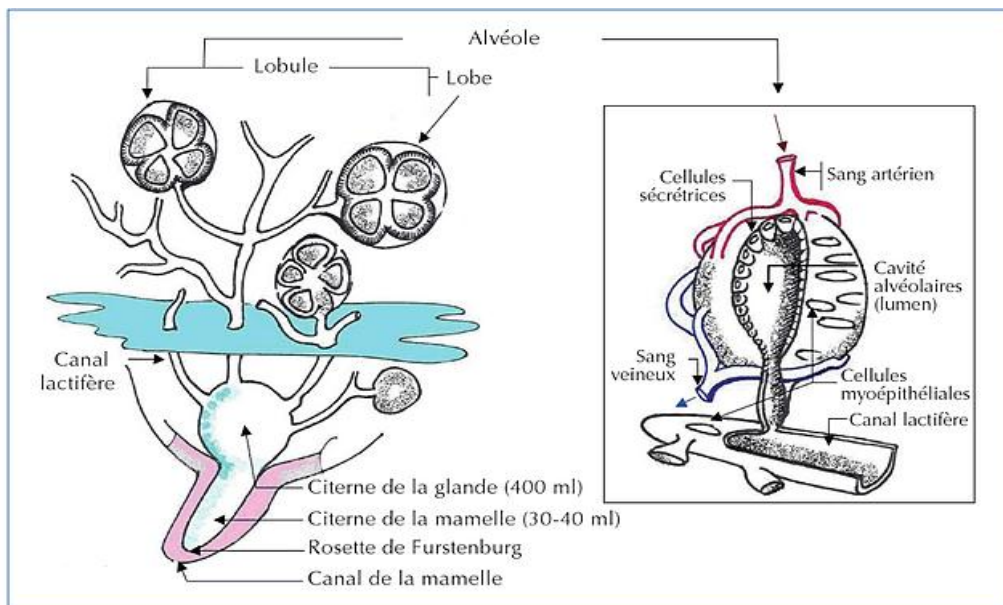


Figure 01 : Les différentes structures internes de la mamelle (Bosquet *et al.*, 2010).

II. Anatomie de trayon

Le trayon est une structure creuse, longue de 5 à 7cm, Il contient une citerne généralement remplie de lait, sa paroi est constituée d'une épaisse couche fibro-élastique mêlée de faisceaux de fibres musculaires lisses. Sa souplesse lui permet de s'adapter et de se modifier en fonction des pressions exercées par le vide dans le manchon trayeur, il est entouré d'une peau fine et glabre (sans poil), ce qui facilite son nettoyage mais la rend relativement fragile. La peau est un élément important dans le trayon, cette zone glabre constitue sa première défense, les effets barrière du canal de trayon est liée trois facteurs :

- Le sphincter est constitué par un muscle circulaire élastique forme l'orifice du trayon et empêche toute contamination.
- Les replis internes constituent la surface interne du canal du trayon qui joue un rôle mécanique en ralentissant la progression des micro-organismes.
- La kératine est une substance constituée par une couche de lipides, d'acides et de protéines qui couvrent les parois du canal du trayon. Elle a une activité antibactérienne. Car les bactéries qui pénètrent dans le canal du trayon sont adsorbées par la kératine. Pendant la traite, ces bactéries sont éliminées avec la desquamation superficielle de la kératine (**Bosquet et al., 2010**).

Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de Gentine ; il est ensuite traité pendant une minute par une solution de Lugol. Le frottis coloré subit une étape de décoloration en le traitent avec l'éthanol. Puis le rincé immédiatement à l'eau distillée. Le frottis est soumis à une coloration de 30 secondes à la fuchine, puis un bref rinçage. Le frottis est séché avec le papier absorbant et examiné à l'objectif à l'immersion (grossissement X 1000).

Annexe II : résultats

Statistiques EPE CAZEL (année 2014)	
mois	Les nombre des mammites
Janvier	10
Février	7
mars	9
avril	3
mai	13
juin	20
juillet	25
aout	18
septembre	11
octobre	8
novembre	2
Décembre	1

Statistique EPE CAZEL (année 2015)	
mois	Les nombre des mammites
Janvier	11
Février	6
mars	10
avril	2
mai	20
juin	25
juillet	23
aout	18
septembre	11
octobre	8
novembre	4
Décembre	0

Statistique EPE CAZEL (année 2016)	
mois	Les nombre des mammites
Janvier	8
Février	2
mars	7
avril	10
mai	16
juin	25
juillet	20
aout	20
septembre	14
octobre	6
novembre	4
Décembre	2

Annexe III : composition des milieux de cultures utilisés

Tableau I : Gélose Chapman (Marque : Liofichem, Pays : Italie)

Composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Peptone	10
Agar	15
D Mannitol	10
Rouge de phénol	0,025
pH7, 4	

Tableau II : Gélose nutritif (Marque : Conda, Pays : Espagne)

Composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	3
Peptone de bœuf	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15
pH7, 2	

Tableau III : Bouillon nutritive (Marque : Biokar, Pays : France)

Composition	Quantité (g/l)
Extrait de viande	3
Peptone de bœuf	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15
pH7, 2	

Tableau IV : Bouillon BHI (Institut pasteur Algérie)

Composition	Quantité (g/l)
Infusion cœur-cerveille-peptone	27,5
Chlorure de sodium	5
Phosphate disodique	2,5
D (+) Glucose	2
pH7, 4	

Tableau V : Bouillon Giolitti et Cantoni (Marque : Biokar, Pays : France)

Composition	Quantité (g/l)
Tryptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	5
Chlorure de lithium	5
Mannitol	20
Chlorure de sodium	5
Glycine	1,2
Pyruvate de sodium	3
pH6, 9	

Tableau VI : Gélose DANase

Composition	Quantité (g/l)
Trypticase	15
Chlorure de sodium	5
Phytone	5
Acide désoxyribonucleique	2
Agar	15
pH7, 4	

Tableau VI : Gélose Baird Parker (Marque : Conda , Pays : Espagne)

Composition	Quantité (g/l)
Tryptone	10
Extrait de bœuf	5
Extrait de levure	1
Chlorure de lithium	5
Tellurite de potassium	0,1
Chlorure de sodium	5
Gélose	20
Pyruvate de sodium	10
Emulsion de jaune d'oeuf	50
PH : 6,8 ± 0,3	

Références

bibliographiques

B

Badinand F. (1994). Maîtrise du taux cellulaire du lait. *Rec.Méd. Vét* : 170-427.

Biberstein, ernstl.,Jang, Spencer S., et Hirsh, Dwight C. (1984). Species distribution of coagulase-positive staphylococci in animals. *Journal of clinical microbiology*. 19 (5). 610-615.

Boulbina I, Driss W, Tazka H, Bouziane AM. (2009). Diagnostic bactériologique des mammites des vaches laitières dans quelques communes de la wilaya d'Alger (Baraki, Eucalyptus et OuledChebel), in Les maladies infectieuses des bovins. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El harrach – Alger. 40p.

Bosquet G, Gourreau J,Guiouillier G, Labbe,RemyJ, Salat O, Scmitt V et Hubert V. (2010). Les mammites. Edition : Guides france agricole. Paris : 259.

C

Coelho S.M .O, Reinoso, Elina, Pereira I.A, Soares L.C, Demo M., Bogni C, Souza M.M.S, (2009). Virulence factors and antimicrobia lresistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 374.

Coulibaly E, (1986). Les mammites subcliniques chez la vache laitieer : Essai de traitement en lactation et importance économique .Thèse de Doctorat vétérinaire . Faculté de médecine de créteil. 90p.

D

Deverriere B.V.M , (2007). Reproduction expérimentale de mammites à *Staphylococcus aureus*.

E

Elliot TR, (2001). Public Health ConcernsIn« Applied dairy microbiology » second édition. Elmer H. March, james L. Steele. Ed Mareel Dekker. New york. P : 05

Euzéby J.P. (2008). Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

F

Faroult B. (2000). Les mammites subcliniques et les mammites cliniques aiguës. *Maladies des bovins* 3eme éditions. France. 350p.

Fourichon C, Beaudreau F, Seegers H, Bareille N, (1998). Survenue et expression des mammites cliniques et subcliniques en troupeau laitier : facteurs de risque liés aux pratiques de *traite*. *Renc. Rech. Ruminants*. 347.

Fox L.R, Tadoks R,N et Gaskins C.T. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intermammary infection. *Veterinary Microbiology*. 299p.

G

Garnier F, Denis F. (2007). Bactériologie médicale : Techniques usuelles : Cocci à Gram positif. Masson. 254p.

Guiraud J, Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. ED. Usines. Paris. 239p.

J

Joly J.A.M. (2007). Le peripartum de la vache laitière : aspects zootechniques et sanitaire. Thèse de *Doctorat vétérinaire*. Faculté de médecine de Créteil. 245p.

L

Ledu J. (1985). Mammites: rôle de la machine à traite. *Rec. Méd. Vét.* 518.

Lollai L.A, Ziccheddu M, Di Mauro C, Manunta D, Nudda A, Leori G, (2008). Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens. *Small Ruminant Research*. 254.

Lowy, Franklin D, (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. 532p.

M

Matos JS, withe DG, Harmon RJ et langlois BE . (1991). Isolation of staphaurens grom sites other than lactatin g mammary . Journal of dairy science. 1554-1549

Miles H, Lesser W, Sears P, (1992). The economic implications of bioengineered mastitis control.

Moslimin lucia, Sri Rahayu, Duel hearah, Dan, (2017). detection *staphylococcus aureus* and *streptococcus agalactiae* : subclinical mastitis causes in dairy cow and dairy buffalo.

N

Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia N.C, Corrente M, Paris A, Santagad G, Firinu A, Crisetti E, Celano G.V. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. International Journal of Food Microbiology. 296p.

O

Obré A, Buttaux R. (1982). les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed Doin.482p

Osteras O, Solverod, L, Reksen, O. (2006). Milk culture results in a large Norwegiansurvey: effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *J. Dairy Sci.*89 (3):1010-1023.

P

Poutrel B. (1985). Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infection épidémiologique diagnostique méthodes de contrôle. *Rec.Méd.Vét.* 161(67), 497- 511.

R

Rahal K, Ameer A, Bouyoucef A, Kaidi R, (2009). Epidémiologie des mammites chez les bovins laitiers, dans la région de la Mitidja in Les maladies infectieuses des bovins. Ecole nationale supérieure vétérinaire d'El Harrach – Alger. 40p.

Rainard P, Poutrel B. (1989). Protection immunitaire de la glande mammaire. Biologie de lactation. Ed. I N R A. 325-338.

S

Sivaraman, Karthikeyan, Venkataraman, Nitya, et COLE, Alexander M. (2009). *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. *Future microbiology*. 999-1008.

Sutra L, Federighi M, Jouve J.L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. Polytechnica Paris, 308p.

W

Werckenthin C, Cardoso M, Schwarz S. (2001). Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particula rreference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus Intermedius* *Veterinary Research*. 32: 341-362.

Résumé

Notre étude a porté sur l'isolement des staphylocoques à partir de lait de vaches mammites. Au total 22 échantillons ont été soumis à plusieurs tests dans le but d'isoler des staphylocoques, 21 échantillons étaient positifs après l'enrichissement. Sur les milieux de cultures utilisés on a observé la croissance des souches bactériennes des 21 échantillons, sur milieu Chapman 11 colonies étaient jaunes, ces dernières ont subi des tests d'identification afin de différencier entre les différentes souches de staphylocoques présentes, les résultats d'identification ont montré la présence de celle-ci, avec une dominance des *S. aureus* (54.6%), les souches restantes (45.4%) étaient des staphylocoques à coagulase négative.

Mots clés : lait, vaches, mammites, souches, *S. aureus*, staphylocoques, tests, isolement.

Abstract

Our study focused on the isolation of staphylococci from milk from mammal cows. A total of 22 samples were tested for staphylococci, 21 samples were positive after enrichment. On the culture media used, the growth of the bacterial strains of the 21 samples was observed, on a Chapman 11 medium, colonies were yellow, the latter were subjected to identification tests in order to differentiate between the different strains of staphylococcus present, Identification showed the presence of the latter, with *S. aureus* dominance (54.6%), the remaining strains were coagulase negative staphylococci.

Key words : milk, cows, mastitis, strains, *S. aureus*, staphylococci, tests, isolation.