

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIR-Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de microbiologie
Filière: Sciences biologiques
Option: Microbiologie moléculaire et médicale



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

MASTER

Thème

**La prévalence de *Staphylocoque aureus*
et *Escherichia coli* multirésistantes
isolées de lait cru**

Présenté par:

Melle Hamtat Nabila et Melle Moghrani Razika

Soutenu le : **22 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

	Grade	
Abbassi H.	MAA	Président
Benachour K.	MAA	Encadreur
Mouici K.	MCB	Examineur

Année universitaire: 2016/2017

Remerciement

Nos sincères remerciements sont adressés premièrement à notre promotrice

Madame Benachour K. Pour son aide, ses conseils, et ses orientations. Pour sa disponibilité et sa patience avec nous.

Mes vifs remerciements sont adressés à tous les membres de jury :

Monsieur Nabti Eh.

Madame Benachour K.

Madame Mouici K.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury

Sincères reconnaissances

Dédicaces

Grace à Dieu tout clément et miséricordieux, Qui a tracé la route, et m'a donné le pouvoir et le courage de continuer jusqu'à la fin.

Avec l'aide de bon Dieux, tout puissant, j'ai pu achever ce travail que nous dédions à:

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour,

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

A mes parents pour leur amour et leur support continu.

Je vous aime

A mes frères, A mes sœurs et mes amies

A toute ma famille

Merci d'être là

A mes collègues de la promotion master 2 microbiologie moléculaire et médicale

Merci, Razika Nabila

Liste des abréviations

% : pourcentage

°C : degré Celsius

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

CMI : concentrations minimales inhibitrices

ADN : acide désoxyribose nucléique

ATB: Antibiotique

AMC : Amoxicilline

BD : Baird-Parker

BGC : Bouillon Giolitti cantoni

BHIB : Bouillon cœur-cerveau

BN : Bouillon nutritif

CIP : Ciprofloxacine

CTX : céfotaxine

E.coli : *Escherichia coli*

F.A.O : organisation mondiale pour l'alimentation et l'agriculture

FOX : Céfoxitine

G : gramme

GN : Gélose nutritive

g : gramme

h : heure

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

OMS : organisation mondiale de la santé

OXA : oxacilline

PCA : Plate count agar

pH : potentiel d'hydrogène

PLP2a : Protéine 2a liant la pénicilline

UFC : Unité(s) Formant Colonies

VA : Vancomycine

S.aureus : *staphilo-coque aureus*

Liste des figures

Figures	titre	page
Figure n°1	Observation microscopique staphylocoque après coloration de Gram	20
Figure n°2	Fréquence des souches <i>d'Staphylocoque aureus</i> résistantes aux antibiotiques	20
Figure n°3	Fréquence des souches <i>d'Escherichia coli</i> résistantes aux antibiotiques	21

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Teneurs en minéraux et en oligo-aliment de lait de vache et de chèvre en (ml /l)	04
Tableau II	Caractéristique physicochimique de lait de vaches et de chèvre	05
Tableau III	Principaux mécanisme de résistance aux antibiotique d'après sandres ; 1999	13
Tableau IV	Représentation et caractéristiques des échantillons	19
Tableau V	tableau récapitulatif des résultats des tests réalisés <i>S aureus</i>	20
Tableau VI	Tableau récapitulatif des tests réalisé sur <i>E coli</i>	21
Tableau VII	Résultats de l'antibiogramme des souches testées	22

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

I. Le lait cru.....	03
1. Définition	03
2. composition chimique.....	04
3. propriétés physico-chimiques	05
4. la flore de lait	05
4.1. la flore originelle	06
4.2. la flore de contamination	06
5. Les principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le Lait	07
5.1. le Ph	07
5.2. L'activité de l'eau.....	08
5.3. Le potentiel d'oxydoréduction (potentiel redox).....	08
5.5.. La composition en nutriments	08
5.5. les systèmes anti microbiennes.....	08
6. Dangers sur la santé publique	09
II. La résistance bactérienne aux antibiotiques	09
1. Etape de développement de résistance à grande échelle	10
2. Origine génétique de la résistance et modalité de transfert génétique	10
2.1. Résistance naturelle (intrinsèque)	10
2.2. Résistance acquise.....	11
3. Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....	12

Chapitre 2 : Matériel et Méthode

1. Conditions de prélèvement	14
2. Echantillonnage	14
3. L'identification des isolats.....	14
3.1. Coloration de gram.....	15
3.2. Tests biochimiques.....	15

A. Le type fermentaire	15
B. Milieu mannitol mobilité.....	16
C. Test de coagulase	16
D. Test de DNase	16
E. Test d'activité hémolytique.....	17
F. Dégradation de Citrate de Simmons.....	17
G. Utilisation de glucose du lactose production de gaz et d'H ₂ S	17
4. La sensibilité aux antibiotiques.....	17

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

I. Résultats de l'identification des isolats.....	20
II. résultat de sensibilité aux antibiotiques	21
III. Discussion.....	24
Conclusion	26

Références bibliographiques

Annexe

Résumé

Introduction

Introduction

L'Algérie est le pays le plus important consommateur de lait au Maghreb. La consommation nationale s'élève à environ 3 milliards de litres de lait par an, la production nationale étant limitée à 2,2 milliards de litres, dont 1,6 milliard de lait cru. Les importations Algériennes de lait en poudre ont atteint 784,90 millions de dollars, durant les cinq premiers mois de 2014, contre 487,43 millions de dollars à la même période de l'année écoulée, en hausse de 61,03%, selon les chiffres du **Centre national de l'informatique et des statistiques (Cnis) des Douanes**.

Les besoins Algériens en lait et produits laitiers sont également considérables avec une consommation moyenne de 110 litres de lait par habitant et par an. La production laitière en Algérie régulièrement croissante depuis les années 80 est très faiblement intégrée à la production industrielle des laits et dérivés (**Bencherif, 2001**).

Dans les premières heures qui suivent la traite, le lait est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées (lacténines), mais leurs action est de très courte durée (**Guiraud, 1998**). Sa composition et ses propriétés physico-chimiques en font un milieu très favorable à la multiplication des microorganismes (**Larpent, 1996**).

Plusieurs origines de contamination du lait à différents stades de sa production entrent en jeu (**Guiraud, 2003**).

La détection des bactéries coliformes et des pathogènes (*Eschérichia coli* et *Staphylococcus aureus*) dans le lait témoigne d'une contamination fécale possible (**Olson et Mocquot, 1980; Bonfoh et al. 2003**). Généralement, un lait cru provenant d'un animal en bonne santé contient une faible charge microbienne (moins de 10^3 bactéries/ ml), mais cette charge peut augmenter jusqu'à 100 fois ou plus quand le lait est abandonné à température ambiante (**Richter et al. 1992**). Toutefois, le maintien du lait dans des contenants propres et sa conservation au réfrigérateur immédiatement après la traite peuvent retarder l'augmentation de la charge microbienne initiale et éviter la multiplication des microorganismes dans le lait entre la traite à la ferme et le transport vers l'usine de transformation (**Adesiyun, 1994 ; Bonfoh et al. 2003**).

De ce fait, l'objectif de ce travail est l'évaluation de la prévalence de deux bactéries pathogènes très fréquentes dans le lait cru, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et l'étude de leur profil de résistance aux antibiotiques utilisé dans le traitement des maladies d'origine alimentaire.

Cette étude est scindée en deux parties, une synthèse bibliographique résumant les données les plus importantes sur le lait, sa microbiologie et la résistance aux antibiotiques. La deuxième partie, englobe les différentes méthodes utilisées dans ce travail et la discussion des résultats obtenus. Enfin une conclusion résumera tous les résultats enregistrés.

Chapitre 1

synthèse bibliographique

I. Le lait cru

I.1. Définition

Le lait cru désigne un lait animal brut, qui n'a pas subi de pasteurisation, de stérilisation, de thermisation, de microfiltration, d'ultrafiltration. Le lait cru n'a jamais excédé la température de 40 degrés Celsius, c'est-à-dire proche de la température du corps de l'animal.

Il est un produit de forte valeur nutritionnelle. C'est l'un des rares aliments à contenir une teneur équilibrée en nutriments de base (glucides, lipides et protéines). C'est aussi l'un des rares à convenir à toutes les tranches d'âge (nourrissons, enfants, adolescents ; adultes, personnes âgées) qui le consomment tel quel à l'état liquide (lait frais) ou sous forme de produits dérivés (fromages, yaourts, crème glacées...etc.). Avec une valeur énergétique de l'ordre de 700Kcal/l, le lait de plusieurs espèces animales constitue une source importante et relativement bon marché d'apport quotidien en acides aminés et acides gras essentiels ainsi qu'en calcium alimentaire. Le lait est aussi riche en d'autres sels minéraux (notamment phosphore et magnésium) et en vitamines du groupe B (B1, B2, B5 et B12) et en vitamine A. **(Yakhelef et al ,2010).**

Selon le congrès international de la répression et des fraudes **(1909)** :

« Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » **(Bourgeois et Larpent, 1996).**

Selon la réglementation Algérienne **(J.O.R.A., 1993)**

La dénomination « lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenue par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction et n'ayant pas été subit à un traitement thermique.

I.2. Composition chimique

En effet, le lait est un produit complexe dont la composition en glucides, protéines, sels minéraux sont remarquablement équilibrés ; par contre, il présente un déficit en fer assimilable ; et contient peu de vitamine C **(tableau I).**

Tableau I : Teneurs en minéraux et en oligo-éléments de lait de vache et de chèvre en (**Robert et al, 2002**)

Minéraux	Lait de vache (mg/litre)	Lait de chèvre (mg/litre)
Sodium	0,5	0,37
Potassium	1,5	1,55
Calcium	1,25	1,35
Magnésium	0,12	0,14
Phosphore	0,95	0,92
Chlore	1,00	2,20
Acide citrique	1,80	1,10
Oligo-éléments		
Fer	0,20-0,50	0,55
Cuivre	0,10-0,40	0,40
Zinc	3-6	3,20
Manganèse	0,010-0,030	0,06
Molybdène	0,070	-
Aluminium	0,6-1	-

Le lait de chèvre semble être plus riche en Calcium, Phosphore, Magnésium, Potassium et Chlore que le lait de vache mais moins riche en Sodium (**Jenness, 1980 ; Sawaya et al., 1984a**).

La composition chimique du lait varie sous l'effet des facteurs liés à l'animal (stade physiologique, race, niveau génétique, état sanitaire, traite) ou autres (saison, alimentation) (**Labussière, 1985**).

I.3. Propriétés physico-chimique

Le lait présente des caractéristiques liées à sa nature biologique, sa variabilité, sa complexité, son hétérogénéité et son altérabilité. C'est un liquide opaque de couleur blanche, plus au moins jaunâtre (**tableau II**).

Tableau II: caractéristiques physicochimiques du lait de vache et de chèvre (Mezine, 2008).

Composition	Lait de vache	Lait de chèvre
Energie	705	600-750
Densité de lait entier à 20°C	1.028 – 1.033	1.027 – 1.035
Point de congélation (C°)	-0.520 -0.550	-0.550 – 0.583
Ph-20 °C	6.60 – 6.80	6.45 – 6.60
Acidité titrable (°Dorni)	15 – 17	14 – 18
Tension superficielle de lait entier à 15°C (dynes cm)	50	52
Conductivité électrique à 25°C (siemens)	45 x 10 ⁻⁴	43-56 x 10 ⁻⁴
Indice de réfraction	1,45-1,46	1,35-1,46
Viscosité du lait entier à 20°C (centipoises)	2,0-2,2	1,8-1,9

I.4. La flore du lait

Le lait constitue une source nutritive importante. Sa consommation est indispensable pour le nourrisson mais également pour l'adulte, d'où la nécessité de le fournir à une bonne qualité.

- Du point de vue hygiénique : il doit être sain, dépourvu de germes pathogènes.
- Du point de vue technologique : il doit avoir une microflore banale aussi réduite que possible, surtout ce qui concerne les groupes habituels acidifiants producteurs de gaz (Alais, 1984).

Le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne. Il comporte une flore originelle et une flore de contamination.

I.4.1. Flore originelle

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 5000 Bactéries/ml et moins de 1 coliforme/ml). Il s'agit essentiellement de germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles (**Larpen** ,1997).

Le lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées « **lactinines** » mais leur action est de très courte durée (une heure environ). D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade. Ils sont généralement pathogènes et dangereux, du point de vue sanitaire. Il s'agit des agents de la mammite qui sont dus à des infections par *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Echerichia coli*, *Streptococcus uberis* (**Larpen** ,1997).

Il peut s'agir aussi de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en l'absence d'anomalies du pis : *Salmonella*, *Brucella* (agent de fièvre de malt) et exceptionnellement *Listeria monocytogenes* (agent de Listériose), *Mycobacterium* (agent de tuberculose), *Bacillus anthracis* (agent de charbon), et quelques virus (**Guiraud** , 2003).

I.4.2. Flore de contamination

Selon **Guiraud** (2003) ; Le lait peut se contaminer par des apports microbiens d'origines diverses :

- Fèces et téguments de l'animal : *Coliforme*, *Entérocoque*, *Clostridium*, et éventuellement les Entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) etc.
- Sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques.
- Air et eau : flore diverse dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées.
- Aliments : flore banale variée, en particulier les Lactobacilles, *Clostridium butyrique*.
- Equipement de travail et de stockage du lait : les *Microcoques*, les levures, la flore lactique avec les *Lactobacilles*, *Streptocoques*.
- Manipulateurs : Staphylocoques, dans le cas de traite manuelle, mais aussi des germes provenant d'expectoration et de contamination fécale etc.
- Vecteurs divers : insectes.

I.5. Les principaux facteurs qui affectent le développement des germes dans le lait

Une fois dans le lait, un micro-organisme doit composer avec l'écosystème dans lequel il se trouve, c'est-à-dire avec le milieu et les facteurs qui lui sont propres (pH, composition en nutriments, potentiel redox, disponibilité de l'eau...) ainsi qu'avec les autres micro-organismes présents simultanément avec qui il va interagir de façon positive ou négative. Or, les micro-organismes ont des exigences nutritionnelles et physiologiques ainsi que des niches écologiques qui leurs sont propres. Au sein de chaque groupe, il existe des spécificités liées au genre, à l'espèce, à la sous-espèce, ou encore à la souche concernée. Un équilibre va alors s'établir entre micro-organismes et avec le milieu, équilibre que les facteurs environnants (température en particulier) vont pouvoir également venir modifier (**Callon et al, 2011**).

Parmi les différents facteurs susceptibles d'intervenir, celui dont l'action est la plus évidente et la plus facile à mesurer est la température de conservation du lait. Si une basse température de conservation permettra de stabiliser le niveau des micro-organismes pris dans leur ensemble, elle pourra cependant être à l'origine de modifications dans l'équilibre des différentes flores microbiennes. En effet, tous les micro-organismes ne réagissent pas de la même façon à la température. Certains voient leur croissance stoppée très vite par un faible abaissement de la température, alors que pour d'autres la croissance ne sera que ralentie, même par une diminution importante de la température (**Callon et al, 2011**).

Cinq groupes peuvent être distingués selon les exigences vis-à-vis de la température : les psychrophiles, les psychrotrophes, les mésophiles, les thermophiles et les hyperthermophiles. Les groupes les plus rencontrés dans le lait sont les mésophiles (bactéries lactiques comme les lactocoques), les germes psychrotrophes comme beaucoup de *Pseudomonas* (proches des mésophiles pour la température optimale, mais peuvent se développer à basse température) et, dans une moindre mesure, les thermophiles (ex : *Bacillus stearothermophilus*) (**Callon et al, 2011**).

I.5. 1. Le pH

La grande majorité des bactéries et champignons ont la capacité de se développer à un pH proche de la neutralité, correspondant à celui du lait ou à celui trouvé à la surface de fromages à croûte lavée par exemple (pH 6,5 à 7). Cependant, les champignons et diverses bactéries lactiques se développent mieux à pH plus bas, ce qui leur confère un avantage au cours des premières étapes de la transformation fromagère lors de l'acidification (pH 4,3-5,5) ou dans les

fromages à pâte fraîche (pH 4,3-4,5), alors que la croissance et l'activité d'autres micro-organismes sont stoppées ou ralenties (**Callon et al, 2011**).

I.5. 2. L'activité de l'eau (aw)

Elle correspond à la quantité d'eau libre dans un milieu, et donc disponible pour le développement des micro-organismes. La valeur théorique de l'aw peut varier de 0 (milieu totalement sec) à 1 (eau pure). Tous les micro-organismes n'ont pas les mêmes exigences vis-à-vis de l'aw (rôle par exemple en début d'affinage des fromages). Lorsque les valeurs sont supérieures à 0,95 (cas des pâtes fraîches, des pâtes molles et de certaines pâtes pressées), l'aw a peu d'effet sur les micro-organismes. En dessous de 0,91 (cas des fromages à pâte dure), la plupart des bactéries voient leur croissance inhibée (**Callon et al, 2011**).

I.5.3. Le potentiel d'oxydoréduction (potentiel redox)

Il résulte d'un équilibre déterminé par la présence dans le lait de réducteurs et d'oxydants et peut influencer le développement des microorganismes selon leur besoin en oxygène : aérobies stricts (oxygène indispensable, ex : *Pseudomonas*, moisissures), microaérophiles (faible taux d'oxygène requis, ex : *Lactobacillus*, *Streptococcus*), aéroanaérobies facultatifs ou aéro-tolérants (oxygène facultatif, ex : coliformes, staphylocoques), anaérobies stricts (oxygène toxique, ex : *Clostridium*). Ainsi certains micro-organismes se développeront mieux (voire uniquement) à la surface des fromages (en contact avec l'oxygène, comme beaucoup de bactéries corynéformes) qu'au cœur, alors que d'autres auront un comportement inverse (exemple : bactéries propénoïques) (**Callon et al, 2011**).

I.5.4. La composition en nutriments

Le lait est composé de lactose, d'une grande variété de vitamines, minéraux, acides aminés, protéines, matières grasses... disponibles pour le développement des micro-organismes mais dont la nature et les concentrations peuvent varier dans le temps et en fonction des pratiques d'élevage. Les micro-organismes qui possèdent les systèmes adéquats pour utiliser ces composés seront avantagés par rapport aux autres (**Callon et al, 2011**).

I.5.5. Les systèmes antimicrobiens

Dans le lait, des systèmes inhibiteurs, naturels ou non, peuvent agir sur les micro-organismes. Certains sont liés à la composition physicochimique du lait (lactoferrine, acides gras libres, système lactoperoxydase-thiocyanate-péroxyde d'hydrogène) ou à l'état

immunitaire de l'animal (anticorps, cellules). D'autres sont des bactériocines, substances produites par certains germes qui vont inhiber, spécifiquement ou pas, d'autres germes. Des inhibiteurs, liés à des pratiques à proscrire peuvent aussi être présents (antibiotiques, résidus de produits de nettoyage/ désinfection) (Callon et al, 2011).

I.6. Dangers sur la santé publique

Le lait cru ne sera pas exempt des bactéries infectieuses qui viennent de l'animal qui l'a produit ou des conditions d'entreposage ou de transport insalubres. Cela justifie donc les efforts des éleveurs et des laiteries pour améliorer sans cesse l'hygiène dans leur mode de production (Bounous et al, 1991).

En termes de santé publique, comme la listériose est la troisième infection néonatale après les infections à *Escherichia coli* et *Streptococcus*, il convient de respecter scrupuleusement les normes européennes de commercialisation du lait, ceci étant possible grâce aux techniques de réfrigération, et aux pratiques de suivi sanitaire des troupeaux (Joue, 2005).

Le lait cru mal conservé, porteur des germes ci-dessus (en particulier de *Listeria* et aussi de germes de zoonoses) était une grande cause de mortalité infantile dans les villes au XIX^e siècle. La pasteurisation a permis le transport et la conservation du lait dans des conditions sanitaires acceptables (Taylor et Francis, 1973).

Les zoonoses comme la brucellose, la tuberculose, le typhus et la listériose étaient des maladies présentes de manière endémique dans les cheptels jusqu'au milieu du XX^e siècle (Andreoletti, 2015).

En 2015, l'EFSA a publié une étude sur l'évaluation du risque posé par la consommation de lait cru qui concluait que les risques d'infection étaient importants mais que les cas réels étaient relativement peu nombreux, bien que les statistiques ne soient pas complètes. Les microbes en cause sont essentiellement *Campylobacter*, *Salmonella (typhus)*, *Escherichia coli (STEC)* et le virus de l'encéphalite (TBEV). L'étude n'est pas parvenue à mettre en évidence une étape spécifique de contamination susceptible d'amélioration (Andreoletti, 2015).

II. La résistance bactérienne aux antibiotiques

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. Les CMI ciblées pour une sensibilité intermédiaire ou une résistance microbiologique pour chaque espèce de bactéries et pour chacun des antibiotiques sont

déterminées par un laboratoire indépendant, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) et mises à jour régulièrement (**Avron et al. 2001**).

En fait, une souche est dite résistante lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre *in vivo* à la suite d'un traitement. Parfois, la résistance à un antibiotique confère de la résistance à un autre antibiotique, et c'est ce que l'on appelle la résistance croisée (**Jones et al. 2001**).

Les bactéries sont dites multirésistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelles et acquises, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Elles sont alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques (**Ahmed et al, 1999**).

II.1.Étapes du développement de résistance à grande échelle

Les bactéries développent de la résistance à la suite d'une exposition aux antibiotiques. La résistance antibiotique se développe à grande échelle selon les étapes suivantes : sélection d'organismes résistants, élimination de la flore normale sensible au médicament et colonisation avec ces micro-organismes résistants, contact d'une personne à l'autre et transmission dans l'environnement puis finalement la transmission globale (**Murthy et al, 2001**).

II.2.Origine génétique de la résistance et modalités de transfert génétique

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique). Résistance peut être soit naturelle, soit acquise (**Lewis et al., 2000**).

II.2.1.Résistance naturelle (ou intrinsèque)

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à une faible affinité de la cible pour l'antibiotique ou encore à l'absence de la cible. Par exemple, la résistance des entérobactéries et du *Pseudomonas* aux macrolides ou des bactéries à gram négatif à la vancomycine est naturelle (**Mandell et al, 2000**).

La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale) lors de la division cellulaire, mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (**Yamashita et al., 2000**).

II.2.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer de la résistance à un antibiotique préalablement sensible, ce qui implique des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable. Ces changements peuvent être de deux types : soit une mutation spontanée, soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme (**Mandell et al, 2000**)

- *Mutation chromosomique spontanée* (évolution verticale)

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20 % des bactéries. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action (**Yamashita et al, 2000**).

L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la Résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte toujours d'une mutation (**Yamashita et al, 2000**).

- *Acquisition de gènes de Résistance par un autre organisme* (évolution horizontale)

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à gram positif qu'à gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles du chromosome, tels les plasmides. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes. Le transfert d'un seul plasmide augmente aussi le risque d'une résistance à plusieurs médicaments. Par exemple, le *Shigella*, responsable de la diarrhée, peut transférer un plasmide avec résistance à quatre ou cinq antibiotiques différents (**Lewis et al, 2000**).

Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison. La *transformation* permet l'acquisition et l'incorporation d'ADN libre dans l'environnement (dénude) à la suite de la mort de la bactérie mère. (Exemple : le gonocoque résistant à la pénicilline). La *transduction* est un mécanisme de transfert de gènes, dont le vecteur est un virus bactérien appelé bactériophage. Ce mécanisme permet le transfert d'information génétique entre bactéries appartenant essentiellement à la même espèce. Les plasmides sont souvent transférés par conjugaison. La *conjugaison* est un processus au cours duquel l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par un mécanisme complexe nécessitant un étroit contact cellulaire et responsable en grande partie de l'émergence d'une résistance chez les bactéries pathogènes (Mandell et al, 2000).

En pareil cas, la résistance se transmet aux bactéries filles. Les bactéries ayant reçu cet élément mobile peuvent se rétablir et redevenir sensibles aux antibiotiques si elles ne sont pas exposées à ces derniers (Yamashita et al, 2000).

II.3.Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Tableau-3: Principaux mécanismes de résistances aux antibiotiques (Sanders, 1999).

Antibiotiques	Mécanismes de la résistance
Bétalactamines	<ul style="list-style-type: none">-Modification de la cible (Penicillin Binding Protein)-Altération du système d'efflux-Hydrolyse du cycle bêtalactame-Système d'efflux actif
Tétracyclines	<ul style="list-style-type: none">-Protection du ribosome-Altération du système d'efflux-Inactivation par une enzyme oxygène tétracycline dépendante-Système d'efflux actif
Chloramphénicol	<ul style="list-style-type: none">-Altération du système d'efflux-Inactivation par des acétyl-transférases-Système d'efflux actif

Macrolides, Lincosamides	-Activation d'une méthylase modifiant le site d'action ribosomal -Mutation modifiant le site d'action ribosomal -Système d'efflux actif -Dégradation enzymatique de l'antibiotique
Aminoglycosides	-Mutation modifiant les sites d'action du ribosome -Modification enzymatique de l'ARNr 16S -Altération du système d'efflux -Dégradation enzymatique de l'antibiotique
Fluoroquinolones	-Mutation modifiant le site d'action sur la topoisomérase -Altération du système d'efflux -Système d'efflux actif
Glycopeptides	-Modification de la cible dans la structure de la paroi bactérienne -Séquestration de l'antibiotique dans la paroi bactérienne
Sulfamides, Triméthoprim	-Surproduction de la cible de l'antibiotique -Modification du métabolisme

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

La présente étude a été réalisée au niveau du Laboratoire de Microbiologie générale de l'université de Béjaia durant la période allant du 05 février au 30 mai 2017.

Notre travail a porté sur l'étude du profile de résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes isolées de lait cru.

1. Les conditions du prélèvement

Les règles suivantes sont prises en considération :

- Lavage des mains et la mamelle de l'animal avant la traite.
- Réserver une tenue propre pour la traite.
- Eliminer le premier jet de chaque traite.

Une procédure rigoureusement aseptique doit être suivie pour le prélèvement d'échantillons de lait afin d'éviter la contamination de la mamelle par les nombreux microorganismes présents aussi bien sur la peau des flancs, du pis et des trayons de la vache, que sur les mains du préleveur et dans l'étable. Les étapes citées visent à réduire le risque de contamination lors du prélèvement d'échantillons.

2. Echantillonnage

Un total de trente échantillons de lait cru ont été prélevés sur 12 vaches et 18 chèvres dans deux régions différentes Bejaia et Sétif . Pour chaque échantillon, une quantité entre un demi-litre et un litre a été prélevé dans une bouteille en plastique préalablement nettoyée et séchée. Les bouteilles étaient placées immédiatement dans le réfrigérateur pendant une nuit et transportées vers le laboratoire. Les durées de transport ont varié de 2 à 3 heures selon l'éloignement des lieux de prélèvement.

Afin de tenir compte des conditions réelles de terrain, aucun conservateur n'a été rajouté, d'autant plus que des analyses microbiologiques ont également été réalisées après la mesure de pH de chaque échantillon.

3. Identification des isolats

La recherche de souches de *Staphylococcus aureus* a été précédée par une étape d'enrichissement qui consiste à l'ensemencement d'1 ml de chaque échantillon de lait

cru dans 9 ml du bouillon Giolitti Cantoni auquel est ajouté un additif (tellurite de potassium) puis l'ensemble est incubé pendant 24 H à 37°C.

La présence de *Staphylococcus aureus* est révélée par la présence d'un noircissement au niveau du tube ensemencé.

L'isolement d'*Escherichia coli* est réalisé directement, en ensemencant un ml de lait cru à la surface ou en masse en utilisant la gélose EMB et l'incubation est effectuée à 44 °C pendant 24 heures. La présence de cette bactérie est révélée par l'observation d'un éclat métallique au niveau des colonies obtenues. Des repiquages successifs permettent d'obtenir des cultures pures.

Des réisolements jusqu'à l'obtention d'une culture pure sont effectués sur gélose nutritive ou gélose Chapman.

Après obtention d'une culture pure, on examine l'aspect des colonies

3.1. Coloration de Gram

Un frottis de colonie à tester fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au violet de gentiane et rincé rapidement à l'eau courante, traité pendant une minute par une solution de Lugol, de nouveau rincé rapidement. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. À ce stade les cellules gram- seront incolores, les cellules gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fushine pour colorer les cellules gram- présentes. Après un bref rinçage, on sèche le frottis ; on l'examine à l'objectif à immersion (grossissement X 1000) (Singleton, 1999).

3.2. Test biochimique

A. Type fermentaire

Dans des tubes à essai nous avons versé un milieu bouillon nutritif et entreposé des cloches de Durham pour mettre en évidence la production de gaz. Ensuite on a ensemencé les souches. Les souches homofermentaires vont produire 90% d'acide lactique et seulement 10% de CO₂, par contre les souches hétérofermentaires vont produire l'acide lactique et le CO₂ à proportions égales (Carr et al. 2002).

B. Test de la Mannitol-mobilité

Le mannitol est un produit de réduction du D-mannose. Milieu mannitol-mobilité permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, et incubé à 37°C pendant 18 à 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (**Marchal et al, 1991**).

C. Test de la Coagulase

Ce test consiste à rechercher la Staphylocoagulase responsable de la coagulation du plasma. Cette enzyme active la prothrombine et la transforme en thrombine, qui à son tour, transforme le fibrinogène en fibrine. Pour cela, nous avons réalisé des cultures dans des tubes de bouillon cœur cerveau (B.H.I.B) puis Incubé les tubes à 37°C pendant 18 heures et nous avons mélangé dans des tube à hémolyse 0,5 ml de plasma humain et 0,5 ml de la culture fraîche sur le bouillon cœur cervelle et nous avons par suite Incubé le mélange à 37°C pendant 24 heures. La lecture doit être effectuée après 30 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures.

Un résultat positif se traduit par la prise en masse du plasma humaine dans le tube à hémolyse (**Avril et al. 1992**).

D. Test de la DNase

Nous avons procédé comme suit ; nous avons ensemencé des boites de gélose d'ADN par une strie courte des souches à identifier avec deux souches témoins (négatif et positif).Après Incubation à 37 °C/24 heures, nous avons aspergé les boites de Pétri avec une solution d'Hcl (5%).

L'acide chlorhydrique précipite l'ADN polymérisé et opacifie le milieu. La dégradation de l'ADN se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la zone de croissance (**Kateete et al.2010**).

E. Test de l'activité hémolytique

Sur le milieu gélose au sang de base additionné de 1ml de sang Humain, les différentes souches sont ensemencées par strie. Les boîtes sont incubées 24 à 48h. Un résultat positif est exprimé par une couleur verdâtre au tour de la strie (**Ventosa et al. 2009**).

F. Dégradation de Citrate de Simmons

Ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone: le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu. La pente du milieu est ensemencée selon une strie longitudinale et incubé à 37°C pendant 5 jours.

- Citrate-positif : culture avec alcalinisation du milieu (virage de l'indicateur au bleu).
- Citrate-négative : pas de culture (le milieu reste vert) (**Marchal et al, 1991**).

G. Utilisation de glucose, du lactose et production de gaz et d'H₂S (gélose TSI)

Nous avons ensemencé la pente de la gélose par stries serrées, après le culot par piqure profonde et centrale et nous avons incubé à 37°C /24h.

- **Fermentation du lactose +** : virage au jaune de la pente ;
- **Fermentation du glucose +** : virage au jaune au fond du tube ;
- **Fermentation du saccharose+** : virage au jaune au milieu de tube
- **Production de gaz** : apparition de bulles ou d'une poche gazeuse qui décale la gélose du tube ;
- **Production d'H₂S** : noircissement du milieu (**Avril et al. 1992**).

4. La sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches est évaluée par la méthode d'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton selon les recommandations du Comité Française de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (CA-SFM) (**Jehl et al. 2000**).

Dans les 15 minutes suivant nous avons trempé un écouvillon dans cette suspension et nous avons pressé fermement contre la paroi du tube.

- les boîtes sontensemencées par écouvillonnage à trois reprises sur la surface entière de la gélose Miller Hinton, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum.

- nous avons appliqué les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri dès que possible à moins de 15 minutes après l'ensemencement à l'aide d'une pince stérile.

- nous avons Incubé les boîtes à 37°C pendant 18 heures.

Nous avons mesuré les diamètres de chaque zone d'inhibition en mm, et nous avons classé les bactéries dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante (**Annexe2**).

Chapitre 3

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

Lors de cette étude nous avons identifié les souches isolées de lait cru par des procédures conventionnelles basées sur les tests morphologiques physiologiques et biochimiques. En somme, 30 échantillons ont été réalisés, 12 de lait de vache et 18 de chèvres dont 18 provenant de la région de Bejaia et 12 du Sétif. La description d'origines de ces échantillons est résumée dans le tableau IV.

Tableau IV: Représentation et caractéristiques des échantillons

Région	Animal de traite	pH	Région	Animal de traite	pH
Souk elthenine	chèvre	6,81	Alkesser	chèvre	6,84
Bousslam	vache	6,76	Adekkar	chèvre	6,92
Bousslam	chèvre	6,90	Akbou	chèvre	6,76
Faraoun	chèvre	6,84	Tizi bechar	vache	6,88
Berbacha	chèvre	6,79	Alma	chèvre	6,79
Amizour	chèvre	6,84	Alma	vache	6,79
Sidi alilbehar	vache	6,62	Bougaa	vache	6,81
Tichy	vache	6,71	Bougaa	chèvre	6,79
Aokas	vache	6,88	Ain azal	vache	6,85
Takliat	chèvre	6,91	Ain rnat	chèvre	6,65
Tizi	chèvre	6,75	Amoucha	chèvre	6,72
Taghezouth	chèvre	6,87	Beni mouhli	vache	6,61
Toudja	vache	6,87	Beni mouhli	chèvre	6,87
Oued ghir	vache	6,65	Beni ourtilane	chèvre	6,90
Berchiche	chèvre	6,70	Bouandas	vache	6,62

La mesure du pH des différents échantillons a révélé des valeurs comprises entre 6,61 et 6,92. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres études (Alais, 1984).

I. Identification des souches

Sur les 30 prélèvements effectués on a édentifié 15 de *staphylococcus aureus* et 07 de *Escherichia coli*. Leur identification a été faite en se basant sur les caractères cultureux (forme, couleur et taille) ainsi que sur la base des caractères biochimiques (Tableaux V et VI).

Tableau V : tableau récapitulatif des résultats des tests réalisés pour *S. aureus*

Code de la souche	Mannitol	Mobilité	Production de gaz	Coagulation de plasma	DNase	CO2	Activité hémolytique
S-01	-	-	-	-	-	-	+
S-02	+	-	-	-	+	-	+
S-04	++	++	+++	+	+	+	+
S-05	++	++	-	+	+	-	+
S-06	+	+	-	+	+	-	-
S-07	-	-	-	-	+	-	+
S-11	-	-	-	-	-	-	+
S-12	-	-	-	-	-	-	-
S-13	+	+	-	-	+	-	+
S-15	++	++	-	+	+	+	+
S-18	+	+	-	+	+	+	+
S-19	+	+	-	+	+	+	-
S-20	++	++	-	+	+	-	+
S-21	+	+	-	-	-	+	+
S-22	+	+	-	-	-	-	-

+ : résultat positif ++ : résultat positif forte - : résultat négatif

Tableau VI: tableau récapitulatif des tests réalisés pour *E.coli*

Souche	Production de co2	Citrate de simmons	lactose	Glucose	Gaz	H2S
E-01	+	-	+	+	+	+
E-07	+	+	+	+	+	+
E-08	-	+	-	-	-	-
E-09	-	+	-	-	-	-
E-14	-	+	-	-	-	-
E-16	+	+	+	+	+	+
E-20	-	-	-	-	-	-

+ : résultat positif

- : résultat négatif

II. Résultats de sensibilité aux antibiotiques

Nous avons testés la sensibilité des 15 souches de *Staphylococcus aureus* et 07 souches d'*Escherichia coli* vis-à-vis de six antibiotiques de différentes familles par la méthode de l'antibiogramme standard (**Tableau VII**).

Tableau VII: résultats de l'antibiogramme des souches testées

Souche	FOX		VA		OXA		CIP		CTX		AMC	
S-01	06	R	22	S	20	S	16	R	19	R	24	S
S-02	08	R	12	I	14	R	28	S	26	S	18	R
S-04	0	R	12	I	14	R	28	S	/	/	26	S
S-05	0	R	0	R	0	R	32	S	28	S	08	R
S-06	0	R	23	S	0	R	41	S	/	/	16	R
S-07	04	R	17	S	17	R	28	S	/	/	06	R
S-11	0	R	22	S	14	R	/	/	/	/	38	S
S-12	0	R	19	S	16	R	28	S	/	/	12	R
S-13	0	R	0	R	0	R	34	R	23	R	22	I
S-15	0	R	16	I	09	R	20	R	/	/	20	I
S-18	0	R	09	I	16	R	34	S	08	R	20	I
S-19	04	R	14	I	14	R	/	/	/	/	19	I
S-20	0	R	0	R	0	R	32	S	/	/	18	I
S-21	04	R	17	S	20	S	36	S	06	R	18	I
S-22	13	R	17	S	0	R	29	S	/	/	22	I
E-01	0	R	0	R	0	R	12	R	/	/	10	R
E-07	0	R	0	R	0	R	28	S	/	/	20	I
E-08	0	R	0	R	0	R	26	S	/	/	20	I
E-09	0	R	06	R	0	R	14	R	/	/	20	I
E-14	03	R	18	R	03	R	48	S	/	/	20	I
E-16	0	R	08	R	0	R	20	R	/	/	22	I
E-20	0	R	06	R	0	R	24	I	/	/	18	R
Total résistantes		22		10		20		5/20		04/06		07

Les résultats de multi résistance sont résumés dans les graphiques suivantes :

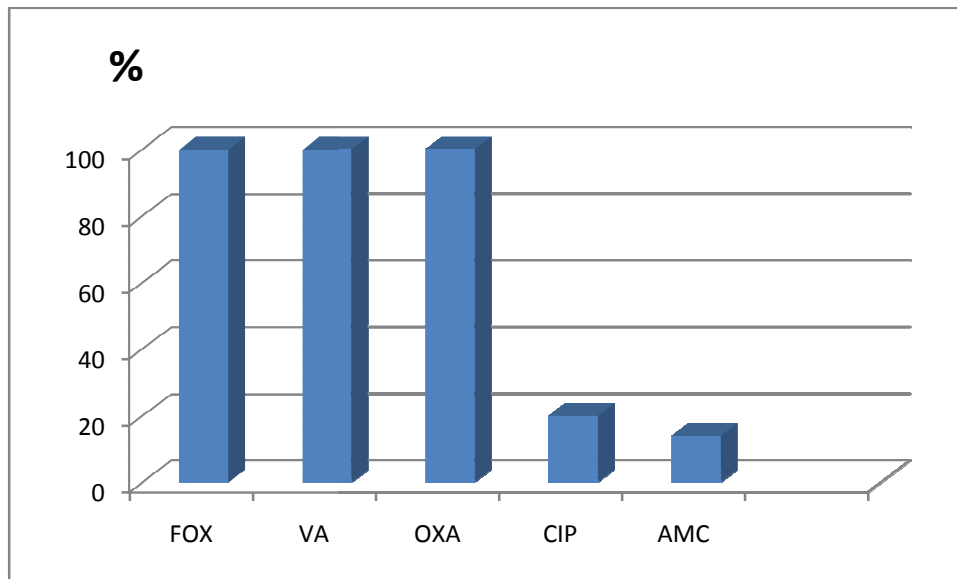


Figure 05: La fréquence des souches de *Staphylococcus aureus* multirésistant

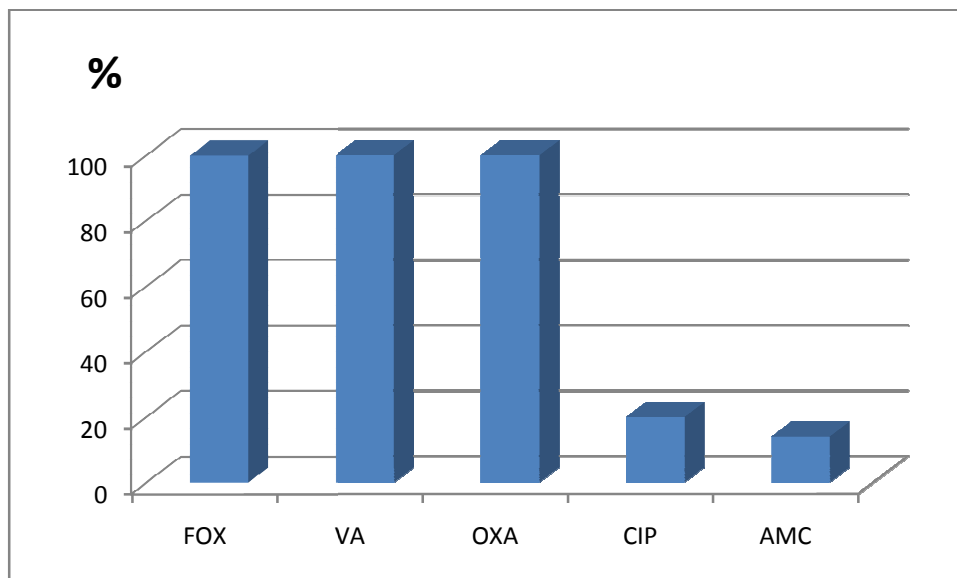


Figure 06 : La fréquence des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux antibiotiques

III. Discussion

Staphylococcus aureus et *Escherichia coli* sont des bactéries qui font partie de la microflore de la plupart des champs cultivés, on les retrouve souvent dans les aliments couramment consommé comme le lait cru.

Cette étude nous a permis de déterminer la résistance de 7 souches d'*Escherichia coli* et 15 souches de *Staphylocoque aureus* isolé de 30 échantillons de lait cru aux antibiotiques actuellement utilisés.

La résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* se développent de plus en plus, car nous avons observés que 20% des souches testées sont résistantes à la Vancomycine (VA). Cette sensibilité diminuée de *S.aureus* aux glycopeptides pose un problème d'actualité. Différentes études rapportent l'isolement de souches de *S.aureus* intermédiaires ou résistantes à ces antibiotiques (**Hiramatsu et al ;1997**) et (**Marchese A et al ;2000**) .Une activité autolytique accrue, relarguent des débris de peptidoglycane, produisent plus de précurseurs monomériques et de multiples autres altérations de leur paroi (**Hiramatsu K;2001**).

Ceci traduit une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane liée probablement à des mutations dans les multiples gènes gouvernant ce métabolisme ou dans l'expression de ces gènes. Ces réorganisations pourraient empêcher l'accès de la vancomycine à sa cible .Une autre hypothèse non exclusive serait l'hyperproduction de précurseurs du peptidoglycane agissant comme autant de leurres pour les glycopeptides (**Roland Leclercq et al. 2012**).

On note aussi que 7 souches d'*Escherichia coli* isolées présentent une multirésistance dont la totalité de ces souches sont résistantes au Céfoxitine (FOX) et à l' oxacilline (OXA) et 14% de ces souches sont résistante à Amoxicilline (AMC) qui appartiennent aux familles des betalactamase dont le mécanisme la résistance aux bêta-lactamines (acide clavulanique), résultante d'une hyperproduction de pénicillinase, ou de l'inactivation de l'inhibiteur lui-même . un pourcentage de 20% sont résistantes au Ciprofloxacine (CIP), et 100% des souches sont résistantes à la Vancomycine (VA) (**Jehl Fet al, 2000**).

Résultats et Discussion

L'étude de la sensibilité des antibiotiques a montré des multirésistances importantes de *Staphylococcus aureus* et d'*E. Coli* à l'ensemble des antibiotiques testés. La résistance aux aminopénicillines (amoxicilline) est la plus fréquente. Ce résultat est similaire à d'autres études. Cette résistance est acquise et serait la conséquence de la pression de sélection liée à la consommation abusive de ces antibiotiques dans les pays en voie de développement. Ces taux élevés de résistance à l'amoxicilline justifient que les aminopénicillines ne soient plus actuellement recommandées pour le traitement de lait cru. (Jehl Fet al, 2000)

Conclusion

Conclusion

Le principe du contrôle de la qualité du lait des espèces animales est très simple, il suffit de comparer les résultats obtenus par l'analyse microbiologique avec les normes et les règles citées dans la réglementation. Cette comparaison a pour but de juger de l'acceptation ou le refus d'un lait.

Dans ce travail, nous avons réalisé l'évaluation de la qualité de lait à travers la mesure de son pH et la prévalence de deux bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*).

Un total de 30 échantillons de lait cru de vache et de chèvre récoltés dans deux régions différentes Sétif et Bejaia, ont été analysés. La qualité microbiologique lors de l'analyse montre que le lait devient un véritable bouillon de microorganismes pathogènes en tout genre, 50% des échantillons étaient contaminés par *Staphylococcus aureus* et 24% par *Escherichia coli*. La majorité des souches isolées (85%) sont résistantes aux divers antibiotiques, et nous avons constatés un développement de résistances de certaines souches de Staphylocoque multirésistantes à la vancomycine.

On finira par dire que de plus en plus l'efficacité de l'antibiothérapie est réduite au moment où les organes nettoyeurs, trop fatigués, débordés, laissent ainsi installer des pathologies qui, selon l'individu, apparaîtront sous différentes formes, en premier lieu dans l'intestin, à divers moments de leur vie.

La surveillance des quantités d'antimicrobiens utilisées pour la production animale n'existe que dans quelques pays. La plupart des pays ont mis en place des procédures administratives en matière d'autorisations de mise sur le marché, mais le degré d'application de ces procédures varie considérablement d'un pays à l'autre. Alors que certains pays sont conscients des effets indésirables possibles de l'utilisation des antimicrobiens dans l'élevage, d'autres ne le sont guère revendiquant des différentes combinaisons de points faibles tels que l'absence de législation, de connaissances, de ressources et de Services vétérinaires ont été identifiées comme des obstacles à l'utilisation prudente des médicaments antimicrobiens.

En vue de protéger la santé humaine une collaboration entre les gouvernements et les organisations non gouvernementales, les agences internationales telles que la FAO et l'OIE doit être mis en place pour assurer et renforcer le développement et la promotion de lignes directrices à l'intention des vétérinaires concernant l'usage prudent des antimicrobiens chez l'animal.

Références bibliographiques

Références bibliographique

A

-**AIT AMER MEZIANE L. 2008.** Aptitude des laits de chèvres et berbis à la coagulation par des protéases d'origine avicole. Thèse de Magister en science Agronomiques, 2008, pp.10-14.

-**ALAIS C. 1984.** Science de lait : principes des techniques laitières. 4ème édition, SEPAIC, Paris, 814 p.

-**Ahmad M, Urban C, Mariano N, Bradford PA, Calgani E, Projan JS et coll.1999.** Clinical characteristics and molecular epidemiology associated with imipenem-resistant *Klebsiellapneumoniae*. Clin Infect Dis 1999;29:352-5.

-**Anderolettioiver, 2015.** Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk.

Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992. Bactériologie Clinique. 2nd Edition, Ellipses, Paris

-**Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992.** Bactériologie Clinique. 2nd Edition, Ellipses, Paris

-**Avorn JL, Barrett JF, Davey PG, McEwen SA, O'Brien TF, Levy SB.2001.**

Organisation mondiale de la sante (OMS). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups: alliance for the prudent use of antibiotics, 2001.

http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_

B

-Baddour, LM.,Tayidi, MM., Walker, E., et al.1994. Virulence of coagulase-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis.*J Med Microbiol.* 1994; 41, p259-263.

-BADIS A.,LAOUABDIA-SELLAMI N.,GUETARNI D.KIHAL M.ET OUZROUT R.2005.Caractérisation phénotypique des bacteries locales « Arabia et kabyle »*Sciences et technologie*23,30-37.

- Bounous, G and Gold, P. 1991, *the Biological Activities of Undenatured Dietary Whey Protein: The Role of Glutathione*, Clin. Invesst. Med. 14: 296-359.

- Brooke Claxton ,2009 ,Santé Canada et l'agence canadienne d'inspection des aliments, Argumentaire de Santé Canada sur l'interdiction de vente de lait cru.

C

-Callon C, Duthoit F, Delbes C, Ferrand M, Lefrileux Y, De Cremoux R, Montel MC. 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst.Appl. Microbiol.* 30, 547-560.

-CARR F.J. ,HILL D MAIDA N 2002. The lactic acid bacteria :A literature survy.*Crit.Rev.Microbiol.*28,281-370

Références bibliographiques

-Cecile Callon, Celine Delbes, Françoise Monsallier et Marie Christine Montel (INRA Aurillac), Julie Barral et Fanny Pelissier (Actilait), Cecile Laithier, Pierre Parguel, Sabrina Raynaud et Philippe Roussel (Institut de l'Élevage), Nathalie Desmasures (Université de Caen), Yvette Bouton (CIGC), Antoine Berodier (Centre technique des Fromages Comtois), Valerie Michel (Suaci Alpes du Nord - GIS Alpes Jura), Eric Beuvier (INRA de Poligny), Yann Demarigny (ISARA-Lyon), Henry-Eric Spinnler (AgroParisTech, Grignon), Helene Tormo (EI-Purpan), Ouvrage collectif réalisé dans le cadre du RMT « Filières fromagères valorisant leur terroir » animé par le CNAO et le GIS Alpes Jura, Juillet 2011. Microflore du lait cru, Ouvrage collectif coordonné par Cécile Laithier (Institut de l'Élevage).

D

-D'Amico, D.J., Druart, M.J. and Donnelly C.W. (2010) Behavior of Escherichia coli O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. J. Food Prot. Vol. 73, No. 12, 2217-2224.

-Davies AR., Slade A., Blood R.M., Gibbs PA. (1992). Effect of temperature and pH value on the growth of verotoxigenic E.coli. Leatherhead Food Research Association., Research Report, N 691

-Decludt, B., Bouvet P., Mariani-Kurkdjian P., Grimont F., Grimont P. A., Hubert B., DeVinney, R., Gauthier A. Abe A., and Finlay B. B. (1999) Enteropathogenic Escherichia coli: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. Cell Mol Life Sci 55:961-976.

Références bibliographiques

-Delarras, C.2007. Microbiologie pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. 1er éd., Éditions Tec & Doc - EM Inter – Lavoisier, Paris, 2007, p476.

- **Doyle, MP, Roman, DJ. 1982,** *Prevalence and survival of Campylobacter jejuni in unpasteurized milk* , Appl. Envir.Microbiol. 44: 1154-1159.

E

- **E. Potter, DVM; Arnold F. Kaufmann, DVM; Paul A. Blake, MD; Roger A. Feldman, MD, JAMA. 1984.** Unpasteurized MilkThe Hazards of a Health FetishMorris; 252(15):2048-2052. doi: 10.1001/jama.1984.03350150048020.

G

-GUIRAUD J. etGalzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition l'usine. 119p.

-GUIRAUD J.P. 1998. Microbiologie alimentaire. Edition dunod, paris, p. 137.

-GUIRAUD J.P. (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. Pp : 136-139.

H

Références bibliographiques

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *S.aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40(1):135-136.

-Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *S.aureus*: a new model of antibiotic resistance *Lancet Infect Dis* 2001; 1 (3):147-55.

J

-JEHL F. CHOMARAT M. GERARD A. 2000. Editions Biomérieux . De l'antibiogramme à la prescription »

- **R. 1980.** Composition and characteristics of goat milk: Review, *Dairy Sci*, pp. 1605-1630

-Jones RN. Chest 2001. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years.;119(suppl 2):397-404.

-Journal officiel de l'union européenne,2005.Règlement 2073/2005 modifié sur les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires Annexe I Chapitre 1.

K

-Kateete D.P., Kimani C.N.,Katabazi F.A., Okeng A., Okee M.S., Nanteza A.,

Joloba M.L., Najjukal F.C. 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol.Antimicrobials.* **9**: 23-30.

L

- LARPENT J.P. 1990.** Lait et produits laitiers non fermentés. Dans Microbiologie alimentaire. (Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J.) Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Edition Tec et Doc, Lavoisier, pp. 201-215.
- LEWIS R. 2009.** US Food and Drug Administration (FDA). The rise of antibiotic resistant infections. http://www.fda.gov/fdac/features/795_antibio.html (site)
- LIVERMORE DM. 1995.** β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8:557-84.

M

- MAHER, M. M., Jordan, K.N., Upton, M.E. and Coffey, A. (2001)** Growth and survival of E. coli O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. J. Appl. Microbiol. 90: 201207.
- MANDALL GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell. 2009.** Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Sixième édition, Elsevier, Churchill Livingstone éditeurs, USA. Édition en ligne. <http://www.ppidonline.com>.
RNAL, 4, 459-169.

Références bibliographiques

-MARCHAL N.,BOURDON J.L.ET RICHARD C.L.,1991.Les milieu de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bacteries.Ed.Doin.65-49

-Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *S.aureus* strains isolated in a large Italian hospital. J ClinMicrobiol 2000; 38(2):866-869.

-Mathieu, 1998.

-MATHOL A.G.KIHAL M.PREVOST H. ET DIVIES C.1994.Selective enumeration of Leuconostoc on vancomycin agar medium.International Dairy JOURNAL

-Murthy R.2001.Implementation of strategies to control antimicrobial resistance.

N

-Nauta, M.J. and Dufrenne, J. (1999) Variability in growth characteristics of different E. coli O157:H7 strains and its implications for predictive microbiology. Quant. Microbiol. 1: 137-155.

-Neaves, P., J. Deacon, and Bell C. (1994) A survey of the incidence of Escherichia coli O157 in the UK food industry. Int Dairy J 4:679-696.

Références bibliographiques

-Northolt MDetal. 1988, *Listeria monocytogenes* heat resistance, and behavior during storage of milk and whey and making of Dutch type of cheese, Neth. Milk Diary 142: 207-219.

P

-Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M. and Herman, L. (2008a) Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and negative O157. FEMS Microbiol Lett 282,124-131

R

- Rieder Josef et coll. 2001, *Exposure to farming in Early Life and Development of Asthma and Allergy a cross-sectioned survey* The Lancet 358: 1129-1133.

-Rodolakis A. 2009. Q fever in dairy animals. Ann. NY Acad. Sci. 1166, 90-93.

-Robert ,2002.Journal Officiel de l'Union Européenne

-Roland Leclercq , Vincent CattoirBactéries à Gram positif et glycopeptides. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - SEPTEMBRE-OCTOBRE 2012 - N° 445 .

-Rose, WE.,Rybak, MJ., Kaatz, GW.2007.Evaluation of daptomycin treatment of *Staphylococcus aureus* bacterial endocarditis: an *in vitro* and *in vivo* simulation using historical and current dosing strategies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.2007; 60, p334-340.2000;11:107-11.Chest 2001;119(suppl 2):405-11.

S

-SAWAYA W.N., KHALIL J.K., AL-SHALHAT A., AL-MOHAMMAD H. 1989. Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J. Food Sci*, 49, pp. 744-747

-Simonsen GS, Tapsall JW, Allegranzi B, Talbot EA, Lazzari S.2004. The antimicrobial resistance containment and surveillance approach – a public health tool. *Bulletin of World Health Organization* 2004; 82:928-34.

-Sanders CC, Sanders WE Jr.1992. s-lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992;15:824-39.

T

-Taylor and francic, 1973. Population, Infant Mortality and Milk - M. W. Beaver, Page 250 of 243-254

-The Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2009. Campaign to prevent antimicrobial resistance in healthcare settings <http://www.cdc.gov/drug-resistance/healthcare/ha/slideset.htm> (site visite le 23 avril 2009).

W

-Waddell LA, Rajić A, Sargeant J, Harris J, Amezcua R, Downey L, Read S, McEwen SA. 2008. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium*spp. *paratuberculosis*: a systematic review. *Canadian Journal of Public Health* 99, 145-55.

Références bibliographiques

-Wang, Guodong; Zhao, Tong; Doyle, Michael P, juin 1997, *Survial Growth of Escherichia Coli O157.117 in unpasteurized milk and pasteurized milk* Journal of Food Protection®, vol. 60, n° 6, p. 610-613.DRS_2001.10.pdf (site visite le 30 mars 2009).com (site visite le 1er avril 2009).visite le 23 avril 2009).

Wilson, J. B., McEwen S. A., Clarke R. C., Leslie K. E., Wilson R. A., Waltner-Toews D. and Gyles C. L.(1992) Distribution and characteristics of verocytotoxigenic Escherichia coli isolated from Ontario dairy cattle.

Y

-Yakhelf, 2010.Journal officiel de republique Algerienne

Yamashita SK, Louie M, Simor AE, Rachlis A.2000. Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit. Can J Infect Dis

Annexe

 Annexe n° 1 : les milieux de culture et composition (pour un litre)

Gélose Mueller Hinton (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Infusion de viande de bœuf	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g
pH	7.4
Gélose Chapman (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Extrait de viande	1 g
Chlorure de sodium	75 g
Peptone	10 g
Gélose	15 g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0.025 g
pH	7.4
Gélose ADN (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
ADN	0,3 g
Bleu de toluidine à 0.1 M	3 ml
Tampon TRIS pH9 à 50mM	1 l
Chlorure de calcium à 10mM	1 ml
Chlorure de sodium	10 g
Agar	10 g
pH	9
Gélose nutritive (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Extrait de levure	2 g
Extrait de viande	1 g
Peptone	5 g
NaC	15 g
Agar	15g
pH	7,4
Bouillon Giolitti cantoni (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Tryptone	10,0 g
Extrait de viande de bœuf	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de lithium	5,0g
Mannitol	20,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Glycocolle	1,2 g
Pyruvate de sodium	3,0 g
pH	6,9

Bouillon nutritif (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Maceration de viande	1 g
Peptone trypsique	15 g
NaCl	5 g
pH	7,7
Bouillon cœur-cerveau (BHIB) , <i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>	
Infusion de cervelle de veau	200 g
Infusion de coeu de beuf	50 g
Peptone de gélatine	10 g
Chlorure de sodiu	5 g
Phosphate disodique	2,5 g
Glucose	2 g
pH	7,4
Mannitol mobilité (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Peptone	20 g
Nitrate de potassi	01g
Mannitol	02g
Rouge de phéno	04ml
Gélose	4g
pH	7,6
Gélose TSI (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Extrait de bœuf	3g
Extrait de levure	3g
Peptone	20g
chlorure de soduim	5g
lactose	10g
saccharose	10g
Glucose	1 g
citrate ferrique	3 g
thiosulfate de soduim	3 g
rouge de phynole	0,025 g
gélose	12 g
pH	7,4
PCA (<i>Institut Pasteur d'Alger, Algérie</i>)	
Hydrolysats trypsine de caséine	5g
extrait de levure	2,7 g
glucose	1g
agar	9g
l'eau distillée	1000 ml
pH	7,4

Annexe n° 2 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour les entérobactéries (CA-SFM. 2010).

Familles d'Antibiotiques	Antibiotiques testés	Sigles	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		Concentrations critiques (mg/L)	
				Sensible S	Résistante R	Sensible S	Résistante R
β-lactamines	Céfalotine	CF	30µg	≥ 18	<12	≤8	>32
	Amoxicilline	AMX	25µg	≥ 21	<16	≤4	>8
	Amoxicilline + Ac.clavulanique	AMC	20/10µg	≥ 21	<16	≤4/2	>8/2
	Ticarcilline	TIC	75µg	≥ 24	<22	≤8	>16
	Ticarcilline + Ac.clavulanique	TCC	75/10µg	≥ 24	<22	≤8/2	>16/2
	Pipéracilline	PIP	75µg	≥ 20	<16	≤8	>16
	Pipéracilline/tazo bactam	TPZ	75/10µg	≥ 21	<17	≤8/4	>16/4
	Ceftazidime+ Ac.clavulanique	CAZ-CV	30/10µg	≥26	<19	≤1	>8
	Aztréonam	ATM	30µg	≥ 27	<21	≤ 1	>8
	Céfotaxime	CTX	30µg	≥26	<23	≤1	>2
	Ceftazidime	CAZ	30µg	≥26	<19	≤1	>8
	Céfépime	FEP	30µg	≥24	<17	≤1	>8
	Céfprome	CPO	30µg	≥24	<17	≤1	>8
	Céfixime	CFM	30µg	≥ 25	<22	≤ 1	>2
	Céfuroxime	CXM	30µg	≥22	<22	≤8	>8
	Céfoxitine	FOX	30µg	≥22	<15	≤8	>32
	Imipénème	IPM	10µg	≥ 24	<17	≤ 2	>8
Sulfamides-Triméthoprimes	Sulfamides	I	200µg	≥17	<12	≤64	>256
	Triméthoprime	TMP	5µg	≥20	<16	≤2	>4
	Triméthoprime/Sulfaméthoxasole	SXT	1,25/23,75 µg	≥16	<13	≤2/38	>4/76
	Nétilmicine	NET	30µg	≥21	<19	≤2	>4
Quinolones – Fluoroquinolones	Ofloxacine	OFX	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ciprofloxacine	CIP	5µg	≥25	<22	≤0.5	>1
	Ac.nafidixique	NA	30µg	≥20	<15	≤8	>16

Divers	Chloramphénicol	C	30µg	≥23	<23	≤8	>8
	Tétracycline	TE	30µg	≥19	<17	≤4	>8
	Colistine	CS	50µg	≥15	<15	≤2	>2
	Fosfomycine	FOS	50µg	≥14	<14	≤32	>32

Résumé

Le lait et les produits laitiers renferment une flore microbienne naturelle et/ou additionnelle à l'origine de la diversité des produits mis sur le marché Algérien. L'origine des contaminations par les bactéries pathogènes plus au moins résistantes aux antibiotiques, varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation.

Cette étude a pour but d'évaluer la qualité microbiologique du lait cru deux espèces de mammifères (bovine et caprine) ainsi que la prévalence des *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dans cet aliment.

Un total de 30 échantillons de lait cru de vache et de chèvre récoltés dans deux régions différentes Sétif et Bejaia, ont été analysés. La qualité microbiologique lors de l'analyse montre que le lait devient un véritable bouillon de microorganismes pathogènes en tout genre, 50% des échantillons ont été contaminés par *Staphylococcus aureus* et 24% par *Escherichia coli*. La majorité des souches isolées (85%) sont résistantes aux divers antibiotiques, et nous avons constatés un développement de résistances de certaines souches de Staphylocoque multirésistantes à la vancomycine.

Mots-clés : Lait cru de vache, *Escherichia coli*, Lait de chèvre, Résistance, *Staphylococcus aureus*, antibiotiques, prévalence.

Abstract

Milk and dairy products contain a natural microbial flora and/or other micro-organisms, which vary within the wide range of products available on the Algeria market.

The origin of contamination by pathogenic bacteria varies with the type of product and the mode of production and processing.

The purpose of this study was to evaluate the microbiological quality of raw milk for two species of mammals (bovine and caprine) and the prevalence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in this food.

A total of 30 raw cow and goat milk samples collected in two different regions of Setif and Bejaia were analyzed. The microbiological quality in the analysis shows that milk becomes a real broth of pathogenic microorganisms of all kinds, 50% of the samples were contaminated with *Staphylococcus aureus* and 24% with *Escherichia coli*. The majority of the strains isolated (85%) are resistant to the various antibiotics, and we have observed resistance development of certain strains of Vancomycin multiresistant *Staphylococcus*.

Keywords

Raw milk - Consumption - Cow milk - *Escherichia coli* - Goat milk - Resistance - Surveillance - Dairy products - Risk - Public health - *Staphylococcus aureus* - Antibiotics.