

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE



Mémoire



De fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Alimentaires

Option : Biochimie de la Nutrition

Thème

**Impact de la mammite subclinique sur la
composition et les propriétés technologiques du
lait**

Réalisé par :

➤ M^{elle} BENTAYEB Lamia

Soutenu le : 15 Juillet 2019

Devant le jury :

M ^r SEBBANE H.	Maître assistant A	UMMTO	Président
M ^r AKKOU M.	M.C.B	ISV Blida-1	Promoteur
M ^{me} ZENNIA-SI AHMED S.	M.C.B	UMMTO	Co-promotrice
M ^r TITOUCHE Y.	M.C.B	UMMTO	Examinateur
M ^{me} SENOUSSE-GHEZALI C.	Maître assistante A	UMMTO	Examinatrice

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

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

Je tiens à remercier tout particulièrement mon promoteur, **D^r AKKOU Madjid**, Maître de Conférences classe B, à l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, d'avoir accepté de m'encadrer, de m'avoir prêté main forte durant la réalisation de ce travail, pour sa présence et aussi pour m'avoir indiqué la conduite à suivre pour que les choses se déroulent de manière optimale. Il fut pour moi un promoteur attentif ; sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris.

Mes vifs remerciements vont de même à ma Co-promotrice, **M^{me} ZENNIA SI-AHMED Saliha**, Maître de Conférences classe B, à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour l'attention particulière qu'elle a eu pour moi, pour sa présence, son aide, toutes ses orientations et ses judicieux conseils à travers lesquels j'ai beaucoup appris.

J'ai clairement vu en eux les professionnels qui aimaient avant tout leur activité et travaillaient par plaisir et non pas pour gonfler un égo personnel.

Que **M^r SEBBANE Hilal**, Maître Assistant classe A, à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, soit vivement remercié pour l'intérêt qu'il a accordé au sujet et pour avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus chaleureux à, **M^r TITOUCHE Yacine**, Maître de Conférences classe B, à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, pour avoir fait l'honneur d'accepter l'évaluation de ce travail.

Je tiens aussi, à exprimer mes chers remerciements à **M^{me} SENOUSSE-GHEZALI Chahra**, Maître Assistante classe A, à l'université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Je veux exprimer ma reconnaissance à tout le personnel des laboratoires que j'ai été amené à côtoyer durant mon stage, de m'avoir accueilli à bras ouverts ainsi que pour la liberté d'action qu'ils m'ont donnée à chaque étape de la réalisation de ce travail. Leur intervention m'a

apportée une grande sérénité et j'ai grandement apprécié de pouvoir ainsi être soulagée d'une partie de la pression inhérente à l'accomplissement de ce travail.

Je réitère tous mes remerciements et ma reconnaissance à ma famille sans exception, ainsi que **D^f BOUBKEUR Mahdi** et **D^f Ferdji Karim**, pour l'excellente contribution qu'ils ont apporté à ce labeur et vous prie d'agréer mes meilleures salutations.

C'est aussi pour moi un plaisir autant qu'un devoir, d'exprimer ma gratitude et reconnaissance à **B. Yasmine, T. Mohamed, B. Karima, Z. Assia** et **A. Lamia**. Leurs faveurs dont ils m'ont gratifié, leurs aides et leurs générosités à mon égard m'ont été d'une très grande aide tant matériel que moral.



Dédicaces

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

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

**A mon fiancé, ma belle famille, mon oncle ainsi
que sa famille. Recevez à travers ce travail, toute
ma gratitude, mon estime et mes profonds
sentiments.**

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

**A ma sœur, son mari et mes deux petits neveux
adorés : Mohamed et Rayane, en témoignage de
l'attachement, l'amour et de l'affection que je
porte pour vous.**

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

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

LAMIA

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : Production du lait	
1.1. Anatomie et fonction de la glande mammaire.....	2
1.1.1. Présentation de la mamelle.....	2
1.1.2. Constitution générale de la glande mammaire.....	2
1.1.3. Tissu sécréteur : les alvéoles mammaires.....	3
1.1.4. Tissus non sécréteurs.....	4
1.1.4.1. Tissu conjonctif.....	4
1.1.4.2. Peau.....	4
1.1.4.3. Tissu musculaire.....	5
1.1.4.4. Réseau sanguin.....	5
1.1.4.5. Réseau lymphatique.....	5
1.1.4.6. Tissu nerveux mammaire.....	6
1.2. Physiologie de la sécrétion lactifère.....	6
1.3. Facteurs de variation de la production laitière.....	7
1.3.1. Ecarts liés aux caractéristiques des animaux.....	7
1.3.1.1. Race.....	7
1.3.1.2. Individualité.....	7
1.3.1.3. Niveau génétique des individus.....	7
1.3.1.4. Age.....	8
1.3.1.5. Stade de lactation.....	8
1.3.2. Facteurs environnementaux.....	8
1.3.3. Facteurs liés à la conduite du troupeau.....	8
1.3.3.1. Traite des vaches.....	8
1.3.3.2. Alimentation.....	9
1.3.3.3. Etat de santé des animaux.....	9
Chapitre II : Paramètres de qualité du lait cru issu de mamelles saine	
2.1. Généralités sur le lait.....	11

2.1.1. Définition et importance.....	11
2.1.2. Propriétés physico-chimiques du lait cru issu de mamelle saine.....	11
2.1.3. Composition du lait.....	12
2.1.3.1. Matières azotées totales du lait.....	12
2.1.3.1.1. Caséines du lait.....	14
2.1.3.1.2. Protéines solubles.....	15
2.1.3.1.3. Matières azotées non protéiques.....	15
2.1.3.2. Composition biologique du lait cru.....	15
2.2. Qu'entend-on par « qualité du lait » ?.....	16
2.3. Propriétés technologiques du lait.....	17
2.3.1. Coagulation du lait en fromagerie.....	17
2.3.2. Présure commerciale et coagulation.....	20
Chapitre III : Impact de la mammite subclinique sur la qualité du lait	
3.1. Infections intramammaires chez la vache laitière.....	21
3.1.1. Définition de la mammite.....	21
3.1.2. Origines de la contamination.....	21
3.2. Propriétés bactériologiques des <i>S. aureus</i>	22
3.3. Importance des mammites à <i>S. aureus</i>	23
3.4. Classification des mammites.....	23
3.4.1. Mammites cliniques.....	23
3.4.1.1. Mammites suraigües gangréneuse.....	24
3.4.1.2. Mammites cliniques aigües	24
3.4.1.3. Mammites chroniques.....	24
3.4.2. Mammites subcliniques.....	24
3.5. Composition et propriétés physico-chimiques du lait de mammite subclinique.....	25
B. PARTIE PRATIQUE	
1. Objectifs et plan pratique	26
1.1. Objectifs de l'étude.....	26
1.2. Plan pratique.....	26
2. Matériel et méthodes	26
2.1. Matériel	27
2.1.1. Pour le dépistage de mammites et prélèvements.....	27
2.1.2. Pour l'analyse microbiologique.....	27
2.1.3. Pour l'analyse physico-chimique.....	28

2.2. Méthodes	29
2.2.1. Population de l'étude et échantillonnage.....	29
2.2.1.1. Description de la wilaya d'étude.....	29
2.2.1.2. Présentation des régions.....	29
2.2.1.3. Population animale de l'étude.....	30
2.2.1.4. Echantillonnage	30
2.2.2. Enquête sur les mammites au sein des élevages.....	31
2.2.2.1. Prospection des élevages.....	31
2.2.2.2. Examen clinique des mamelles	31
2.2.2.3. Dépistage des mammites subcliniques.....	31
2.2.2.4. Collecte des prélèvements de lait.....	32
2.2.3. Isolement et caractérisation phénotypique des staphylocoques.....	33
2.2.3.1. Identification des staphylocoques.....	33
2.2.3.2. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	36
2.2.4. Analyses physico-chimiques des échantillons du lait.....	39
2.2.4.1. Mesure du pH	39
2.2.4.2. Détermination de la teneur en protéines.....	39
2.2.4.3. Mesure des paramètres physico-chimiques à l'aide de Lactoscan SP.....	40
2.2.5. Contrôles électrophorétiques des protéines totales des laits analysés.....	41
2.2.5.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).....	41
2.2.5.2. Préparation des échantillons de laits à l'électrophorèse.....	42
2.2.5.3. Conduite de l'électrophorèse en présence du SDS et de 2-ME (PAGE-SDS).....	43
2.2.6. Détermination de l'activité coagulante.....	46
2.2.7. Synthèse des données et analyse statistique.....	48
3. Résultats	49
3.1. Enquête sur les mammites bovines subcliniques au sein des élevages.....	49
3.1.1. Prévalence globale des mammites chez les vaches laitières.....	49
3.1.2. Facteurs de variation de la prévalence.....	49
3.1.3. Variation individuelle de la prévalence des mammites subcliniques.....	50
3.2. Prélèvements de laits pour analyses physico-chimiques et bactériologiques.....	51
3.3. Analyse bactériologique du lait.....	52
3.3.1. Impact des staphylocoques sur la santé de la mamelle.....	52
3.3.2. Résistance aux antibiotiques.....	53
3.4. Physico-chimie des échantillons de lait analysés.....	55

3.4.1. Physico-chimie comparative entre le lait mammitieux et le lait sain.....	56
3.4.2. Électrophorèse des protéines totales des laits sain et mammitieux.....	56
3.4.3. Activité de coagulation.....	61
4. Discussion.....	63
4.1. Protocol d'étude et qualité des données	63
4.2. Prévalence globale des mammites chez les vaches laitières.....	63
4.3. Analyse bactériologique du lait.....	64
4.3.1. Culture bactérienne et identification.....	64
4.3.2. Résistance aux antibiotiques.....	64
4.4. Impact de la mammite sur les propriétés et la composition du lait.....	65
4.4.1. Impact de la mammite sur les propriétés du lait.....	65
4.4.2. Impact de la mammite sur la composition du lait.....	65
4.4.3. Impact de la mammite sur les protéines totales du lait.....	66
4.5. Impact de la mammite sur l'activité de coagulation.....	68
CONCLUSION.....	69

Références Bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux

Tableau	Intitulé	Page
I	Composition moyenne du lait da vache JEANTET <i>et al.</i> (2017).	12
II	Teneur des différentes protéines du lait de vache (WALSTRA et JENNESS, 1984).	13
III	Caractéristiques physicochimiques des caséines (SCHMIDT, 1982 ; SWAISGOOD, 1982 ; WALSTRA et JENNESS, 1984).	14
IV	Les objectifs pour la qualité (CAUTY et PERREAU, 2009).	17
V	Prévalence des mammites subcliniques chez les vaches laitières	49
VI	Facteurs de variation de la prévalence des mammites subcliniques.	50
VII	Variations inter-trayons de la prévalence des mammites subcliniques.	50
VIII	Analyse bactériologiques du lait mammiteux.	52
IX	Fréquence d'isolement des bactéries des laits issus des quartiers mammiteux.	53
X	Résistance aux antibiotiques des souches de <i>Staphylococcus spp.</i>	54
XI	Profils de résistance des staphylocoques responsables de mammites.	55
XII	Statistique descriptive des propriétés physico-chimiques des prélèvements de laits analysés.	56
XIII	Physico-chimie comparative des échantillons de laits sain et mammiteux.	56
XIV	Comparaison de l'activité de coagulation des échantillons de lait mammiteux et sains.	62

Liste des figures

Figure	Intitulé	Page
1	Organisation générale de la mamelle et localisation des acini (PERREAU, 2014).	3
2	Structure de l'alvéole mammaire (DELOUIS et RICHARD, 1991).	3
3	Constitution générale de la glande mammaire (CHARTON, 2017).	5
4	Synthèse du lait dans une cellule alvéolaire (DELOUIS et RICHARD, 1991).	6
5	Types de coagulation et diversité fromagère (JEANTET <i>et al</i> , 2017).	18
6	Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation présure (CROGUENNEC <i>et al</i> , 2008).	19
7	Transfert des bactéries responsables des mammites. Les unes sont d'origine mammaire, les autres viennent de l'environnement (GOURREAU <i>et al</i> , 2011).	22
8	Outils de dépistage des mammites subcliniques.	27
9	Situation géographique des élevages investigués dans l'étude.	30
10	Degrés de la réaction Teepol-lait.	32
11	Dépistage des mammites subcliniques et technique de prélèvement du lait.	33
12	Ensemencement des échantillons de lait mammitieux.	34
13	Technique de recherche de la catalase.	35
14	Test d'agglutination sur lame.	35
15	Culture sur bouillon cœur-cerveille et test de coagulase.	36
16	Préparation des suspensions et ensemencement pour antibiogramme.	37
17	Application des disques et incubation des boîtes à 37°C.	38
18	Estimation des diamètres des zones d'inhibition.	38
19	Mesure du pH des échantillons de lait sains et mammitieux.	39
20	Courbe étalon DO= f [BSA] du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).	40
21	Dosage des paramètres physico-chimiques des laits sains et mammitieux avec Lactoscan SP et impression des résultats.	41

22	Préparation des échantillons de laits pour contrôles électrophorétiques.	43
23	Photographie d'une unité d'électrophorèse.	44
24	Dépôt des échantillons pour la migration électrophorétique.	45
25	Révélations des bandes de migration électrophorétique.	46
26	Préparation de la solution enzymatique.	47
27	Mesure du temps de coagulation des échantillons de laits sain et mammitieux par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN <i>et al</i> (1977).	48
28	Variations inter-trayons de la prévalence des mammites subcliniques.	51
29	Prélèvements du lait destiné aux analyses physico-chimiques et microbiologiques.	52
30	Profils électrophorétiques 1 des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).	58
31	Profils électrophorétiques 2 des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).	59
32	Profils électrophorétiques 3 des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).	60
33	Courbe de tendance de la conductivité des échantillons de laits.	61

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
°D	Degré Dornic.
µm	Micro-mètre.
2-ME	2-mercaptoéthanol.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
A_w	Activité de l'eau « Water activity ».
BHIB	Bouillon cœur-cerveille « Brain Heart Infusion Broth ».
BSA	Albumine de sérum bovin « bovine serum albumin»
CaCl₂	Dichlorure de calcium.
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
CEM	Cellules épithéliales mammaires.
UFC	Unité formant colonie.
Cl	Ion chlorure.
CMP	Caséinomacropéptide.
CMT	Test de mammité de Californie « Californian Mastitis Test ».
CN	Caséines.
CO₂	Dioxyde de carbone.
CuSO₄	Sulfate de cuivre.
DO	Densité optique.
FPC	Chymosine produite par fermentation.
Glu	Glutamine.
GN	Gélose nutritive.
GSF	Gélose au sang frais.
Hz	Hertz.
IgG	Immunoglobulines.
K⁺	Ion potassium.
Leu	Leucine.
Met	Méthionine.
MG	Matière grasse.
MH	Mueller-Hinton.
MP	Matière protéique.
mS	Millisiemens.
Na⁺	Ion sodium.
NaOH	Hydroxyde de sodium.
ND	Non défini.
NMC	National Mastitis Council.
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.
pH	Potentiel d'hydrogène.
Phe	Phénylalanine.
Pro	Proline.
SCN	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative.

SCP	<i>Staphylococcus</i> à coagulase positive.
SDS	Dodécylsulfate de sodium.
TCA	Acide trichloracétique.
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyl-éthylène diamine.
TP	Taux protéique.
TRIS	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane.
UP	Unité présure.
UV	Ultra-violet
V	Volt
W	Watt
β-Lg	β-Lactoglobuline.
α-La	α-Lactalbumine.

Résumé

Dans l'optique de définir les particularités des mammites subcliniques et leur impact sur la qualité du lait. Nous avons procédé, chez 60 vaches en lactation issues de 8 élevages distincts, au dépistage par Californian Mastitis Test (CMT) de 240 trayons. Les laits positifs au CMT ont subi des analyses bactériologiques et physico-chimiques, alors que les négatifs ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques. La qualité technologique via l'activité de coagulation a été étudiée sur une sélection d'échantillons mammitieux et sains.

Vingt-huit (46,66%) vaches atteintes de mammites, à raison de deux trayons par individu (Ratio PT/PV=0,46) ont été distinguées. Des laits mammitieux (50 échantillons) soumis à la culture, 92% étaient bactériologiquement positifs. Les staphylocoques sont isolés dans 64% des cas, et *Staphylococcus* à coagulase positive dans 18%. Plus de 77,77% des staphylocoques sont multi-résistants. La céfoxitine est sans effet sur trois isolats et la résistance à la pénicilline, l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline frôle les 83,33%, 61,11%, 41,66% et 33,33% respectivement.

Comparativement aux laits sains, les mesures de conductivité, de densité et de pH sont plus élevées dans les échantillons positifs au CMT. De plus, une augmentation de l'extrait sec dégraissé ainsi qu'une diminution de matières grasses et des sels dans le lait mammitieux sont enregistrées. Même si, des taux relativement similaires en protéines et en lactose sont observés dans les laits sains et infectés, des profils d'électrophorèse des protéines totales s'avèrent discordants entre le lait sain et le lait mammitieux issus de la même vache. De plus l'activité de coagulation des échantillons mammitieux est faible ($2,55 \pm 1,49$ UP) par rapport à celle des échantillons sains ($7,80 \pm 4,46$ UP). Enfin, nos résultats confirment le fardeau que représentent les mammites subclinique sur la qualité et les aptitudes technologiques du lait cru.

Mots clés : Coagulation, lait, mammites subcliniques, physico-chimique, vache laitière.

Introduction

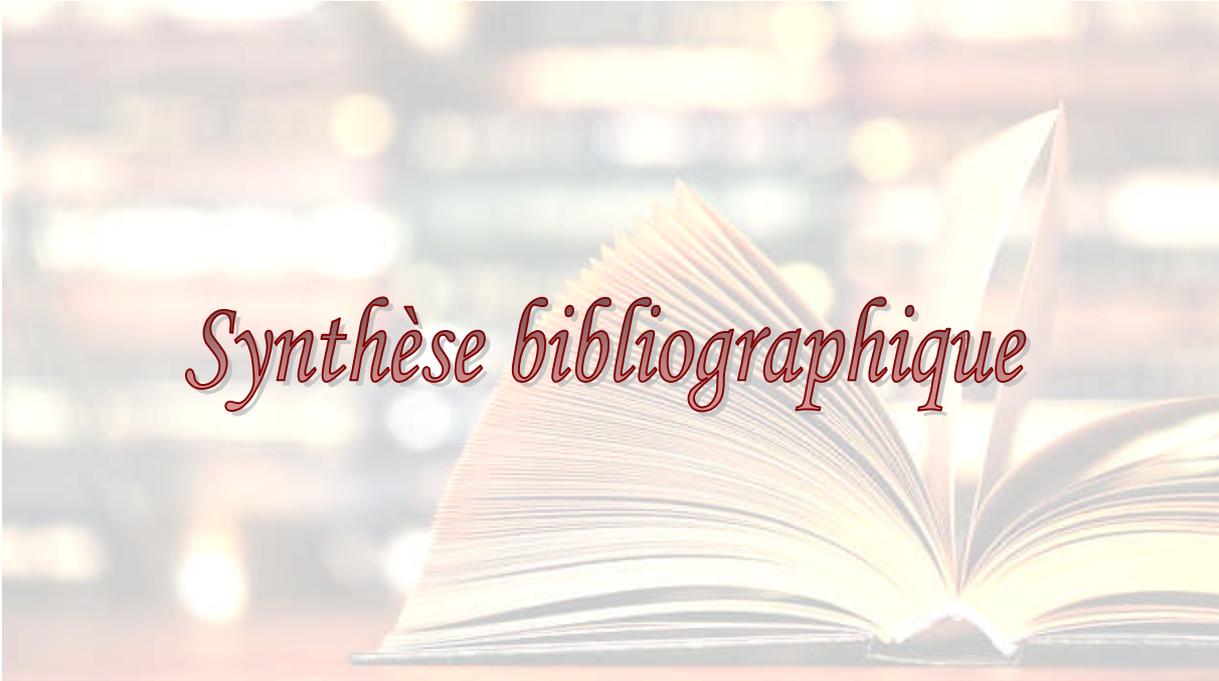
La production du lait de vache, se heurte au problème de gestion de la qualité qui pénalise tant les producteurs que les transformateurs. Les mammites sont les pathologies les plus coûteuses en élevage laitier et leur diagnostic est l'une des clés pour limiter leurs effets (MIR et SADKI, 2018). Elles se définissent comme étant l'inflammation d'un ou de plusieurs trayons de la glande mammaire, caractérisée par des changements physiques, chimiques et microbiologiques de la sécrétion lactée, ainsi que des modifications pathologiques dans le tissu mammaire (HANSEN, 2015). Elles sont souvent de type subclinique ; les variations sont uniquement microscopiques et la mamelle reste cliniquement asymptomatique (REMY, 2010).

Les pertes économiques se justifient d'une part, par le faible rendement des mamelles infectées, les traitements vétérinaires, les saisies de lait ainsi que la réforme prématurée des vaches (PETON et LE LOIR, 2014), et d'autre part, par la baisse de la qualité hygiénique et nutritive du lait et de ses produits dérivés (FARTAS *et al*, 2017).

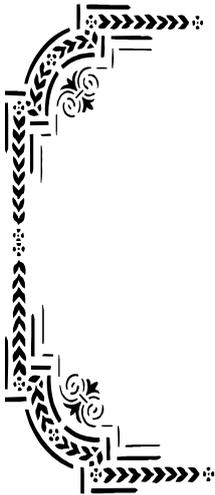
De part l'incidence des mammites subcliniques, la santé humaine peut se trouver compromise par la présence d'agents pathogènes et ou des toxines dans le lait ainsi que les résidus d'antibiotiques résultant de leurs traitement (CHARTIER, 2009). En effet, *Staphylococcus aureus* demeure un des principaux pathogènes responsables de mammites, quoique de façon très variable selon les pays et les régions.

En vue d'étudier la fréquence d'apparition des mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers de la wilaya de Tizi-Ouzou et leurs impacts sur la composition et la qualité technologique du lait, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- ✚ estimer la prévalence des mammites subcliniques chez les vaches laitières;
- ✚ identifier l'étiologie bactérienne et la résistance aux antibiotiques des staphylocoques incriminés;
- ✚ étudier la composition physico-chimique des laits sains et mammiteux;
- ✚ étudier l'activité coagulante de la présure sur le lait mammiteux et sain.

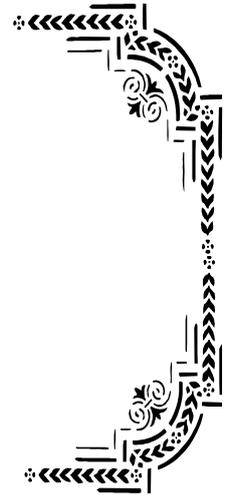
An open book is shown from a top-down perspective, with its pages fanned out. The book is positioned in the lower half of the frame. The background is a soft, out-of-focus bokeh of warm, golden-yellow and white lights, suggesting an indoor setting like a library or a study with many lights. The overall mood is warm and intellectual.

Synthèse bibliographique



Chapitre I

Production du lait



La glande mammaire est l'organe qui caractérise les mammifères. Sa structure particulière lui permet d'assurer conjointement la synthèse et la sécrétion du lait (CHARTON, 2017).

1.1. Anatomie et fonction de la glande mammaire

1.1.1. Présentation de la mamelle

La mamelle de la vache, est une glande placée en position inguinale, accolée à la paroi abdominale et communique avec l'intérieur du corps par deux trous inguinaux par lesquels passent artères, veines, nerfs et vaisseaux lymphatiques. Suspendue au corps par des ligaments suspenseurs latéraux et médians, elle est constituée de quatre quartiers indépendants anatomiquement et se terminant chacun par un trayon (PERREAU, 2014).

1.1.2. Constitution générale de la glande mammaire

Les mamelles sont formées de deux moitiés placées longitudinalement; elles sont constituées par deux grosses glandes ovoïdes formées elles-mêmes de petites vésicules. Ces glandes sont enveloppées par du tissu conjonctif, qui constitue la capsule des glandes mammaires. De très petits canaux se détachent des vésicules glanduleuses pour se réunir en conduits lactifères, qui débouchent dans une petite ampoule située au dessus du mamelon, où le lait s'accumule, ces ampoules constituent les citernes ou sinus galactophore (**Figure 1**), de là, le lait, par des conduits spéciaux entourés de sphincters, qui l'empêchent de s'écouler normalement, se rend aux trayons. Ces derniers, généralement au nombre de quatre, se détachent de l'extrémité inférieure des glandes mammaires ; ce sont des prolongements charnus percés chacun à leur extrémité de deux ou même trois petits orifices livrant passage au lait (LARBALETRIER, 2015).

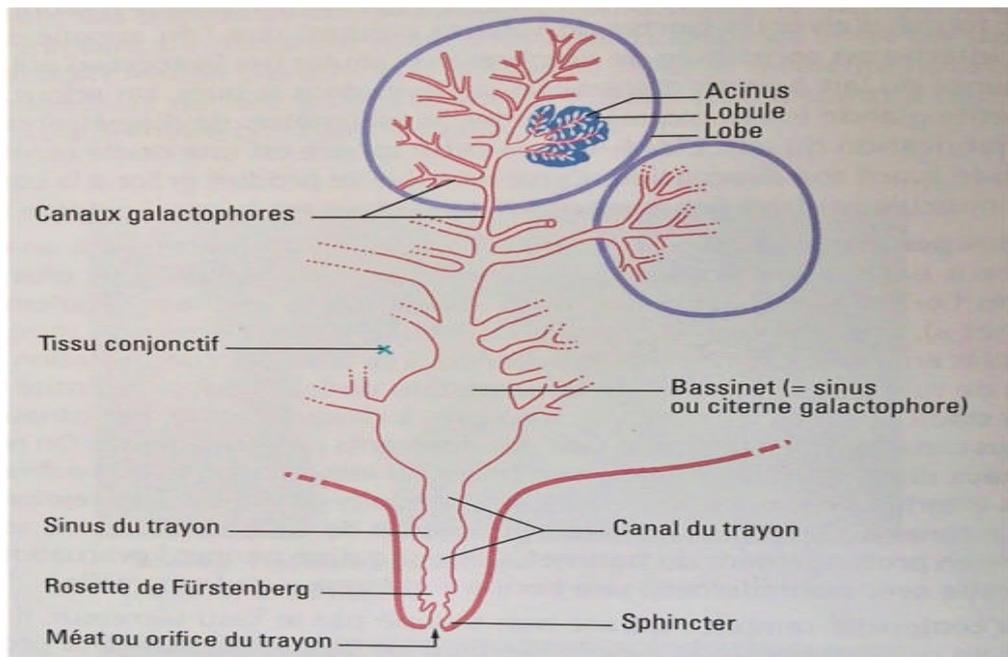


Figure 1 : Organisation générale de la mamelle et localisation des acini (PERREAU, 2014).

1.1.3. Tissu sécréteur : les alvéoles mammaires

L'alvéole mammaire est l'unité fonctionnelle de la mamelle pour la production de lait. La fonction sécrétoire est assurée par des cellules spécialisées, nommées "cellules épithéliales mammaires" (CEM). Ces CEM sont jointes en un épithélium monocouche qui forme la structure sphérique de l'alvéole (**Figure 2**). Ces cellules reposent sur une lame basale et sont polarisées. Elles prélèvent les nutriments provenant du sang au niveau de leur pôle basal. Elles sécrètent les différents constituants du lait à leur pôle apical (CHARTON, 2017).

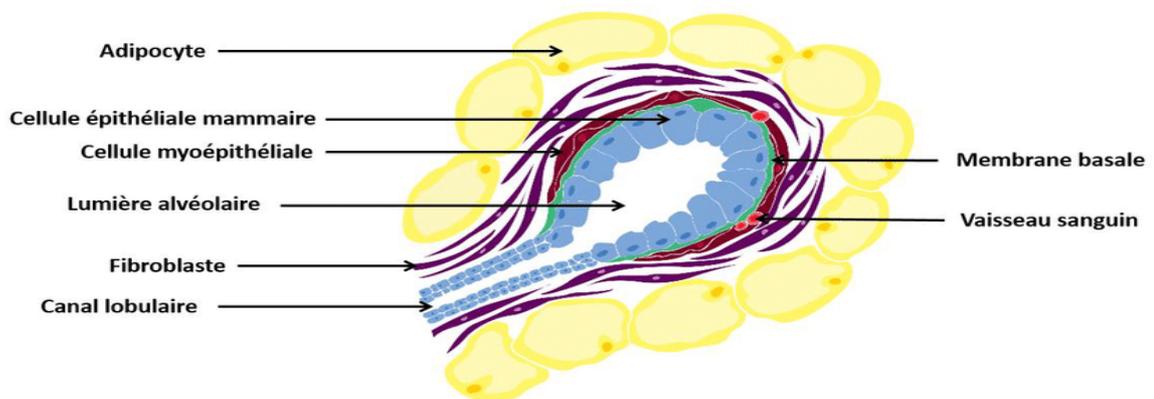


Figure 2 : Structure de l'alvéole mammaire (DELOUIS et RICHARD, 1991).

1.1.4. Tissus non sécréteurs

Le tissu non sécréteur, ou stroma, englobe le tissu sécréteur de la mamelle avec lequel il entretient une relation étroite. Ce stroma est constitué de tissus conjonctifs, adipeux, musculaires et nerveux ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques (CHARTON, 2017).

1.1.4.1. Tissu conjonctif

En raison de la forte quantité de lait qui y est stockée et du sang qui y circule en permanence, ce tissu joue un rôle de maintien et de soutien de la glande mammaire, et il est de deux types dans la mamelle :

- **Le tissu conjonctif lâche** : constitué de cellules adipeuses entourées d'une matrice de fibres et de substance fondamentale. Présent en très grande quantité dans la glande mammaire, il enveloppe les alvéoles mammaires et les regroupe pour former des lobules puis des lobes (**Figure 1**). Chez la vache en lactation, outre son rôle d'enrobage du tissu sécréteur, il est aussi un réservoir énergétique pour la synthèse du lait.
- **Le tissu conjonctif dense** : constitué principalement des ligaments médian et latéral ainsi que des tendons. Le ligament médian, séparant le côté droit du côté gauche de la glande mammaire, est la structure de soutien la plus importante. Il est très épais et élastique, ce qui permet à la mamelle de s'adapter aux variations de quantité de lait. A l'inverse, le ligament latéral a une structure rigide. Ce dernier enveloppe toute la partie supérieure de la mamelle. Chacune de ces deux structures émet des prolongements dans le parenchyme mammaire qui contribuent au maintien de sa forme (CHARTON, 2017).

1.1.4.2. Peau

La peau assure la protection de la mamelle, et est maintenue au tissu conjonctif par des fibres élastiques. Les structures de soutien sont moins denses autour de l'implantation des trayons, ce qui explique que les trayons s'écartent les uns des autres lorsque le lait s'accumule dans la glande mammaire (PERREAU, 2014 ; CHARTON, 2017).

1.1.4.3. Tissu musculaire

Formé de fibres lisses, soutient la mamelle. De plus, puisque des fibres pénètrent dans la glande jusqu'aux cellules sécrétrices des acini, leur contraction permettra l'évacuation du lait (PERREAU, 2014).

1.1.4.4. Réseau sanguin

Il comprend deux artères qui amènent le sang à la mamelle et six veines pour le retour du sang vers le cœur. Les deux artères vont se ramifier à l'intérieur de chaque quartier jusqu'à devenir, au niveau des acini, de fins capillaires. Ces derniers vont apporter aux lactocytes les éléments nutritifs nécessaires pour l'élaboration du lait. L'importance de ce réseau sanguin est bien visible de l'extérieur et révèle une irrigation sanguine très importante bien en rapport avec l'activité mammaire (PERREAU, 2014).

1.1.4.5. Réseau lymphatique

Très développé à l'intérieur de la mamelle (**Figure 3**) et des ganglions sont présents au niveau des quartiers arrière (PERREAU, 2014).

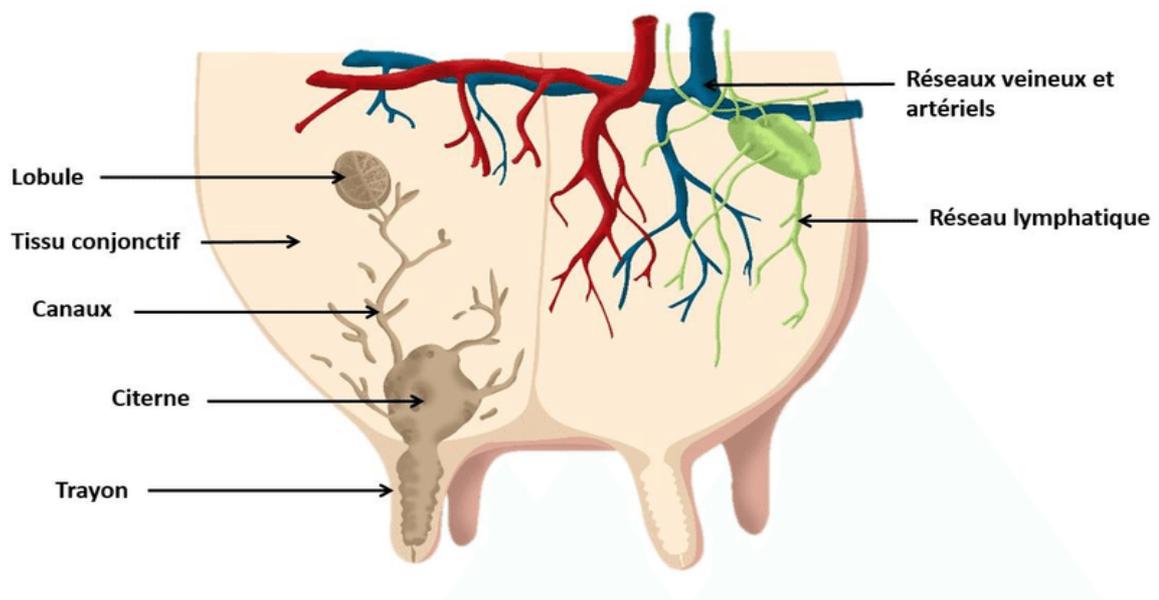


Figure 3 : Constitution générale de la glande mammaire (CHARTON, 2017).

1.1.4.6. Tissu nerveux mammaire

Bien développé, en particulier au niveau des trayons. Les nerfs sensitifs transmettent les sensations ressenties pendant la traite et avant avec sa préparation. De ce fait, la qualité de ces opérations conditionnera le réflexe d'éjection du lait (PERREAU, 2014).

1.2. Physiologie de la sécrétion lactifère

La lactogénèse est le déclenchement de la sécrétion de lait suite à la mise-bas. Elle s'inscrit dans une succession d'événements débutant au cours de la gestation, assurant la préparation et l'adaptation de la mamelle et de l'ensemble du métabolisme maternel. Ces modifications sont sous le contrôle de différentes hormones, principalement des œstrogènes en alternance avec de la progestérone qui stimulent le développement des canaux et des acini pendant la fin de gestation (CAUTY et PERREAU, 2009). Le lait est synthétisé par les cellules sécrétrices situées sur la face interne des acini (**Figure 4**).

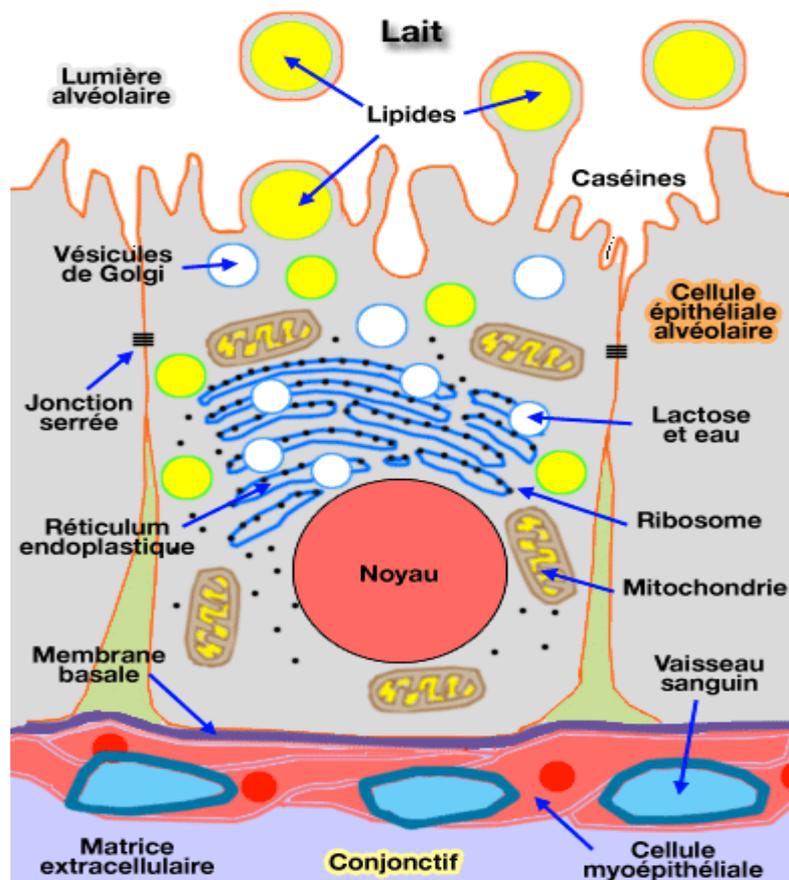


Figure 4 : Synthèse du lait dans une cellule alvéolaire (DELOUIS et RICHARD, 1991).

Le processus de fabrication du lait par une cellule se produit environs trois fois par 24 heures. Ainsi, étant donné le nombre très important de cellules sécrétrices présentes dans la mamelle, l'élaboration du lait s'effectue constamment, de manière régulière, à l'échelle d'une journée. Parmi les constituants du lait, il faut distinguer ceux qui sont synthétisés par les cellules sécrétrices de la mamelle : le lactose, les caséines et les matières grasses, de ceux qui sont directement prélevés dans le sang et incorporés sans transformation dans le lait : les protéines sériques (notamment les immunoglobulines), les éléments minéraux, les vitamines, l'urée, les enzymes et les hormones (PERREAU, 2014).

1.3. Facteurs de variation de la production laitière

Les qualités et propriétés du lait varient nécessairement selon les animaux dont il provient. Elles varient encore chez un même animal suivant un grand nombre de circonstances, telles que la race, l'âge, le régime, etc. (LARBALETRIER, 2015).

1.3.1. Ecartés liés aux caractéristiques des animaux

1.3.1.1. Race

Les différentes races n'ont pas toutes le même niveau de production et ne fournissent pas un lait de composition strictement identique. Les races de montagne, bien que moins productives, fournissent un lait avec une meilleure aptitude à la transformation fromagère (PERREAU, 2014).

1.3.1.2. Individualité

Il existe une grande variabilité entre individus d'une même espèce et d'une même race, y compris lorsque les conditions d'élevage et le statut physiologique des animaux sont identiques. L'amplitude de cette variabilité individuelle est nettement supérieure à celle observée entre races (BERTHELOT, 2018).

1.3.1.3. Niveau génétique des individus

La performance d'un animal est la résultante de son potentiel génétique et des conditions d'élevage dans lesquelles il est entretenu. Il paraît donc que la performance d'un animal est toujours inférieure ou égale à son potentiel génétique (BOUJENANE, 2003).

1.3.1.4. Age

La production du lait est en corrélation trop évidente avec l'âge. Elle augmente depuis le premier part jusqu'au sixième, puis va en diminuant du septième au quatorzième. Toutefois, les jeunes vaches sont faibles laitières (LARBALETRIER, 2015).

1.3.1.5. Stade de lactation

Le stade de lactation a une influence sur la composition du lait, en raison de l'effet de dilution. Les périodes, où la quantité de lait produite est importante, seront aussi celles où les taux (TP, TB) seront les plus faibles (CAUTY et PERREAU, 2009). Ainsi les concentrations du lait en matières grasses et matières protéiques sont les plus faibles au pic. Cependant, sitôt ce cap passé, parallèlement à la baisse de la quantité de lait produite, elles s'élèvent progressivement au cours de la phase descendante pour atteindre leur maximum en fin de lactation (PERREAU, 2014).

1.3.2. Facteurs environnementaux

Il s'agit de divers éléments en rapport avec les conditions dans lesquelles les vaches vont réaliser leur lactation (PERREAU, 2014). La durée du jour agit sur la synthèse de la prolactine, hormone provoquant la sécrétion du lait par la mamelle. Des jours longs tendent à faire augmenter la quantité de lait produite. Quant à la température, son influence se fait sentir lorsqu'on s'éloigne des valeurs de confort. Des températures négatives vont faire chuter la quantité de lait produite ; des valeurs trop élevées supérieures à 30°C font chuter la production et les taux (CAUTY et PERREAU, 2009).

1.3.3. Facteurs liés à la conduite du troupeau

1.3.3.1. Traite des vaches

Selon PERREAU (2014), trois traites par jour augmentent les quantités produites par l'animal alors que la monotraite les réduit ; à l'inverse, la suppression d'une traite par semaine, même bien gérée, a un léger impact négatif à ce niveau. Aussi, il rapporte que les premiers jets sont pauvres en matières grasses, alors que les derniers en sont plus pourvus. Le lait résiduel, évacué en fin de traite, a donc une plus forte teneur en matières grasses, d'où l'intérêt d'une traite complète. De plus, lorsque la fréquence de traite augmente, les taux ont

tendance à diminuer par effet de dilution de la matière fabriquée dans une plus grande quantité de lait.

1.3.3.2. Alimentation

La qualité nutritionnelle du lait évolue très nettement selon l'alimentation des femelles laitières, principalement au niveau de la teneur en matières grasses et de leur composition en acides gras et en vitamines liposolubles. De plus, le niveau des apports alimentaires (énergétiques et azotés) joue un rôle important sur la production laitière, mais aussi sur la composition du lait et sur son aptitude à la transformation fromagère. Notons qu'une augmentation du niveau des apports énergétiques s'accompagne d'une augmentation de production et du taux protéique et, en général, d'une diminution du taux butyreux (BERTHELOT, 2018).

Les variations du taux protéique dues à l'alimentation n'entraînent pas de modification du rapport caséines/protéines totales du lait ; elles ont ainsi un effet direct sur la consistance du caillé obtenu par coagulation et sur le rendement fromager. Aussi, la composition ou la diversité botanique des fourrages semblent avoir très peu d'effet sur la composition physicochimique du lait et sur sa qualité technologique. En revanche, une augmentation de la part de concentré dans la ration des vaches, entraîne une diminution du taux butyreux du lait. La libre disposition fréquente ou mieux permanente d'une eau appétente et fraîche est primordiale pour soutenir la production laitière (WOLTER et PONTER, 2012).

1.3.3.3. Etat de santé des animaux

D'après PERREAU (2014), les divers troubles de santé que peuvent rencontrer les vaches au cours de leur lactation vont pénaliser leur production en rompant l'équilibre fragile d'un bon état de santé. Ce sera le cas notamment avec les mammites, les maladies métaboliques et les boiteries. En effet, les animaux atteints de troubles divers ont un appétit réduit et en lien avec la douleur et le mal-être qu'ils ressentent, ce qui diminue la disponibilité en nutriments utiles pour la production. De plus, dans le cas des troubles de locomotion, l'animal minimise ses déplacements pour s'alimenter, ce qui accentue la réduction des quantités ingérées. Enfin, lors de mammites sévères en début de lactation, le niveau au pic est compromis et la quantité

produite sur la lactation s'en trouve réduite. SERIEYS (2015), conclue que la maîtrise de la santé est donc l'une des clés de la rentabilité en élevage laitier.



Chapitre II

Paramètres de qualité du lait

cru issu de mamelles saines

2.1. Généralités sur le lait

2.1.1. Définition et importance

Le lait a été défini de façon officielle dès 1908 lors du 1^{er} Congrès international pour la Répression des fraudes alimentaires et pharmaceutiques *“le produit intégral de la traite complète et ininterrompue d’une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée”* (BERTHELOT, 2018). Il a également été défini par LARBALETRIER (2015), comme étant un liquide blanc à reflets plus ou moins bleuâtres, onctueux et gras ; doué d’une légère odeur aromatique qui rappelle un tant soit peu l’animal dont il provient. Ce liquide, de pH d’environ 6,6-6,8, est sécrété par la glande mammaire des femelles de mammifères et adapté aux besoins de leur progéniture, intéresse tout spécialement les humains compte tenu de sa composition qui en fait un aliment avec des caractéristiques nutritionnelles également adaptées à notre espèce (PERREAU, 2014).

2.1.2. Propriétés physico-chimiques du lait cru issu de mamelle saine

Les principales propriétés physico-chimiques utilisées dans l’industrie laitière sont la masse volumique ou la densité, le point d’ébullition, le point de congélation, et l’acidité (VIGNOLA, 2002). Ceci se résume comme suit :

- la densité du lait varie entre 1,028 et 1,035 pour une moyenne de 1,032 à 15°C ;
- le point d’ébullition est à 100,5°C ;
- le lait congèle à -0.555°C. C’est la caractéristique la plus constante du lait car elle est directement liée à sa pression osmotique. Sa mesure est utilisée pour déceler le mouillage. Si le point de congélation est supérieur à -0.53°C, on suspectera une addition d’eau ;
- un lait normal a un pH compris entre 6,6 et 6,8. Un lait plus bas résulte soit d’une contamination par une flore acidifiante soit de la présence de colostrum. Un lait alcalin est un lait pathologique (lait de mammite);
- l’acidité titrable exprimée en degré Dornic (°D) est de l’ordre de 15 à 18°D (JEANTET *et al.*, 2017).

2.1.3. Composition du lait

D'après JEANTET *et al* (2017), les composants du lait se répartissent dans trois phases :

- une phase lipidique sous forme de globules gras émulsionnés dans la phase écrémée du lait ;
- une dispersion de colloïdes de nature protéique (micelle de caséines, protéines solubles) ;
- une solution vraie (lactose, sels minéraux, azote non protéique).

Tableau I: Composition moyenne du lait de vache JEANTET *et al.* (2017).

Constituants plastiques (g.kg⁻¹)	
Eau	870-875
Matières sèches	125-135
Matières azotées (33-36 g.kg⁻¹)	
Caséines	26
Protéines solubles	5-6
Azote non protéique	1.5-2
Matière grasse	35-45
Extrait sec dégraissé	85-90
Matières salines	8-9.5
Lactose	48-50
Biocatalyseurs (traces)	
Pigments, enzymes, vitamines, micro-organismes	
Gaz dissous	
Gaz carbonique-oxygène-azote (4 à 5% du volume de lait à la sortie de la mamelle)	

2.1.3.1. Matières azotées totales du lait

La dénomination «matières azotées totales» regroupe les protéines (Taux Protéique), ainsi que l'azote non protéique (COURTET LEYMARIOS, 2010). Le taux protéique (TP) est une caractéristique importante du lait ; il conditionne sa valeur marchande. En effet, plus le TP est élevé et plus le rendement de la transformation sera bon (CROGUENNEC *et al*, 2008). Le lait de vache contient environ 5,3 g. kg⁻¹ d'azote dont 95% sous forme de protéines. La

composition protéique des laits (**Tableau II**) se caractérise par une grande hétérogénéité. Sur la base de la précipitation à pH 4,6 on sépare :

- ✚ **Les caséines** : protéines coagulables ; elles sont au nombre de 4 (α_{S1} , α_{S2} , β et κ) et représentent 80% des protéines ;
- ✚ **Les protéines solubles** : fraction complexe ; on y trouve des protéines synthétisées au niveau de la cellule mammaire (α -lactalbumine, β -lactoglobuline), des protéines d'origine sanguine (bovine sérum albumine, immunoglobulines) et des produits d'hydrolyse de certaines caséines (protéoses peptones) (JEANTET *et al*, 2017).

Tableau II: Teneur des différentes protéines du lait de vache (WALSTRA et JENNESS, 1984).

	Concentration (g.kg ⁻¹)	Dans le lait (mmol.m ⁻³)	Pourcentage des protéines totales
Protéines totales	33,0	1490	100,0
Caséines totales	26,0	1170	79,5
Protéines solubles	6,3	320	19,3
Protéines de la membrane du globule gras	0,4		1,2
Caséines α_{S1}	10,0	440	30,6
Caséines α_{S2}	2,6	110	8,0
Caséines β	9,3	400	28,4
Caséines γ	0,8	40	2,4
Caséines κ	3,3	180	10,1
α-Lactalbumine	1,2	90	3,7
β-lactoglobuline	3,2	180	10,1
BSA	0,4	6	1,2
Immunoglobulines	0,7	4	2,1
Divers (incluant les protéoses peptones)	0,8	40	2,4

BSA : bovine sérum albumine.

2.1.3.1.1. Caséines du lait

Selon JEANTET *et al* (2017), ces protéines comptent un certain nombre de caractères communs (**Tableau III**) : la présence de phosphore sous forme de groupements phosphoséryls, leur richesse en certains acides aminés (Glu – Leu – Pro) et la forte proportion de résidus apolaires.

Tableau III: Caractéristiques physicochimiques des caséines (SCHMIDT, 1982 ; SWAISGOOD, 1982 ; WALSTRA et JENNESS, 1984).

	αS_1	αS_2	β	κ
Masse moléculaire	23614	25230	23983	19023
Résidus d'acides aminés	199	207	209	169
Résidus cystéine		2		2
Groupements phosphoséryls	8-9	10-13	5	1-2
Glucides (g. 100⁻¹ g de caséine)				5
Hydrophobie (kJ/résidu)	4,9	4,7	5,6	5,1
Charge à pH 6,6	-20,9	-14,8	-12,3	-3,0
Sensibilité à la chymosine	+		+	+++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

Le nombre de charges négatives confère à ces caséines (notamment αS et β) l'une de leurs propriétés principales, à savoir leur pouvoir de fixation du calcium. La caséine κ se distingue des autres par la présence de glucides dont la teneur différencie 7 formes (κ_1 à κ_7). Son extrémité N-terminale porte des charges positives et présente un caractère hydrophobe marqué, alors que l'extrémité C-terminale est très hydrophile et dépend du degré de glycosylation. Cette caséine a la propriété de former avec les autres caséines des complexes stables en présence de calcium et a un rôle de colloïde protecteur. Elle présente une très grande sensibilité à l'action de la chymosine au niveau de la liaison Phe-Met (105-106) (JEANTET *et al*, 2017).

2.1.3.1.2. Protéines solubles

Les deux principales protéines sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine, qui représentent respectivement 45% et 25% des protéines solubles. Viennent ensuite bovine sérum albumine et les immunoglobulines (12%), et enfin les protéoses peptones (13%) qui proviennent pour une grande part de la dégradation de la caséine par la plasmine. Elles ne sont pas coagulées par les enzymes coagulantes contrairement aux caséines ; en revanche, elles s'insolubilisent avec les caséines à pH acide lorsqu'elles sont dénaturées. Elles présentent une forte hydrophilie qui peut être utilisée en fromagerie pour augmenter la rétention d'eau dans le caillé. A contrario, l'égouttage du caillé s'en trouve ralenti (JEANTET *et al*, 2017).

2.1.3.1.3. Matières azotées non protéiques

Substances de bas poids moléculaire dont la teneur varie en fonction de l'alimentation. Le constituant le plus important est l'urée mais on trouve aussi des bases organiques, des peptides, des acides aminés, etc. (JEANTET *et al*, 2017).

2.1.3.2. Composition biologique du lait cru

D'après FREDOT (2012), le lait cru de mélange provenant d'une traite effectuée dans des conditions aseptiques, est normalement dépourvu de micro-organismes. Cependant, ce lait contient naturellement des flores microbiennes ou fongiques d'intérêt technologique, qui participent positivement à sa transformation (BERTHELOT, 2018). Même à la sortie de la mamelle, le nombre de germes reste faible malgré la température du lait, sa richesse en eau et sa teneur en glucides car le lait frais présente à lui seul un pouvoir bactériostatique d'où une multiplication quasi inexistante pendant les premières heures suivant la traite (FREDOT, 2012). Il peut cependant être contaminé par des flores d'altération, sans danger pour la santé mais peuvent poser problème au cours de la fabrication, ou par des flores pathogènes, susceptibles d'engendrer des maladies chez l'homme. Les normes relatives au lait concernent des germes pathogènes (*Salmonelles*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*...), ainsi que des toxines (mycotoxines...) et résidus médicamenteux (antibiotiques...) ou chimiques (dioxines, plomb, pesticides...). Le respect des normes relatives aux microorganismes pathogènes est plus ou moins aisé, selon le traitement du lait avant la mise en fabrication et le type de produit fabriqué. Cependant, les germes pathogènes

sont partiellement détruits par son chauffage avant la fabrication (thermisation ou pasteurisation) ; et dans le cadre de fabrication au lait cru, le respect des normes sanitaires est lié en premier lieu à la qualité microbiologique du lait mis en fabrication, dans la mesure où les effets correcteurs du procédé technologique sont très limités (BERTHELOT, 2018).

2.2. Qu'entend-on par "qualité du lait" ?

La qualité du lait est généralement déclinée en qualité intrinsèque, liée à sa composition, et en qualité extrinsèque, liée aux services attendus par le consommateur. Cette dernière comprend l'image véhiculée par le lait, qui dépend en partie des conditions de production, des impacts environnementaux associés, du prix, de la facilité d'utilisation, etc. La qualité intrinsèque du lait s'apprécie de façon différente selon l'utilisation prévue (BERTHELOT, 2018). L'industrie laitière, pour être capable de proposer aux consommateurs des produits finis de qualité, a des exigences au niveau de la matière première qu'elle va travailler.

Pour que les laiteries disposent d'un lait de mélange de qualité, sachant qu'il résulte de la collecte de nombreuses exploitations, il faut la participation de tous les éleveurs afin d'obtenir, dès le départ des fermes, du lait répondant à toutes les exigences. De plus, le volet sanitaire irréprochable est un impératif incontournable (CAUTY et PERREAU, 2009).

Tableau IV : Les objectifs pour la qualité visés par l'éleveur (CAUTY et PERREAU, 2009).

Critères	Objectifs
Taux de MG	38 g/L
Taux de MP	>32 g/L
Germes totaux	50 000 à 100 000 germes/mL
Cellules	<200 000 à 300 000/mL
Point de congélation	Max -0,52°C
Spoires butyriques	Max 500 spores/L
Lipolyse	Max : 0,17g d'acide oléique
Inhibiteurs	Absence totale
Germes thermorésistants	Absence quasi-totale
Germes pathogènes	Absence totale pour <i>Listéria</i> et <i>Salmonella</i> Les coliformes et les staphylocoques peuvent être tolérés s'ils ne dépassent pas un certain seuil défini par produit.

MG : matières grasses ; **MP** : matières protéiques.

2.3. Propriétés technologiques du lait

D'après LARBALETRIER (2015), le lait est un liquide instable qui, sous l'influence d'un assez grand nombre de causes, s'altère et la modification qu'il subit est alors définitive. Des recherches ont été menées pour retirer de ce liquide les précieux éléments nutritifs qu'il renferme pour en constituer des aliments se conservant mieux. La fabrication fromagère, remplit d'une manière à peu près complète tous ces considerata. Quelque soit la variété de fromage que l'on se propose de fabriquer, la première opération à faire est la coagulation du lait.

2.3.1. Coagulation du lait en fromagerie

La coagulation résulte d'une déstabilisation des micelles de caséines qui induit un changement d'état irréversible du lait de l'état liquide à l'état semi-solide, appelé gel ou coagulum. Tous les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagère, car ils présentent un certain nombre de caractéristiques différentes: richesse et composition en

caséines, équilibres salins, teneur en lactose, qualité hygiénique, pH, etc (JEANTET *et al*, 2017). Les matières grasses ne sont pas impliquées directement dans le mécanisme de coagulation, mais elles sont retenues dans le fromage et influencent son rendement (HURTAUD *et al*, 2001 ; COUVREUR et HURTAUD, 2007).

JEANTET *et al*. (2017) ont résumé les trois types de coagulation (**Figure 5**) :

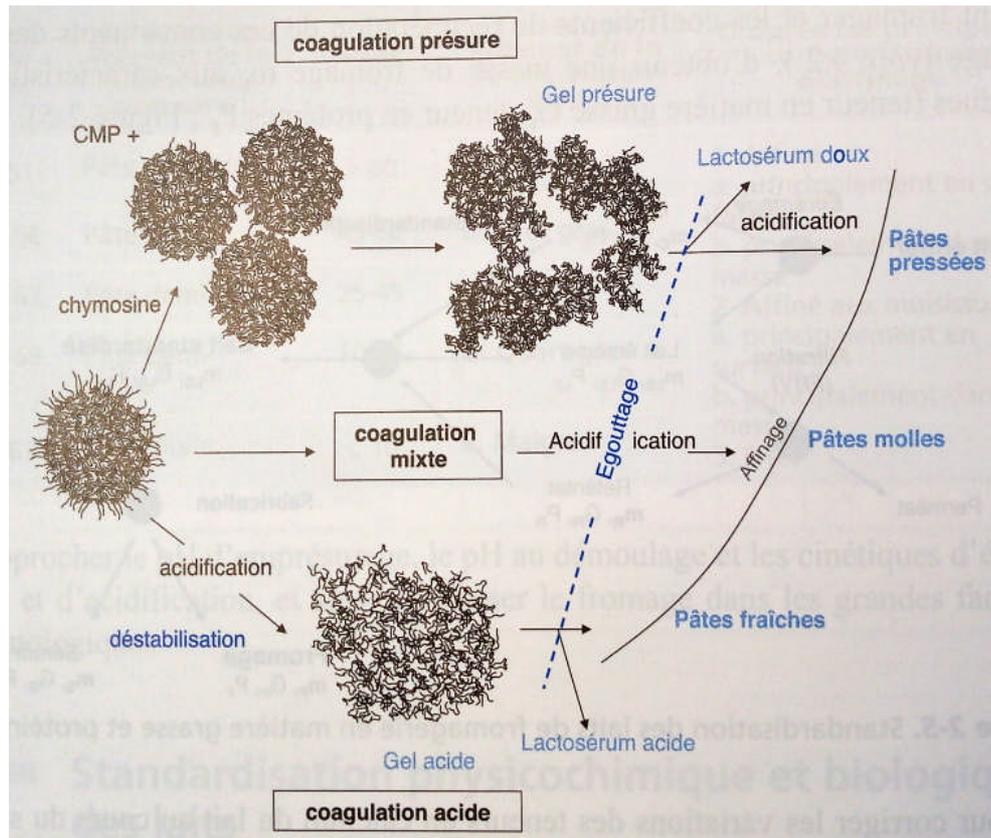


Figure 5 : Types de coagulation et diversité fromagère (JEANTET *et al*, 2017).

🚧 **La coagulation acide** : consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique ($pH_i=4,6$) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques, ou par acidification chimique via l'injection de CO_2 , addition de glucano- δ -lactone ou l'ajout de protéines sériques à pH acide.

🚧 **La coagulation enzymatique** : consiste à transformer le lait de l'état liquide à l'état gel par action d'enzymes protéolytiques, le plus souvent d'origine animale : la présure mélange de chymosine et de pepsine.

La chymosine présente une spécificité de site sur la caséine κ au niveau de la liaison peptidique Phe₁₀₅ et Met₁₀₆. En éliminant la partie C-terminale de la caséine κ , l'enzyme déstabilise les micelles de caséines qui s'agrègent passant par trois phases (**Figure 6**) :

- ☞ phase primaire ou enzymatique, correspondant à l'hydrolyse de la caséine κ au niveau de la liaison Phe₁₀₅ et Met₁₀₆ par la chymosine, d'où libération du caséino-macropéptide hydrophile (CMP), composé de 7 fractions qui se distinguent entre-elles par leur taux de glycosylation et joue un rôle dans la stabilité de la micelle. On le retrouve après hydrolyse dans le lactosérum ;
- ☞ phase secondaire ou d'agrégation des micelles déstabilisées, qui, à pH 6,6, commence lorsque 80 à 90% de la caséine κ est hydrolysée. La libération du CMP dans le lactosérum entraîne la diminution du degré d'hydratation et du potentiel de surface de la micelle. Des liaisons hydrophobes et électrostatiques s'établissent alors entre les micelles modifiées, conduisant à la formation du gel ;
- ☞ phase tertiaire ou phase de réticulation, conduisant à la formation du gel par réorganisation profonde des micelles agrégées.

Compte tenu des interactions entre le calcium et les caséines, le réseau formé est fortement minéralisé; le coagulum a donc tendance à se rétracter d'où expulsion du sérum.

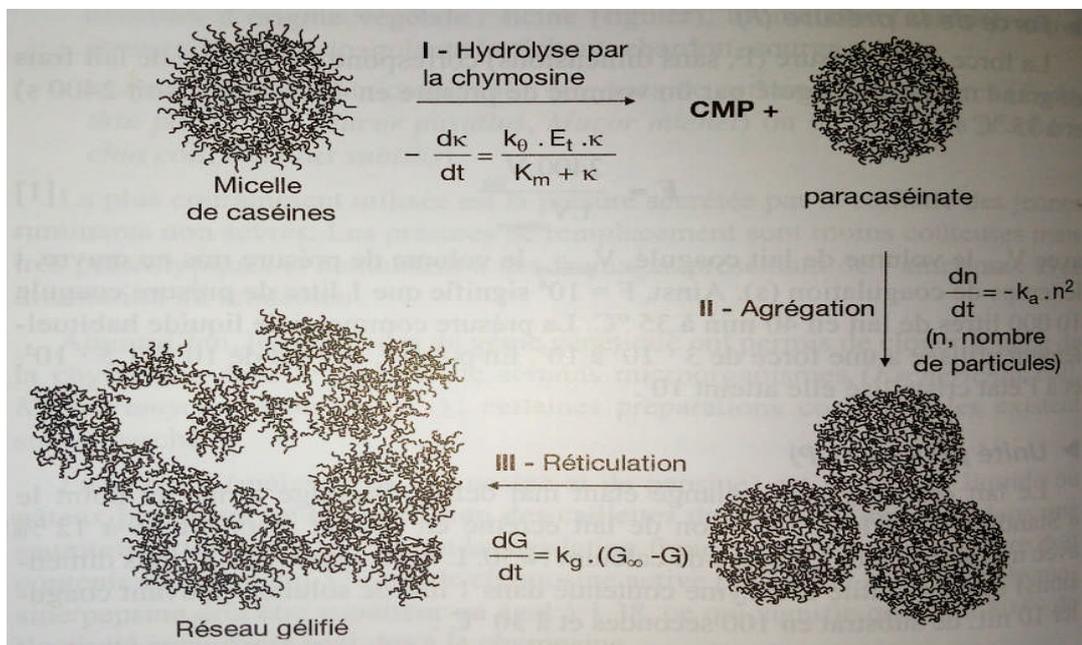


Figure 6 : Modification de la structure micellaire au cours de la coagulation présure (CROGUENNEC *et al*, 2008).

La coagulation mixte : résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification.

2.3.2. Présure commerciale et coagulation

D'après JEANTET *et al* (2017), la coagulation autrefois essentiellement réalisée par de la présure animale, est maintenant au niveau mondial à plus de 50% le fait de chymosine produite par fermentation (FPC). L'activité de ces préparations commerciales est le plus souvent déterminée par la mesure du temps de coagulation du lait.

- **Force de la présure (F)**

Correspond au volume de lait frais de grand mélange coagulé par un volume de présure en 40 minutes (soit 2400 s) et à 35°C :

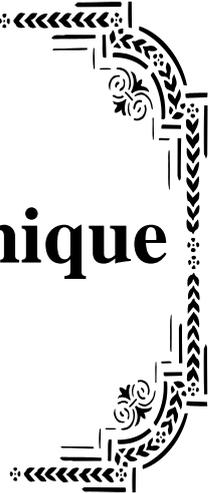
$$F = \frac{2400 \cdot V \text{ lait}}{t \cdot V \text{ présure}}$$

Avec V_{lait} : le volume de lait coagulé, $V_{\text{présure}}$: le volume de présure mis en œuvre, t : le temps de coagulation (s).

- **Unité présure (UP)**

Quantité d'enzyme contenue dans 1mL de solution pouvant coaguler 10mL de substrat en 100 secondes et à 30°C :

$$UP = \frac{10 \cdot V \text{ lait}}{t \cdot V \text{ présure}}$$



Chapitre III

Impact de la mammite subclinique sur la qualité du lait

Les laits de vaches sont considérés comme sains jusqu'à environ 70 000 cellules somatiques/mL. Les divers germes pathogènes à l'origine de la mammite provoquent une élévation plus ou moins forte du taux de cellules, ainsi que des modifications spécifiques de composition du lait. Le lait de femelles atteintes de mammites est impropre à la consommation humaine et à la transformation, car certains germes responsables de l'infection sont susceptibles d'être pathogènes pour l'homme (*Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* notamment) (BERTHELOT, 2018).

3.1. Infections intramammaires chez la vache laitière

3.1.1. Définition de la mammite

La mammite est définie comme étant l'inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la glande mammaire, caractérisée par des changements physique, chimique et microbiologique de la sécrétion lactée ainsi que des modifications pathologiques dans le tissu mammaire (SHARIF et MUHAMMAD, 2009).

3.1.2. Origines de la contamination

Les germes de contamination ont d'après PERREAU (2014), plusieurs origines (**Figure 7**): ceux dits "de traite" et ceux qualifiés "d'environnement" :

- ✚ avec les germes d'environnement, on trouve entre autres *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Arcanobacterium pyogenes* dont la contamination aura lieu lors de l'évolution des vaches dans leur milieu de vie, en bâtiment lors du couchage des animaux, à l'extérieur par les éclaboussures lors du passage dans les flaques ou dans un pédiluve malpropre;
- ✚ avec les germes de traite, entre autres *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* et *Corynebacterium bovis* qui se trouvent à l'intérieur de la mamelle, mais aussi à l'extérieur dans les crevasses des trayons. Les lésions de ces derniers sont donc des réservoirs à germes. La contamination peut donc avoir lieu:
 - ➔ lors du nettoyage des trayons si celui-ci est réalisé avec des lavettes collectives pour lesquelles même le passage dans un seau avec désinfectant ne sera plus, au bout d'un certain temps, efficace pour éviter la contamination d'une vache à l'autre ;
 - ➔ lorsqu'il se produit une entrée d'air dans le circuit du lait de la machine à traire, les variations de niveau de vide qui s'ensuivent entraînent le phénomène d'impact projetant

de microgouttelettes de lait près du sphincter. Le lait résiduel dans les manchons issu de la traite précédente d'une vache infectée sera alors source de contamination pour les suivantes.

Streptococcus uberis appartient à la fois aux deux catégories.

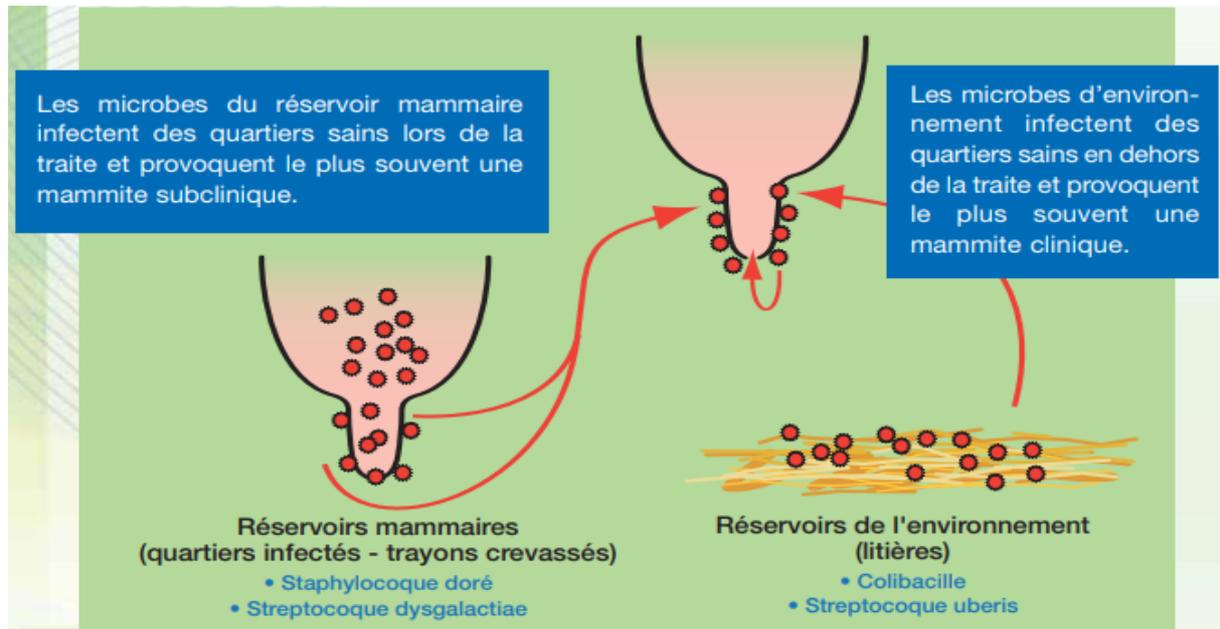


Figure 7: Transfert des bactéries responsables des mammites. Les unes sont d'origine mammaire, les autres viennent de l'environnement (GOURREAU *et al*, 2011).

3.2. Propriétés bactériologiques des *S. aureus*

Les staphylocoques sont des coques immobiles, isolés ou groupés en diplocoques ou, le plus souvent, en amas plan de plusieurs éléments, de diamètre moyen 0,8 à 1µm. Ce sont des cocci Gram positif, aéro-anaérobie facultative qui produisent une catalase et une coagulase, et peuvent tolérer une activité en eau très réduite ($A_w = 0,83$). La grande majorité des souches de *S. aureus* sont capsulées, mais elles peuvent perdre leur capsule après culture (GAUTIER et LE LOIR, 2010).

La bactérie est capable de croître sur une large gamme de milieux de culture. Sur une gélose au sang, les souches de *S. aureus* donnent des colonies lisses, convexes avec des diamètres de 1~3mm, de couleur jaune dorée due aux caroténoïdes, et sont souvent hémolytiques. En bouillon, la culture de *S. aureus* forme un trouble uniforme abondant, parfois un dépôt et un voile en surface (FRENEY *et al*, 2007 ; GAUTIER et LE LOIR, 2010).

3.3. Importance des mammites à *S. aureus*

Bactéries fréquentes, responsables de 50% des mammites subcliniques. Elles sont présentes en quantité importante dans le lait mammitique. Leurs toxines sont responsables d'intoxications alimentaires relativement bénignes (nausées, vomissement, diarrhées) mais des cas plus problématiques peuvent apparaître chez des enfants. Le problème peut se poser pour les fabrications au lait cru. *Staphylococcus aureus* est une bactérie présente sur la mamelle. Si elle pénètre à l'intérieur de cette dernière, elle provoque une mammité subclinique difficile à guérir (PERREAU, 2014). Outre le lait et la surface des épithéliums, on la retrouve quelquefois à l'état quiescent en position intracellulaire dans les cellules épithéliales mammaires ou encore dans les cellules phagocytaires, macrophages ou polynucléaires, présentes dans la sécrétion mammaire. De ce fait les infections à staphylocoque doré sont les plus difficiles à éliminer avec des taux de guérison très variables selon les élevages, le plus souvent inférieurs à 70% (SERIEYS, 2015).

3.4. Classification des mammites

3.4.1. Mammites cliniques

Les mammites cliniques s'accompagnent parfois d'une très forte réaction inflammatoire et de symptômes graves. Aux signes locaux qui peuvent être spectaculaires, sont associés des signes généraux plus ou moins intenses. Ces mammites entraînent toujours d'importantes chutes de production. Quelquefois, la perte d'un quartier ou d'autres lésions fonctionnelles irréversibles conduisant à la réforme et, exceptionnellement, à la mort de l'animal (GOURREAU *et al*, 2011).

3.4.1.1. Mammmites suraigües gangréneuse

Forme rare-mais redoutable- d'infection mammaire, due le plus souvent à des souches de staphylocoques doré productrices de l'hémolysine A. Cette toxine provoque une vasoconstriction locale prolongée qui empêche l'irrigation sanguine de la partie distale du quartier infecté, entraînant la nécrose des tissus. Forme fréquente chez les jeunes vaches que chez les plus âgées, disposant plus souvent d'anticorps contre la toxine A (GOURREAU *et al*, 2011). Le tissu mammaire, ferme et ischémique, ne sécrète plus le lait, le liquide qui envahit les canaux et les citernes est séreux, sanguinolent avec des flammèches de fibrines (RAINARD et GILBERT, 2010 ; PRESCOTT *et al*, 2010).

3.4.1.2. Mammmites cliniques aigües

Le quartier infecté est chaud, enflé et sensible. Des grumeaux sont visibles dans le lait, dont la concentration cellulaire est fortement augmentée. Il peut y avoir des symptômes généraux, avec hyperthermie, ralentissement ruminal et perte d'appétit (RAINARD et GILBERT, 2010 ; PRESCOTT *et al*, 2010).

3.4.1.3. Mammmites chroniques

Le passage à la chronicité est l'issue la plus fréquente. Les infections à *S. aureus* de la mamelle sont notoirement difficiles à traiter, ce qui conduit à la formation d'une infection chronique avec une fibrose extensive et une induration de la mamelle (PRESCOTT *et al*, 2010).

3.4.2. Mammmites subcliniques

Aucun symptôme apparent. La vache et sa mamelle semblent en parfaite santé (CAUTY et PERREAU, 2009). Il s'agit donc d'une forme invisible du trouble. En revanche, le niveau de cellules dans le lait sera plus élevé qu'en situation normale, ce qui permettra le diagnostic. En effet, les variations à la hausse de niveau cellulaire pendant la lactation témoignent de la persistance de la défense des animaux face aux attaques perpétuelles des bactéries. Les vaches "à cellules" seront donc à surveiller, car pour une partie d'entre elles, les augmentations progressives annoncent une mammite clinique. Pour d'autres, la montée se fera plus brutalement avec la même issue (PERREAU, 2014). Il est important de noter qu'une

mammite subclinique peut devenir clinique si l'immunité de la vache ne parvient plus à assurer une stase bactérienne. De même une mammite clinique peut devenir subclinique si le traitement administré ne parvient pas à éliminer les pathogènes impliqués (REMY, 2010).

3.5. Composition et propriétés physico-chimiques du lait de mammite subclinique

Les laits de vaches sont considérés selon BERTHELOT (2018), comme sains jusqu'à environ 70 000 cellules/mL. Les divers germes pathogènes à l'origine de la mammite provoquent une élévation plus ou moins forte du taux de cellules, des modifications spécifiques de composition du lait ainsi qu'une baisse des capacités de synthèse, de façon d'autant plus importante que l'infection est sévère. Les concentrations des constituants du lait provenant du sang augmentent (protéines solubles, lactoferrines, sodium et chlore...), alors que celles des constituants synthétisés par la mamelle diminuent (caséines et minéraux associés, matières grasses, lactose). Les variations les plus nettes sont l'élévation des taux de sodium et de chlore et la diminution du taux de potassium (environs -30%). Ce bouleversement des équilibres minéraux est associé à une augmentation considérable du pH, qui détériore l'aptitude du lait à la transformation fromagère : il coagule mal, se raffermite et s'égoutte moins bien et le rendement fromager est diminué. En outre, la membrane enveloppant les globules gras est altérée, les teneurs en enzymes protéolytiques et lipolytiques sont augmentées, ainsi que la teneur en acides gras libres, ce dernier point dénotant une lipolyse du lait, qui peut être multipliée par trois dans un lait avec plus de 750 000 cellules/mL par rapport à un lait sain. De plus, le lait des vaches atteintes de mammites subcliniques pose problème au niveau de ses protéines. Les anomalies sont :

- La protéolyse ;
- Un taux de protéines solubles élevé (notamment les immunoglobulines);
- Un taux de caséines plus faible du fait d'une activité mammaire réduite (CAUTY et PERREAU, 2009). Le rapport caséines/protéines totales peut passer de 77% dans un lait normal à 63% dans un lait contenant plus de 10^6 cellules somatiques .mL⁻¹.

De plus, l'activité de la plasmine est accrue et l'action des protéases leucocytaires devient importante. On assiste à :

- ↳ une dégradation des caséines et notamment les caséines α_{S2} et β par la plasmine ;
- ↳ le pH du lait peut atteindre 7 à 7,2 (JEANTET *et al*, 2017).

Matériel et méthodes



1. Objectifs et plan pratique

1.1. Objectifs de l'étude

En vue d'étudier la fréquence d'apparition des mammites subcliniques dans les élevages bovins laitiers de la wilaya de Tizi-Ouzou et leurs impacts sur la composition et la qualité technologique du lait, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- ✚ estimer la prévalence des mammites subcliniques chez les vaches laitières;
- ✚ identifier l'étiologie bactérienne et la résistance de *Staphylococcus* aux antibiotiques;
- ✚ étudier la composition physico-chimique des laits sains et mammiteux issus du même élevage;
- ✚ étudier l'activité de coagulation de la présure sur le lait mammiteux et sain.

1.2. Plan pratique

Pour répondre aux objectifs fixés dans cette étude, nous avons procédé :

- ↳ au dépistage systématique des trayons par le Californian Mastitis Test (CMT) chez les vaches en lactation ;
- ↳ au prélèvement du lait mammiteux pour analyses bactériologique et physico-chimique et du lait sain pour analyses physico-chimiques;
- ↳ à l'étude bactériologique du lait mammiteux ainsi qu'à l'identification phénotypique des staphylocoques;
- ↳ à l'analyse physico-chimique et de l'activité de coagulation des laits mammiteux et sains.

2. Matériel et méthodes

A l'exception des dosages réalisés à l'aide du Lactoscan dans un laboratoire privé à Tizi-Ouzou, les analyses bactériologiques et physico-chimiques des échantillons de lait ont été effectuée à l'université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou, au sein du laboratoire de Microbiologie et du laboratoire pédagogique de Biochimie. L'ensemble des analyses et manipulations a nécessité le recours aux matériels et méthodes indiqués ci-après :

2.1 Matériel

2.1.1. Pour le dépistage de mammites et prélèvements

Glacière, pains de glace, tubes et pots de prélèvements stériles, gants, alcool éthylique 70°, lingettes stériles, coton, réactif de CMT (Teepol : RAIDEX), palette à quatre coupelles, portoirs à tubes.



Figure 8 : Outils de dépistage des mammites subcliniques

2.1.2. Pour l'analyse microbiologique

🚩 Milieux de culture

- ↪ Milieux solides d'isolement : gélose au sang frais (GSF) : gélose nutritive (GN) additionnée de 5% de sang humain frais, gélose Chapman, gélose MacConkey.
- ↪ Milieu de culture : bouillon cœur-cerveille (Brain Heart Infusion Broth : BHIB).
- ↪ Milieu pour antibiogramme : gélose Mueller-Hinton (MH).

🚩 Matériel biologique

- ↪ Echantillons de lait de mammite subclinique, sang hépariné, plasma humain, souche de référence pour le contrôle positif : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sensible à la Méricilline.

🚩 Réactifs spécifiques et autres

- ↪ Pastorex™ Staph plus, eau oxygénée (H₂O₂), sérum physiologique stérile, disques d'antibiotiques.

✚ Appareillages et petit matériel

↳ Agitateur de tubes “Z×3 Vortex Mixer”, étuve réglée à 37°C, bain Marie, becs Bunsen, autoclave, balance de précision, pipettes Pasteur, anse de platine, boîtes Pétri simples et bi-compartmentées, écouvillons stériles, plaques d’agglutination pour Pastorex, règle, seringues et pinces bactériologiques.

2.1.3. Pour l’analyse physico-chimique

✚ Produits chimiques

↳ Solvants usuels : acide chlorhydrique 4N, acide acétique, glycérol, méthanol.

↳ Sels et tampons : carbonate de sodium anhydre, soude 0,1N, sulfate de cuivre hydraté, tartrate double de sodium et de potassium, dichlorure de calcium (CaCl₂).

↳ Colorants et réactifs spécifiques : bleu de bromophenol, bleu de coomassie R250, acrylamide, N,N-méthylène-bis-acrylamide, persulfate d’ammonium, glycine, réactif de Folin-Ciocalteu, Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane (TRIS), N,N,N’,N’-tetraméthyl-éthylène diamine (TEMED), dodécylsulfate de sodium 10% (SDS), 2-mercaptoéthanol.

✚ Matériel biologique

↳ Sérum Albumine Bovine “BSA” (SIGMA-ALDRICH, Co., USA), poudre de lait écrémé type “*low heat*”, enzyme coagulante : chymosine bovine recombinante (Chy-Max, Italie).

✚ Appareillage

↳ Analyseur automatique du lait : Lactoscan SP à alimentation électrique (100-240 V, ~1,6 A, 50-60Hz / +12V, 4,17A / 50-65W).

↳ Unité d’électrophorèse sur mini-cuves verticales (HOEFER SE 200, USA) comprenant : couleur de gel, cuves d’électrophorèse, générateur de courant (max 250V, 100mA), plaque en verre et plaque en hydroxyde d’alumine (10cm×8cm ; 10cm×12cm), espaceurs de 0,75 à 1,15mm d’épaisseur, peignes et pinces.

↳ pH-mètre (HANNA), centrifugeuse réfrigérée (SIGMA, 3-16PK), balance analytique à affichage digital 0.01g, balance de précision 0,01mg (KERN), spectrophotomètre UV-visible (SCHIMADZU, Japon), bain Marie Memmert, agitateurs variés (de tubes “VORTEX”, à plateau, à barreaux magnétiques, basculants).

Petit matériel

Les manipulations ont également nécessité l'usage d'un certain nombre d'accessoires spécifiques, notamment : verrerie de différents types, micro-seringue Hamilton, micropipette à volume fixe et variable, embouts, papier filtre, chronomètre, torche, gants et masques pour la manipulation de produits dangereux tels que l'acrylamide.

2.2. Méthodes

Dans le besoin de limiter les erreurs par excès et/ou par défaut lors de la progression de l'enquête, notre rigueur était particulièrement focalisée sur les exigences de prélèvements, de transport, puis des analyses microbiologiques et physico-chimiques des échantillons. C'est ainsi, que nous avons adopté la méthodologie suivante :

2.2.1. Population de l'étude et échantillonnage

2.2.1.1. Description de la wilaya d'étude

La wilaya de Tizi-Ouzou est une wilaya côtière, elle se situe dans la partie Nord Centre de l'Algérie. Géographiquement, cette région est un vaste bastion constitué d'une succession de chaînes de montagnes toutes d'orientation générale Est-Ouest et qui emprisonnent des plaines alluviales étroites. Administrativement, elle est divisée en 67 Communes et 21 Daïras. Le relief de la wilaya de Tizi-Ouzou est marqué par la succession et la juxtaposition de différents ensembles topographiques.

2.2.1.2. Présentation des régions

Daïra d'Ouacif

Commune et daïra rurale de Kabylie, située au Sud de la wilaya de Tizi-Ouzou et limitrophe de la wilaya de Bouira. Elle se situe à flanc de la montagne du Djurdjura.

Daïra d'Azeffoun

Le massif d'Azeffoun occupe la partie Nord-Est de la wilaya. Le relief est accidenté dominé par les pentes supérieures à 12,5% exception faite de l'embouchure des petits oueds côtiers.

Daïra d'Ouaguenoun

Les plaines de Ouaguenoun sont situées au Nord-Est de Tizi-Ouzou, délimitées par Tigzirt, Azeffoun, Azazga, Tizi-Ouzou, Makouda et Draa Ben Khedda.

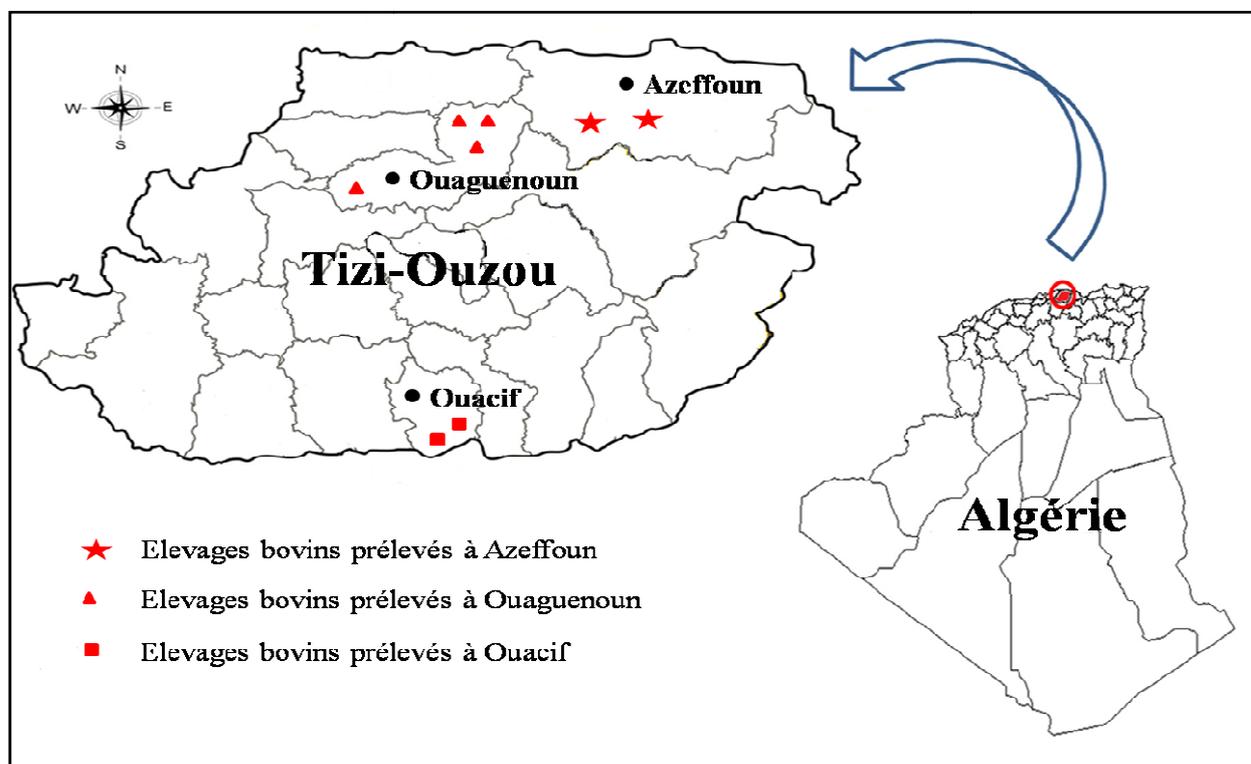


Figure 9 : Situation géographique des élevages investigués dans l'étude.

2.2.1.3. Population animale de l'étude

Durant la période allant du 22 Avril au 4 Mai 2019, trois daïras de la wilaya de Tizi-Ouzou ont été visitées pour la collecte des échantillons de lait à partir des trayons révélés positif et négatif au dépistage par le test CMT. C'est ainsi que notre enquête a porté sur un effectif de 60 vaches en lactation (soit 240 trayons dépistés) réparties comme suit : 33 vaches appartenant à quatre élevages d'Ouaguenoun, 19 vaches issus de deux élevages de Ouacif et 8 dans deux élevages à Azeffoun.

2.2.1.4. Echantillonnage

Dans l'optique de comparer les paramètres de qualité entre les laits mammitieux subcliniques et les laits sains, nous avons fixé pour objectif d'avoir au minimum une

quarantaine de trayons positifs au CMT. Ainsi, en fonction de l'effectif animal, de l'aisance d'accessibilité aux élevages et la coopération des éleveurs, nous avons investigué 240 trayons chez 60 vaches laitières appartenant à huit élevages à Tizi-Ouzou. Après dépistage pour mammites subcliniques, seules les trayons positifs étaient prélevés. Afin d'écarter toutes variations de qualité liée aux facteurs extrinsèques, des prélèvements à partir de trayons sains sont réalisés préférentiellement chez les vaches qui présentaient des trayons atteints de mammites subcliniques.

2.2.2. Enquête sur les mammites au sein des élevages

2.2.2.1. Prospection des élevages

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

2.2.2.2. Examen clinique des mamelles

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

2.2.2.3. Dépistage des mammites subcliniques

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

Pour chaque trayon, une fois les premiers jets éliminés, 2mL de lait est traité dans la coupelle correspondante de la palette de CMT, auxquelles une quantité égale du Teepol est rajoutée. Un doux mouvement circulaire dans un plan horizontal est assujéti à la palette pendant quelques secondes. Notons que le réactif de teepol fait éclater les cellules et réagit

avec leur ADN en formant un gel dont la viscosité est d'autant plus élevée que la teneur en cellules est importante :

- ↳ l'absence de gel indique un lait normal ;
- ↳ la présence de gel avec un lait modifié indique une mammite (REMY, 2010).



Figure 10 : Degrés de la réaction Teepol-lait.

Le résultat de la réaction marque le niveau de destruction des cellules somatiques et de la coagulation des acides nucléiques. Une vache est considérée atteinte d'une mammite subclinique si elle présente au minimum un trayon positif au CMT (**Annexe II**).

2.2.2.4. Collecte des prélèvements de lait

Les prélèvements de lait sont collectés, avant la traite du matin, selon les instructions de National Mastitis Council (N.M.C, 1990). Seuls les trayons positifs au CMT ont été prélevés pour analyses bactériologiques. En revanche, les prélèvements destinés aux analyses physico-chimiques ont été effectués sur les trayons atteints de mammite subclinique et les trayons sains.

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

Après élimination des premiers jets, le bouchon est ôté avec la main droite pour être tenu entre l'index et le médium de la main gauche. Le couple, tube et bouchon ont alors leur ouverture dirigée vers le bas, et ce afin d'éviter toute contamination. Sitôt, le trayon saisi de la main droite, est ramené en position latérale pour être trait presque horizontalement dans le

flacon à prélèvement. Ce dernier en position oblique au moment où le lait gicle, est porté entre le pouce et l'index de la main gauche avec un bouchon porté par l'index et le médium orienté vers le bas.

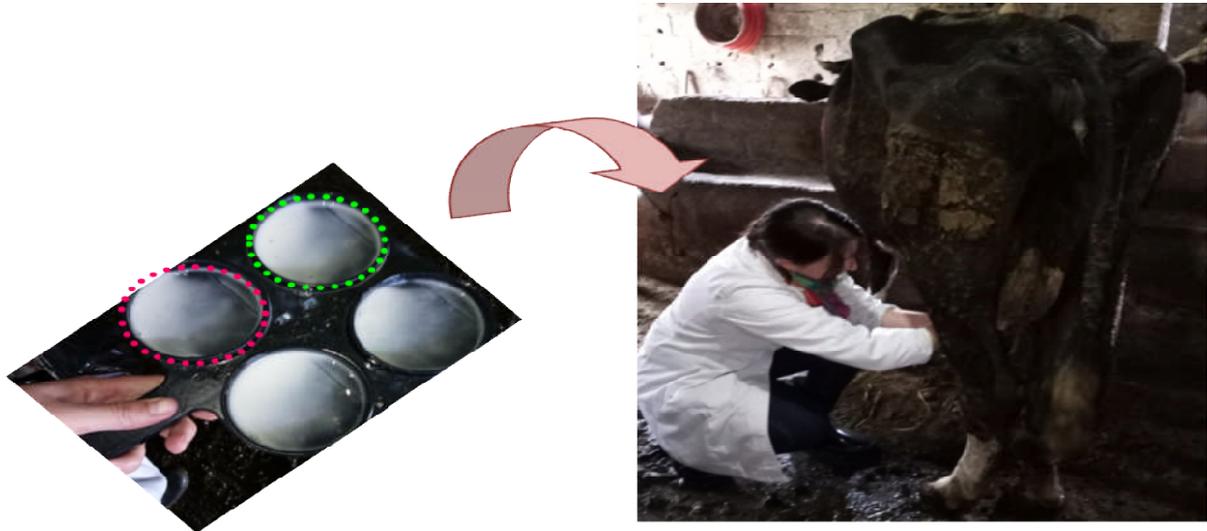


Figure 11: Dépistage des mammites subcliniques et technique de prélèvement du lait.

Enfin, le flacon est rebouché avant redressement, puis placé immédiatement dans le portoir à l'intérieur d'une glacière. A l'inverse de l'ordre de désinfection par l'alcool éthylique, l'échantillonnage des quatre trayons a débuté par le trayon le plus proche et terminé par le plus éloigné. Les prélèvements transportés dans une glacière à 4°C sont par la suite conservés par congélation à -18°C jusqu'au moment de l'analyse.

2.2.3. Isolement et caractérisation phénotypique des staphylocoques

2.2.3.1. Identification des staphylocoques

🚒 Ensemencement des échantillons de lait

Après homogénéisation des échantillons de lait décongelés au vortex à tubes, pendant cinq secondes, les milieux: gélose nutritive additionnée de 5% du sang humain frais et la gélose Chapman contenues respectivement dans les boîtes Pétri bi-compartmentées d'une part, ainsi que la gélose MacConkey contenue dans d'autres boîtes Pétri d'autre part, ont étéensemencés par 0,01mL de lait mammitieux chacun. Les boîtesensemencées, sont ensuite incubées à 37°C pendant 48 heures. Un prélèvement est considéré positif une fois une croissance minimale de

100 UFC/mL est détectée. Tout échantillons montrant plus de deux différents types de colonies sont considérés contaminés (NMC, 1990) (Figure 12).

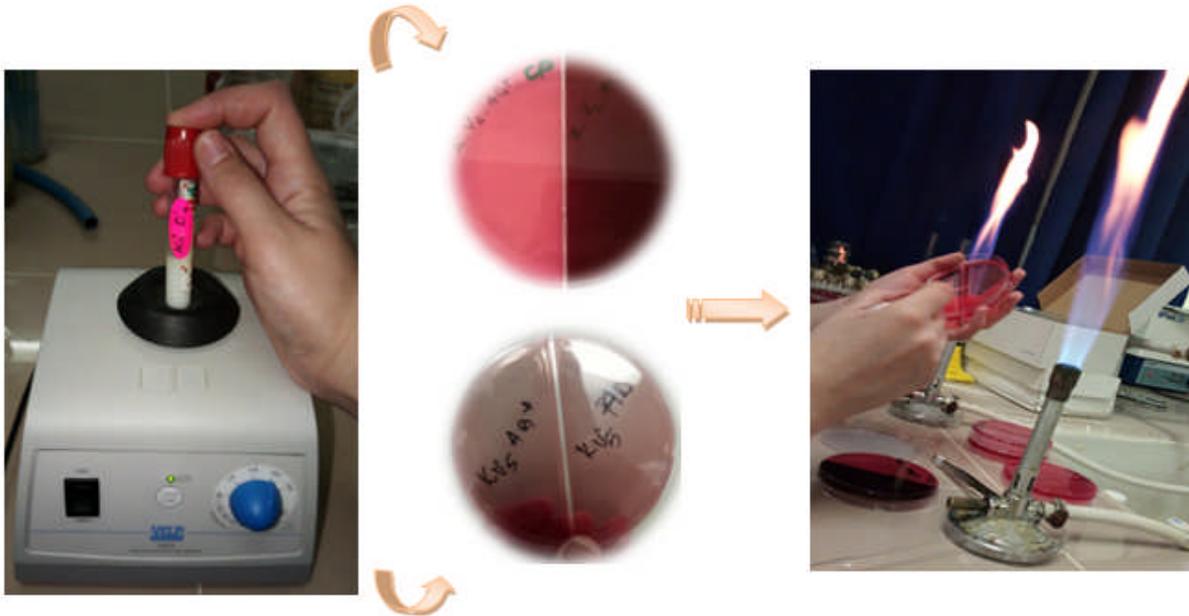


Figure 12: Ensemencement des échantillons de lait mammitieux.

Les échantillons négatifs à la primo-culture sont enrichis sur bouillon cœur-cerveille (BHIB) puis cultivés selon le même protocole précédent. En outre, toutes les colonies d'aspect caractéristique ou non caractéristique sont soumises à un test de confirmation.

Test de la catalase

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



Si la bactérie possède une catalase, il se produit un dégagement d'oxygène : on observe immédiatement une effervescence. Sinon, aucune réaction ne se produit (**Figure 13**).



Figure 13 : Technique de recherche de la catalase.

Test de Pastorex™ Staph Plus

C'est un test rapide d'agglutination sur lame pour la détection simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, de la protéine A et des polysaccharides capsulaires de *S. aureus*. Le réactif est composé du :

- ↪ **test de Latex** : un flacon de 1mL de latex rouge sensibilisé par une solution d'albumine bovine, du fibrinogène, des IgG et des anticorps monoclonaux anti-polysaccharides capsulaires de *Staphylococcus aureus* ;
- ↪ **contrôle négatif** : un flacon compte-gouttes de 1mL de réactif témoin négatif du latex rouge sensibilisé par une solution d'albumine bovine.

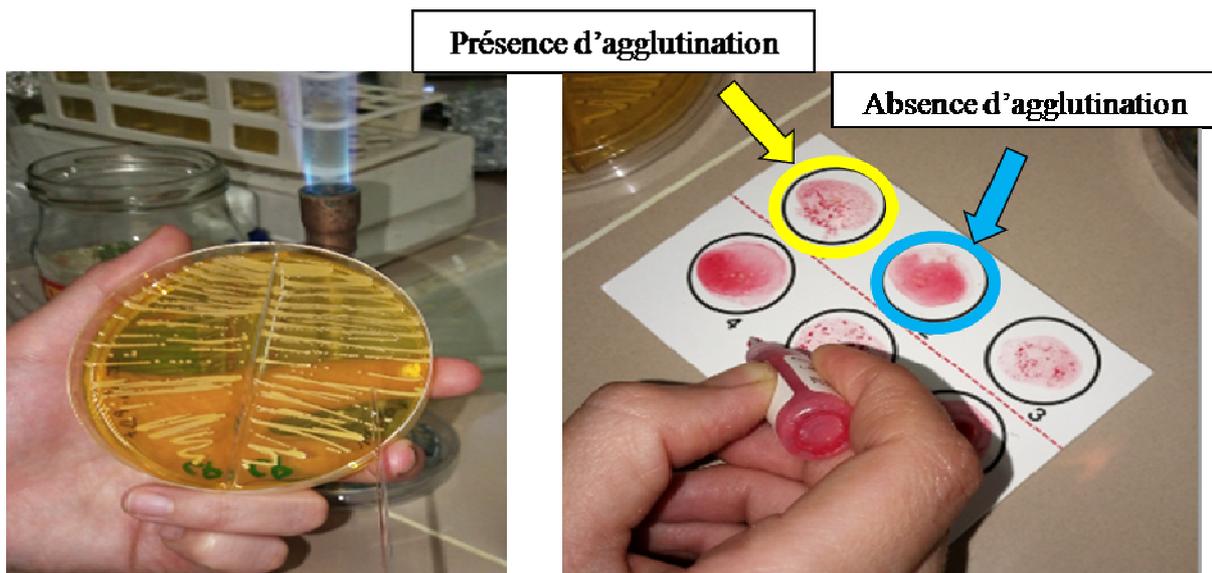


Figure 14 : Test d'agglutination sur lame.

La technique d'analyse consiste à mélanger une colonie de bactéries reconnues catalase positive avec une goutte du réactif sur une lame d'agglutination. L'apparition d'agglutinats indique que la souche est un *S. aureus*.

Test de la coagulase

Ce test permet la recherche de la coagulase, exo-enzyme capable *in vitro* de coaguler le plasma de lapin (substitué par le plasma humain dans notre cas). Dans un tube contenant environ 0,5mL de bouillon cœur-cervelle, préalablement ensemencé et incubé pendant 24 heures, un volume équivalent de plasma humain y est rajouté puis est incubé dans une étuve à 37°C pendant 4 heures. Les staphylocoques à coagulase positive coagulent le plasma au bout de quelques minutes à quelques heures, alors que le milieu reste liquide pour les bactéries à coagulase négative.



Figure 15 : Culture sur bouillon cœur-cervelle et test de coagulase

2.2.3.2. Test de sensibilité aux antibiotiques

L'étude de sensibilité aux antibiotiques est réalisée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton. La sensibilité à la pénicilline G, à l'oxacilline, à la céfoxitine, à la vancomycine, à l'érythromycine, à la spiramycine, à la clindamycine, aux tétracyclines, au chloramphénicol et à l'acide fusidique a été étudiée pour les souches de staphylocoques.

Préparation de l'inoculum et ensemencement

A partir d'une culture pure de 18 à 24h sur milieu d'isolement approprié, des colonies isolées et parfaitement identiques ont été raclées à l'aide d'un écouvillon stérile, qui est par la

suite déchargé dans 3 à 4mL de sérum physiologique stérile à 0,9%. Cette suspension bactérienne est homogénéisée. Son opacité doit être approximativement de 0,5 Mc Ferland.

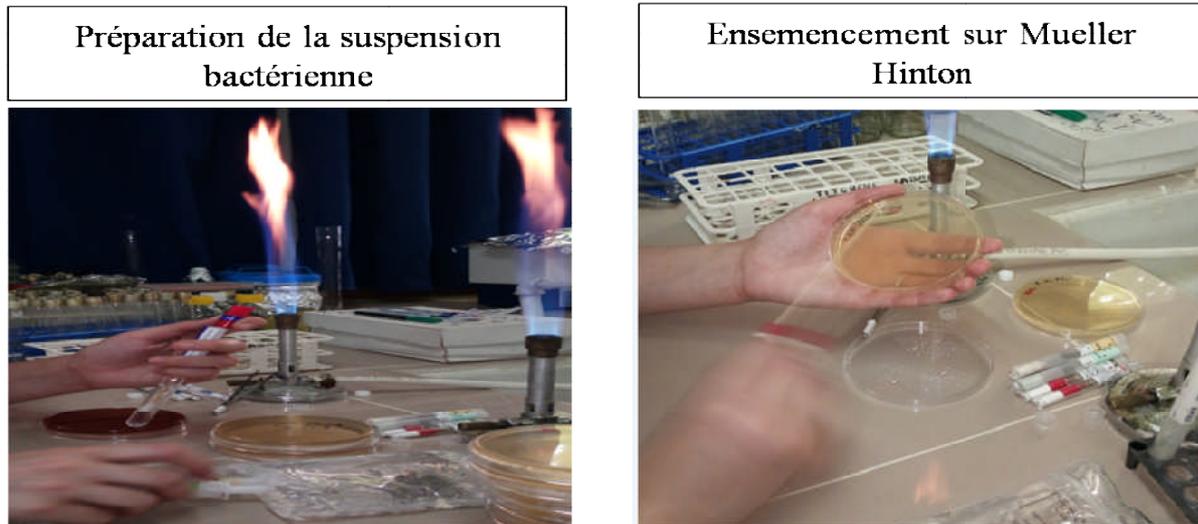


Figure 16: Préparation des suspensions et ensemencement pour antibiogramme.

Cet écouvillon est plongé puis pressé doucement en le tournant sur la paroi interne du tube afin d'éliminer le liquide en excès retenu. L'écouvillon imbibé est ensuite étalé sur la totalité de la surface gélosée (Mueller Hinton) de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, puis finir par le passer sur la périphérie de la gélose.

↳ **Application des disques d'antibiotiques et incubation**

Les disques d'antibiotiques ont été appliqués à l'aide de pinces bactériologiques stériles, en veillant à ne pas mettre plus de six disques par boîte Pétri. Les boîtes ont été incubées immédiatement après ensemencement à 37°C pendant 24h.

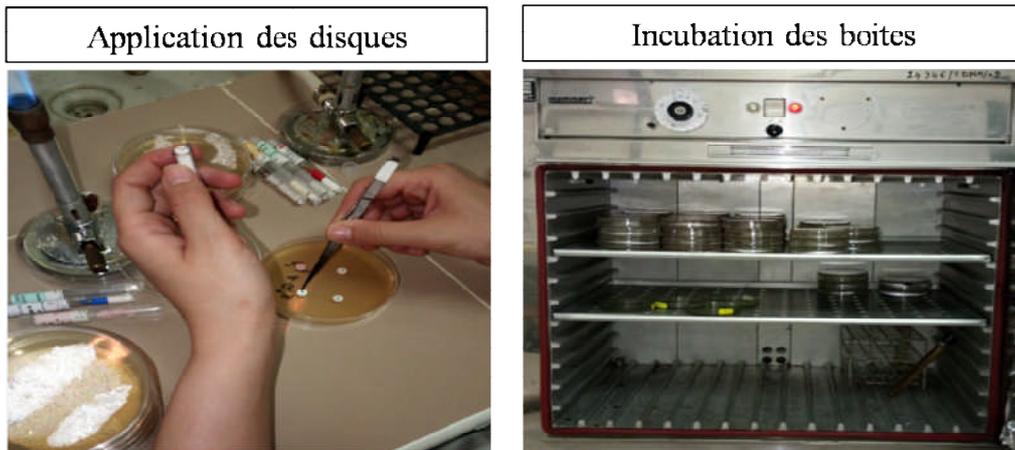


Figure 17: Application des disques et incubation des boîtes à 37°C.

↪ **Lecture**

Après incubation, un halo clair d'inhibition est créé autour de chaque disque d'antibiotique. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés avec précision à l'aide d'une règle en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Pétri fermée. Une comparaison des différents diamètres obtenus aux diamètres critiques publiés par des organisations reconnues telle que le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2019), permet de répondre qualitativement si la souche bactérienne étudiée peut être classée comme sensible (S) ou résistante (R) à l'antibiotique présent sur chaque disque (**Annexe III**)

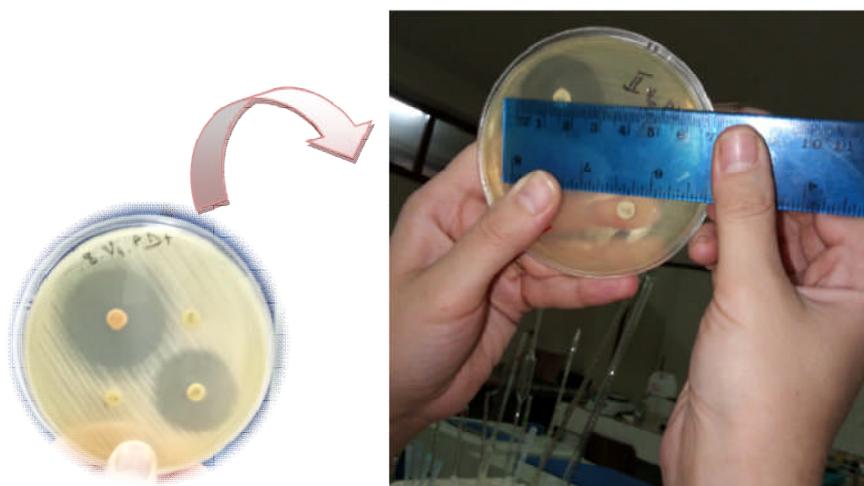


Figure 18: Estimation des diamètres des zones d'inhibition.

2.2.4. Analyses physico-chimiques des échantillons de lait

2.2.4.1. Mesure du pH

Les mesures sont basées sur une méthode potentiométrique dont le principe repose sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode dite de mesure et une autre de référence. Ces mesures sont effectuées à une température du lait de +20°C, ce qui nous renseigne sur l'état de conservation de l'échantillon, donc sur de probables changements d'état.

Après homogénéisation de l'échantillon à analyser, la valeur du pH est lue directement sur le pH-mètre après immersion de son électrode préalablement étalonnée dans le lait. La mesure est réalisée deux fois avec rinçage de l'électrode avec de l'eau distillée entre chaque mesure.



Figure 19 : Mesure du pH des échantillons de lait sains et mammites.

2.2.4.2. Détermination de la teneur en protéines

Dans le cadre des méthodes classiques, le dosage des protéines est réalisé par spectrophotométrie selon la méthode de LOWRY *et al* (1951), particulièrement adaptée au cas des protéines du lait. C'est une méthode colorimétrique basée sur l'obtention d'un composé chromogène par une réaction d'oxydoréduction, entre un réactif phosphomolybdique phosphotungstique et les acides aminés ; tyrosine et tryptophane des protéines.

Le réactif de Folin-Ciocalteu, additionné à une solution protéique diluée, est plus ou moins réduit par les protéines, notamment les groupements phénoliques du tryptophane et de la tyrosine et dans une moindre mesure, ceux de la cystéine et de l'histidine.

Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : le bleu de molybdène. Le développement maximal de la coloration se fait au moyen d'un traitement préalable par une solution alcaline contenant du cuivre (CuSO_4). L'intensité de la couleur développée, mesurée spectrométriquement à 750 nm, est proportionnelle à la concentration en protéines. Ainsi, le passage de l'absorbance, mesurée à cette longueur d'onde, à une concentration en protéines des échantillons analysés se fait par le biais d'une courbe d'étalonnage $\text{DO} = f(C)$ en utilisant l'Albumine Sérique Bovine (BSA) comme protéine étalon. (Le mode opératoire est donné en **annexe IV**).

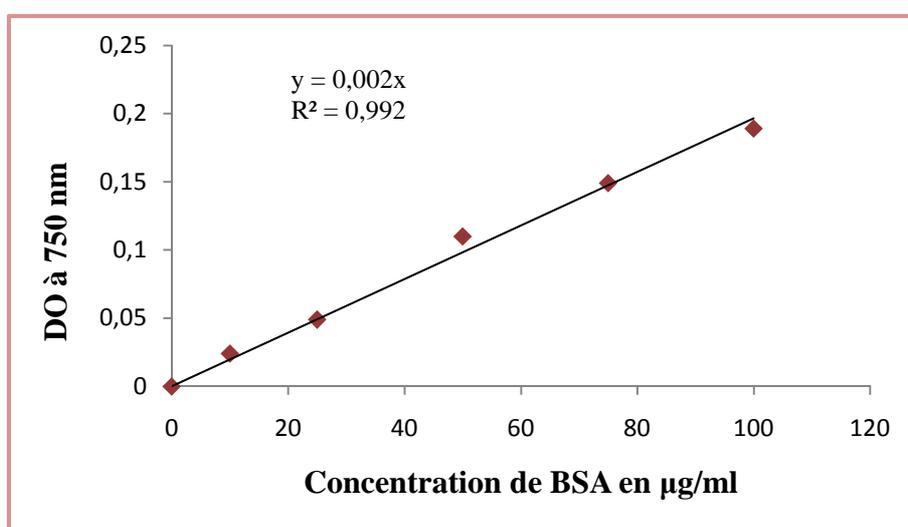


Figure 20 : Courbe étalon $\text{DO} = f[\text{BSA}]$ du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al.* (1951).

BSA= l'Albumine Sérique Bovine utilisée comme protéine étalon ; **R**= Coefficient de corrélation.

2.2.4.3. Mesure des paramètres physico-chimiques à l'aide de Lactoscan SP

La mesure des paramètres physico-chimiques a été réalisée à l'aide d'un analyseur de chimie moderne adapté à l'analyse de chaque type de lait. De conception portable et compacte (**Figure 21**), cet analyseur ultrasonique est simple en fonctionnement, entretien, étalonnage et installation.

De plus, son fonctionnement ne fait recours à aucun produit chimique dangereux et ne nécessite qu'une petite quantité d'échantillon.

Il permet d'analyser du lait rapidement (60 secondes) et avec précision et fiabilité. Une seule analyse permet de déterminer les taux de: matières grasses, extrait sec dégraissé, densité, lactose, sels, taux de mouillage, T° de l'échantillon, point de congélation, pH et la conductivité.



Figure 21 : Dosage des paramètres physico-chimiques des laits sains et mammiteux avec Lactoscan SP et impression des résultats.

2.2.5. Contrôles électrophorétiques des protéines totales des laits analysés

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Du fait de leur caractère amphotère, les protéines peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer de ce fait soit vers l'anode ou la cathode. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, elles se matérialiseront sur l'électrophorègramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes.

2.2.5.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

L'électrophorèse en gel est une des méthodes performantes pour séparer des macromolécules, et ce en tirant partie à la fois de leur mobilité électrophorétique et de la filtration sur gel.

Le polyacrylamide, gel finement réticulé, constituant une matrice de séparation en électrophorèse et qui présente les caractéristiques générales suivantes :

- obtenu à partir de monomères, est de grande pureté, résistant et transparent ;
- inerte pour les pH et les forces ioniques de tampons utilisé en séparation de protéines ; les adsorptions sont nulles.

Ces gels peuvent varier en composition. Ils sont constitués du monomère acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) qui est l'unité de base, et d'un autre monomère bifonctionnel réticulant, le N,N'-méthylène-bis-acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), qui est l'agent pontant.

La réaction de polymérisation est en général initiée par du persulfate d'ammonium en présence de l'accélérateur TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène diamine) qui catalyse la formation de radicaux libres à partir du persulfate.

Le réseau tridimensionnel du gel est formé par un mécanisme de polymérisation de type vinylique qui conduit à la formation de nombreuses chaînes enroulées au hasard.

La structure détermine un ensemble de micro-canaux dans lesquels ces molécules protéiques vont pouvoir se déplacer sous l'effet plus ou moins d'un tamisage moléculaire. La taille des pores, dépend de la concentration en monomère et en comonomère.

La densité, la viscosité, l'élasticité et la résistance mécanique du gel sont déterminées selon la concentration en monomères ainsi que le degré de polymérisation et de pontage définis par les indices T et C calculés comme suit :

$$T(\%) = (a+b/v) \times 100$$

$$C(\%) = (b/a+b) \times 100$$

T (%) : concentration totale en monomère ;

C : proportion d'agent réticulant ;

a (g) : acrylamide;

b (g) : N, N'-méthylène-bis-acrylamide;

v (ml) : volume du tampon.

2.2.5.2. Préparation des échantillons de laits pour l'électrophorèse

Ecrémage

L'écémage des échantillons de laits entiers est réalisé par centrifugation à 4000g pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée. A la fin de la centrifugation, on constate la formation d'une couche en surface correspondant à la crème du lait, qu'on racle et écarte délicatement à l'aide d'une spatule. Le lait résultant dit écrémé, est filtré à travers un papier filtre afin d'éliminer totalement la matière grasse.

Dissolution des échantillons dans leur tampon

Les échantillons de laits écrémés sains et mammiteux à analyser sont mis en solution à raison de 50 μ L dans un volume de 100 μ L de tampon d'échantillon approprié (**Annexe V**).

Le dodécyle sulfate de sodium "SDS 10%, p/v", détergent anionique et puissant agent dénaturant ; en présence d'un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, 2-mercaptoéthanol (4%, v/v), et à température élevée (3 à 4 mn à 100°C), permet de solubiliser ces protéines et de se fixer à ces dernières en leur conférant une charge négative, d'où élimination du facteur de séparation selon la charge. En effet, les différents composés ne seront différenciés par migration électrophorétique que selon leur poids moléculaire.

Après refroidissement dans un bain d'eau froide, 100 μ L d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques grains de bleu de bromophénol y sont ajoutés. Ce dernier déterminant le front de migration des protéines et permettant également de repérer la fin de l'électrophorèse.



Figure 22 : Préparation des échantillons de laits pour contrôles électrophorétiques.

2.2.5.3. Conduite de l'électrophorèse en présence du SDS et de 2-ME (PAGE-SDS).

Les électrophorèses sont réalisées selon la méthode de LAEMMLI et FAVRE (1973) en conditions dissociantes et dénaturantes (**Annexe V**), optimisée au laboratoire, conduite sur mini cuves verticales, tel qu'il est sommairement montré sur la **figure 23**.

La PAGE-SDS utilise un système biphasique, comprenant deux gels : gel de concentration faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage sur les protéines et tend plutôt à les concentrer, en les mettant sous forme de fines bandes qui arrivent au gel de séparation en même temps. La séparation a lieu au cours de la migration dans le deuxième gel, de séparation, selon leurs poids moléculaire.



Figure 23 : Photographie d'une unité d'électrophorèse

A : générateur de courant ; **B:** cuve de migration

Pour cela, nous avons utilisé un gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7%) en tampon (TRIS, 0,5M; pH 6,8) et un gel de séparation (T=12% et C=2,7%) en tampon (TRIS, 1,50M; pH8, 8). Le tampon d'électrode étant composé de (TRIS, 49mM ; glycine, 384mM ; SDS 1%, p/v ; pH 8,3).

Préparation du gel de polyacrylamide

Le gel est préparé en mélangeant les solutions d'acrylamide et de bis-acrylamide avec une solution tampon. L'ensemble est dégazé pendant 2 à 3 minutes puis additionné des agents initiateurs (persulfate d'ammonium et de TEMED).

Le mélange est immédiatement coulé entre une plaque en verre et une autre en alumine de la cuve d'électrophorèse. Un peigne y est introduit en haut de la cuve et n'est retiré qu'après polymérisation du gel et formation donc des puits où se fera le dépôt des échantillons. Ces plaques sont ensuite plongées dans un tampon d'électrode approprié.

Dépôt des échantillons

Après avoir monté les deux plaques renfermant le gel sur l'unité d'électrophorèse et rempli les cuves inférieure et supérieure de tampon d'électrode, les échantillons préalablement préparés sont déposés à raison de 5 μ L à l'aide d'une micro-seringue Hamilton dans chaque puits. Enfin, la migration des protéines sériques est réalisée à température ambiante sous une tension continue de 250V, un courant constant de 20mA et sous flux énergétique de 10W pendant environs 3heures en moyenne.



Figure 24 : Dépôt des échantillons pour la migration électrophorétique.

Révélation des bandes de migration électrophorétique

A la fin de la migration et après démoulage du gel, on lui fait subir une série d'opérations successives, notamment :

- **la fixation** : par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45 minutes ;
- **la coloration** : le gel est ensuite immergé pendant 2 à 4 heures dans une solution de coloration contenant du bleu de coomassie à 0,2% (p/v) dissous préalablement dans une solution constituée du mélange eau distillée (1volume), méthanol (1volume) et TCA à 2% (p/v) ;
- **la décoloration** : réalisée par immersion du gel dans des bains successifs formés par une solution contenant (eau/ méthanol/ acide acétique) dans les proportions respectives 3,12/ 1,5/ 0,37 (v/v/v).



Figure 25 : Révélations des bandes de migration électrophorétique.

2.2.6. Détermination de l'activité coagulante

Le suivi de l'activité coagulante est réalisé par différentes méthodes dont :

- ↳ méthodes physiques, notamment les méthodes rhéologiques, méthodes de comptage particulaire, méthodes ultrasoniques et les méthodes optiques ;
- ↳ méthode chimique ;
- ↳ méthode thermique ;
- ↳ méthode visuelle : à laquelle on a fait recours dans cette étude. C'est la méthode la plus ancienne, méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN *et al.* (1977), qui consiste à déterminer visuellement, dans des conditions standardisées, le temps d'apparition des flocons de micelles de caséines (taille de l'ordre de 200 μ m) (JEANTET *et al.*, 2017). Cette transformation s'observe mieux sur un film fin de lait dans un tube en rotation, disposé sur un fond noir.

En essayant de reproduire le protocole de la coagulation se faisant à l'échelle industrielle à petite échelle, expérimentale, nous avons préparé un échantillon de référence auquel nos échantillons de laits sain et mammiteux seront comparés. La méthode consiste à ajouter 10 μ L de solution enzymatique à 2 mL de substrat standard (poudre de lait reconstituée) à 38°C puis noter le temps de coagulation. Notons que l'opération a été répétée deux fois, pour une meilleure fiabilité des résultats.

La préparation de la solution enzymatique consiste en la dissolution de 22 mg de l'enzyme coagulante : chymosine bovine recombinante dans 5mL d'eau distillée, suivie d'une agitation magnétique (**Figure 26**).

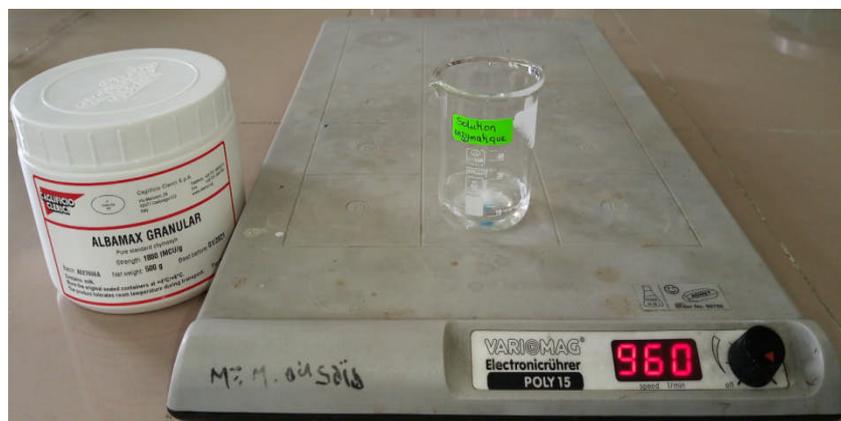


Figure 26: Préparation de la solution enzymatique.

La préparation du substrat standard consiste en la dissolution de la poudre de lait de type (*low heat*) à 10% (p/v) dans une solution de CaCl_2 (0,01M) et ajustement du pH à 6,5 par l'ajout d'une solution de NaOH (0,1).

Le substrat standard est ensuite reparti dans 2 tubes à essais, à raison de 2mL/tube. L'addition de l'extrait coagulant est réalisée à raison de 10 μL /2mL du substrat standard. Une homogénéisation immédiate et rapide est nécessaire. Dans le bain Marie, les trois retournements successifs du mélange après 30 secondes correspond au temps zéro.

Ensuite on passe aux échantillons de lait sains et mammites sélectionnés, qu'on a réparti aussi dans des tubes à essai à raison de 2mL chacun, auxquels on a additionné 10 μL de solution enzymatique avant chaque mise dans le bain Marie à 38°C, avec homogénéisation immédiate et rapide pour le suivi de leur temps de coagulation à l'aide d'un chronomètre (**Figure 27**).



Figure 27: Mesure du temps de coagulation des échantillons de laits sain et mammitéux par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN *et al* (1977).

2.2.7. Synthèse des données et analyse statistique

L'ensemble des données recueillies ont été codifiées, saisies et stockées dans un fichier Microsoft Excel 2007. Le traitement des données a été réalisé par le même logiciel dont la comparaison entre les variables (les pourcentages) a été faite à l'aide du test Chi-deux, pour cela une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.



Résultats et discussion

3. Résultats

3.1. Enquête sur les mammites bovines subcliniques au sein des élevages

3.1.1. Prévalence globale des mammites chez les vaches laitières

Les paramètres retenus pour la description de la prévalence des mammites chez les vaches laitières dans notre enquête sont reportés dans le **tableau V**.

Sur les 60 vaches en lactation dépistées, 28 (46,66%) vaches ont présenté au moins un trayon mammiteux. De ce fait et selon la distribution illustré en formule II, 51 (21,25%) trayons se sont révélés positifs au test de CMT. Notons que parmi les vaches atteintes, l'une a présenté quatre trayons mammiteux dont 3 atteints de mammite subclinique et un trayon ayant présenté les signes de l'inflammation ainsi qu'une modification de l'aspect macroscopique du lait. Il convient donc de signaler que ce dernier étant déclaré atteint de mammite clinique n'a pas fait objet de prélèvement dans notre étude.

Fréquence globale des mammites: $14v \times 1T + 8v \times 2T + 2v \times 3T + 4v \times 4T = 28v \times 52$ trayons (Formule I).

Fréquence des mammites subcliniques: $14v \times 1T + 8v \times 2T + 3v \times 3T + 3v \times 4T = 28v \times 51$ trayons (Formule II). (Sachant que : v : vaches ; T : trayons).

Tableau V: Prévalence des mammites subcliniques chez les vaches laitières

U.E	Dépistés	Mammites subcliniques	Mammites cliniques
Fermes	8	8 (100%)	1 (12,5%)
Vaches	60	28 (46,66%)	1 (1,66%)
Trayons	240	51 (21,25%)	1 (0,41%)

3.1.2. Facteurs de variation de la prévalence

Les huit élevages visités possèdent en moyenne 7 ± 3 [min 3 ; max : 12] vaches en lactation. Plus de la moitié des vaches dépistées appartiennent aux élevages de Ouaguenoun. Tous les élevages investigués ont exposé au minimum un cas d'infection intramammaire, marquant une prévalence individuelle de 46,66%, avec une variation intra-cheptel de 16,66% enregistrée dans un élevage à Ouaguenoun et 80% enregistrée dans un élevage d'Azeffoun.

D'après le calcul du ratio (PT/PV = 0,46), la fréquence globale des trayons atteints est en moyenne de 2 par vache. Cependant, des variations sont observées en fonction des régions et des élevages. Sur le plan région, les taux les plus élevés sont enregistrés à Azeffoun (Ratio=0,58) et les plus bas à Ouacif (Ratio=0,39), et sur le plan élevage, les taux les plus

élevés sont enregistrés dans l'élevage E₄ de Ouaguenoun (Ratio=0,75) et le plus bas dans l'élevage E₁ de la même région (Ratio=0,25) (**Tableau VI**).

Tableau VI: Facteurs de variation de la prévalence des mammites subcliniques.

Région	Elevages	Vaches en lactation			Trayons			Ratio
	N ^o	N ^{bre}	Mammite +	Prévalence	N ^{bre}	Mammite +	Prévalence	PT/PV
Ouaguenoun	Total	33	12	36,36	132	21	15,9	0,43
	E ₁	8	4	50	32	4	12,5	0,25
	E ₂	12	2	16,66	48	3	6,25	0,37
	E ₃	6	3	50	24	5	20,83	0,41
	E ₄	7	3	42,85	28	9	32,14	0,75
Azeffoun	Total	8	6	75	32	14	43,75	0,58
	E ₅	5	4	80	20	10	50	0,62
	E ₆	3	2	66,66	12	4	33,33	0,5
Ouacif	Total	19	10	52,63	76	16	21,05	0,39
	E ₇	11	6	54,54	44	11	25	0,45
	E ₈	8	4	50	32	5	15,62	0,31
Total	/	60	28	46,66	240	52	21,66	0,46

Ratio = prévalence trayon/ prévalence vache

3.1.3. Variation individuelle de la prévalence des mammites subcliniques

L'effet de la localisation des trayons sur la prévalence des mammites subcliniques chez la vache est présenté dans le **tableau VII** et la **figure 28**. Au regard des résultats, il s'avère que tous les trayons ont le même risque de contracter l'infection intra-mammaire (P=0,61).

Tableau VII: Variations inter-trayons de la prévalence des mammites subcliniques.

Trayon	Trayons dépistés	Positifs	Prévalence (%)	P
AG	60	16	26,66	P = 0.61
AD	60	11	18,33	
PG	60	12	20	
PD	60	13	21,66	

AG: antérieur gauche, **AD:** antérieur droit, **PG:** postérieur gauche, **PD:** postérieur droit, P : probabilité.

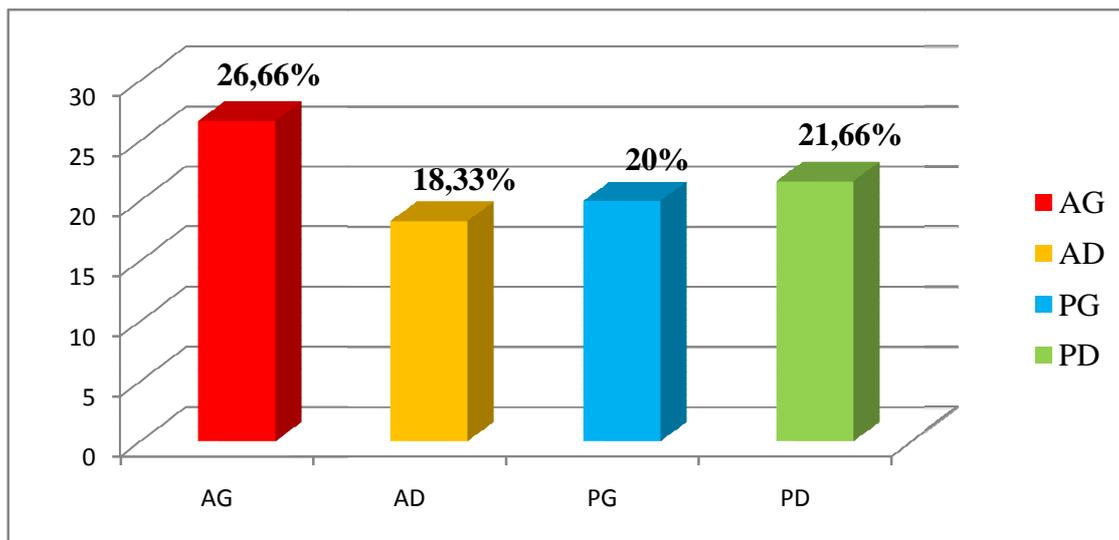


Figure 28 : Variations inter-trayons de la prévalence des mammites subcliniques.

3.2. Prélèvements de laits pour analyses physico-chimiques et bactériologiques

Sur un total de 29 vaches, 74 (49 laits mammitieux+ 25 laits sains) trayons ont été prélevés pour analyses bactériologiques et physico-chimiques (**Figure 29**). Un total de 57 échantillons de lait est issu de 23 vaches atteintes de mammites, à raison de 34 échantillons de laits mammitieux ($14v \times 1T + 7v \times 2T + 2v \times 3T$) et 23 échantillons de laits sains. Les 17 échantillons restants sont issus de 4 vaches ayant la totalité des trayons atteints (soit 15 prélèvements de lait à mammites subcliniques) et 2 prélèvements de laits sains issus de 2 vaches en bonne santé.

Le dépistage des mammites subcliniques a révélé 28 vaches positives (51 trayons). La difficulté de prélèvement a fait que l'une des vaches de l'élevage E₂ de Ouaguenoun ne soit prélevée. En effet, l'un des trayons n'a fourni qu'une petite quantité consacrée à l'analyse bactériologique, pendant que l'autre n'a même pas pu faire objet de prélèvement.

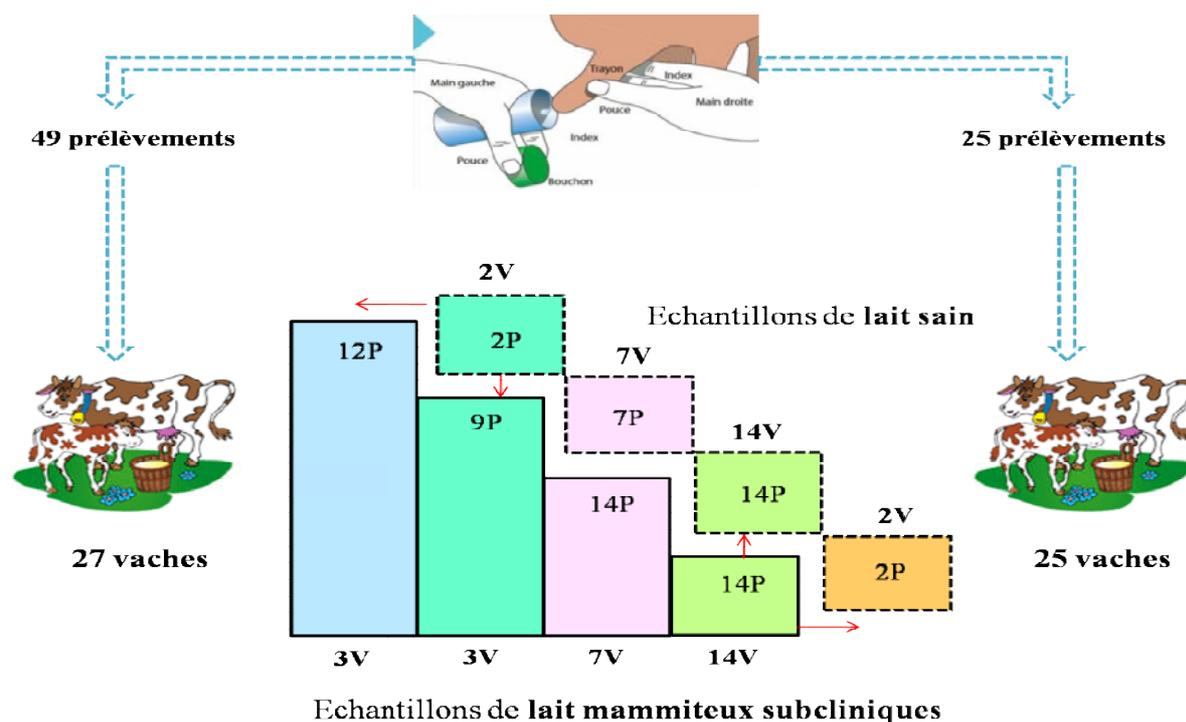


Figure 29: Prélèvements du lait destiné aux analyses physico-chimiques et microbiologiques.

3.3. Analyse bactériologique du lait

Parmi les 50 prélèvements de laits mammitieux mis en culture, 4 échantillons (8%) se sont révélés bactériologiquement négatifs, 40 échantillons (80%) ont permis la pousse d'un seul type de colonie sur milieu gélose au sang frais, 6 échantillons (12%) ont montrés 2 types de colonies sur le même milieu (**Tableau VIII**). De plus, en se basant sur les recommandations de National Mastitis Council. (1990), aucun prélèvement n'est considéré contaminé.

Tableau VIII : Analyse bactériologiques du lait mammitieux.

Culture	Echantillons de lait	Pourcentage
Echantillons cultivés	50	100%
0 germes	4	8%
1 germe	40	80%
2 germes	6	12%
≥3 germes	0	0%

3.3.1. Impact des staphylocoques sur la santé de la mamelle

A partir de 46 prélèvements de lait positifs, 52 isolats de bactéries seules ou associées ont été isolées. Elles se répartissent comme suit : 27 souches à coagulase négative (54%), 9 souches de staphylocoques à coagulase positive (18%) et 16 souches, soit 32% restant étaient

répartis entre les autres bactéries. Aucune pousse n'a été enregistrée sur le milieu de culture MacConkey. Il ressort que les staphylocoques ont été incriminés seul ou en association avec un autre germe dans 64% des cas de mammites dans cette investigation.

Tableau IX: Fréquence d'isolement des bactéries des laits issus des quartiers mammitieux

	SCP		SCN		ND		Total
	N ^{bre}	%	N ^{bre}	%	N ^{bre}	%	
1 germe	7	14	19	32	14	28	40
2 germes	2	4	6**	16	2	4	10**
Total	9	18	25**	54	16	32	50**

SCP : *Staphylococcus* à coagulase positive ; **SCN :** *Staphylococcus* à coagulase négative ; **ND :** non défini ; ** : présence de 2 types d'SCN dans la même boîte.

3.3.2. Résistance aux antibiotiques

Au regard des résultats résumés dans le **tableau X**, trois isolats de staphylocoques ont montré une résistance à la céfoxitine. Ces isolats pourraient être considérés comme des phénotypes résistants à la méticilline. Les antibiotiques testés sur les staphylocoques isolés des trayons infectés ont montré au moins une résistance. Des niveaux de résistance élevés sont observés pour la pénicilline, l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline avec des taux de 83,33%, 61,11%, 41,66% et 33,33% respectivement.

Tableau X: Résistance aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus spp.*

Classe d'antibiotiques	Antibiotiques	N ^{bre} de souches testées	Charge du disque	Diamètres critiques		Résistant (I+R)		Sensible (S)	
				R	S	N ^{bre}	%	N ^{bre}	%
β-lactamines	P	36	1 UI	<26	≥26	30	83,33	6	16,66
	OX	36	5 µg	<20	≥20	3	8,33	33	91,16
	FOX	36	30 µg	<22	≥22	3	8,33	33	91,16
Macrolides	E	36	15 UI	<17	≥22	22	61,11	14	38,88
	SP	36	100 µg	<14	≥18	1	2,77	35	97,22
Lincosamides	CD	36	15 µg	<14	≥21	15	41,66	21	58,33
Glycopeptides	VA	36	30 µg	--	≥15	1	2,77	35	97,22
Tétracyclines	TET	36	30 UI	<17	≥19	12	33,33	24	66,66
Phénicolés	C	36	30 µg	<19	≥22	5	13,88	31	86,11
Fusidanes	FD	36	10 µg	<24	≥24	7	19,44	29	80,55

P : pénicilline, **FOX** : céfoxitine, **E** : érythromycine, **VA** : vancomycine, **FD** : acide fusidique, **CD** : clindamycine, **TE** : tétracycline, **OX** : oxacilline, **C** : chloramphénicol, **SP** : spiramycine ; **R** : résistant ; **I+R** : intermédiaire + résistant ; **S** : sensible ; **UI** : unité internationale.

Tel que présenté dans le **tableau XI**, seulement trois souches de staphylocoques étaient sensibles à tous les antibiotiques. Au total, 22 profils résistants : 7 pour les SCP et 17 pour les SCN sont mis en évidence. Plus de 77,77% des staphylocoques sont multi-résistants, et une résistance à plus de 4 antibiotiques est enregistrée chez 27,77 % des souches. Dans ces derniers, une résistance à la céfoxitine y est associée à certaines souches. Enfin, la majorité des souches de SCP cumulent une résistance à 2 ou 3 antibiotiques.

Tableau XI: Profils de résistance des staphylocoques responsables de mammites.

Profils	SCP	SCN	Total	Profils	SCP	SCN	Total
P, FOX, E, VA, FD, CD	1	0	1	P, E, FD	0	1	1
P, OX, FOX, E, FD, CD	0	1	1	TE, E, CD	0	1	1
P, OX, TE, E, CD	0	1	1	P, C, CD	2	0	2
P, TE, E, FD, CD	0	1	1	P, E	1	3	4
P, SP, TE, E, CD	0	1	1	P, C	1	0	1
P, E, FD, CD	0	2	2	P, SP	1	0	1
P, TE, E, CD	0	2	2	P, TE	1	0	1
P, C, E, CD	0	1	1	P	0	3	3
P, OX, FOX	0	1	1	E	0	1	1
P, E, CD	0	2	2	C	0	1	1
P, TE, E	1	2	3	Sensible	1	2	3
P, TE, FD	0	1	1	Total	9	27	36

3.4. Physico-chimie des échantillons de lait analysés

Sur 74 échantillons de lait analysés, 49 sont atteints de mammites subcliniques et 25 sont prit comme étant leurs témoins négatifs.

Tableau XII : Statistique descriptive des propriétés physico-chimiques des prélèvements de laits analysés.

Propriétés / Composition	Moyenne	Coefficient de variation (écart-type/ moyenne %)	P1	P99
PH	6,53	3,67	6,12	7,09
Conductivité	5,27	11,38	4,26	6,80
Densité	33,12	14,13	25,96	49,73
Matière grasse	3,65	15,89	2,13	4,76
Extrait sec dégraissé	8,33	14,28	6,55	12,85
Lactose	4,61	14,96	3,47	7,12
Sels	0,70	32,85	0,15	1,07
Protéines	3,05	15,73	1,98	4,75

P : percentile.

L'étude de la dispersion des valeurs obtenues en fonction des paramètres étudiés a révélé que le coefficient de variation le plus bas est lié aux analyses de pH alors que le coefficient le

plus élevé est associé au dosage des sels. Pour le reste des paramètres analysés, la dispersion des valeurs est globalement comprise entre 11,38 et 15,89.

3.4.1. Physico-chimie comparative entre le lait mammitieux et le lait sain

Le tableau ci-dessous (**Tableau XIII**) montre les variations quantitatives des propriétés physico-chimiques engendrées par les mammites subcliniques. Au regard des résultats, on observe une augmentation de la conductivité, de la densité et du pH dans les laits révélés positifs au test CMT. Des taux relativement similaires en protéines et en lactose sont constatés dans les laits sains et infectés. Par ailleurs, une augmentation de l'extrait sec dégraissé ainsi qu'une diminution de matières grasses et sels dans le lait mammitieux sont observées.

Tableau XIII: Physico-chimie comparative des échantillons de laits sain et mammitieux

Propriétés/ composition	Trayons à CMT négatif			Trayons à CMT positif		
	Moyenne	Erreur standard	C.V	Moyenne	Erreur standard	C.V
pH	6,44	0,22	3,41	6,56	0,23	3,50
Conductivité	4,93	0,38	7,7	5,47	0,62	11,33
Densité	32,90	3,07	9,33	33,15	5,49	16,56
Matière grasse	3,74	0,43	11,49	3,58	0,64	17,87
Extrait sec dégraissé	8,24	0,79	9,58	8,36	1,4	16,74
Lactose	4,59	0,43	9,36	4,61	0,83	18
Sels	0,77	0,19	24,67	0,65	0,24	36,92
Protéine	3,01	0,36	11,96	3,06	0,55	17,97

C.V : coefficient de variation.

3.4.2. Électrophorèse des protéines totales des laits sain et mammitieux

Appliqué aux protéines totales des 74 échantillons de laits sains et à mammites subcliniques, l'électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS), ressort des profils de migration qui montrent assez nettement le déplacement différentiel se matérialisant en fin de migration par des bandes distinctes correspondant à des entités moléculaires différentes.

Le comportement de ces protéines, matérialisé par la nature et l'intensité des bandes de migration est cependant différent. En effet, les protéines totales du lait bovin en PAGE-SDS migrent en 11 bandes correspondant dans l'ordre croissant de leur mobilité électrophorétique aux : Igs<PP3<Lactoferrines<BSA< α S1-CN< α S2-CN< β -CN< κ -CN< α -La< β -Lg avec ses

deux variants B et A respectivement, ce qui est le cas du lait sain de la vache V₄.PG⁻ utilisé comme base de référence, auquel sera comparée la migration des autres échantillons de laits analysés. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux et leurs figures de gels respectives placés en **Annexe VI**.

Partant de la base, qu'au moins un témoin négatif est associé à chaque vache présentant de 1 à 3 trayons mammitiques et qu'un témoin négatif appartenant au même élevage, issu d'une vache saine est utilisé comme référence pour les vaches présentant les 4 trayons infectés, nous avons sélectionné 3 gels (**Figures 30, 31 et 32**) à discuter.

Les échantillons de lait mammitique et sains des pistes 1 et 2, 3 respectivement (**Figure 30**), issus de la même vache V₂ de la région de Ouaguenoun, présentent des profils plus ou moins différents, marqués par une nette intensification des bandes correspondant aux Igs, lactoferrines ainsi que la BSA du lait de mammitique subclinique par rapport aux laits sains, ainsi qu'une dégradation des caséines dans l'ordre $\kappa > \beta > \alpha S2$. Pour les laits sains, il convient de signaler qu'ils ne sont pas parfaitement identiques avec une augmentation de la proportion massique des caséines solubles, principalement $\kappa > \beta > \alpha S2$ (Piste 2), la disparition de bandes correspondant aux β -CN et κ -CN et une bande à peine visible du variant A de la β -Lg dans la piste 3

Pour la vache V₄ du même élevage, le lait mammitique (Piste 5) donne un profil relativement similaire à celui de son témoin négatif. Toutefois, nous relevons une baisse en terme de densité et proportion de la bande correspondant à $\alpha S2$ -CN, la disparition de la κ -CN ainsi qu'une diminution d'intensité de la bande du variant A de la β -Lg.

Les deux échantillons de laits mammitiques et sains des pistes 7 et 8 respectivement issus de la région de Ouacif, révèlent deux profils quasiment identiques en terme de migration et intensité des bandes, avec absence de la κ -CN et le variant A de la β -Lg.

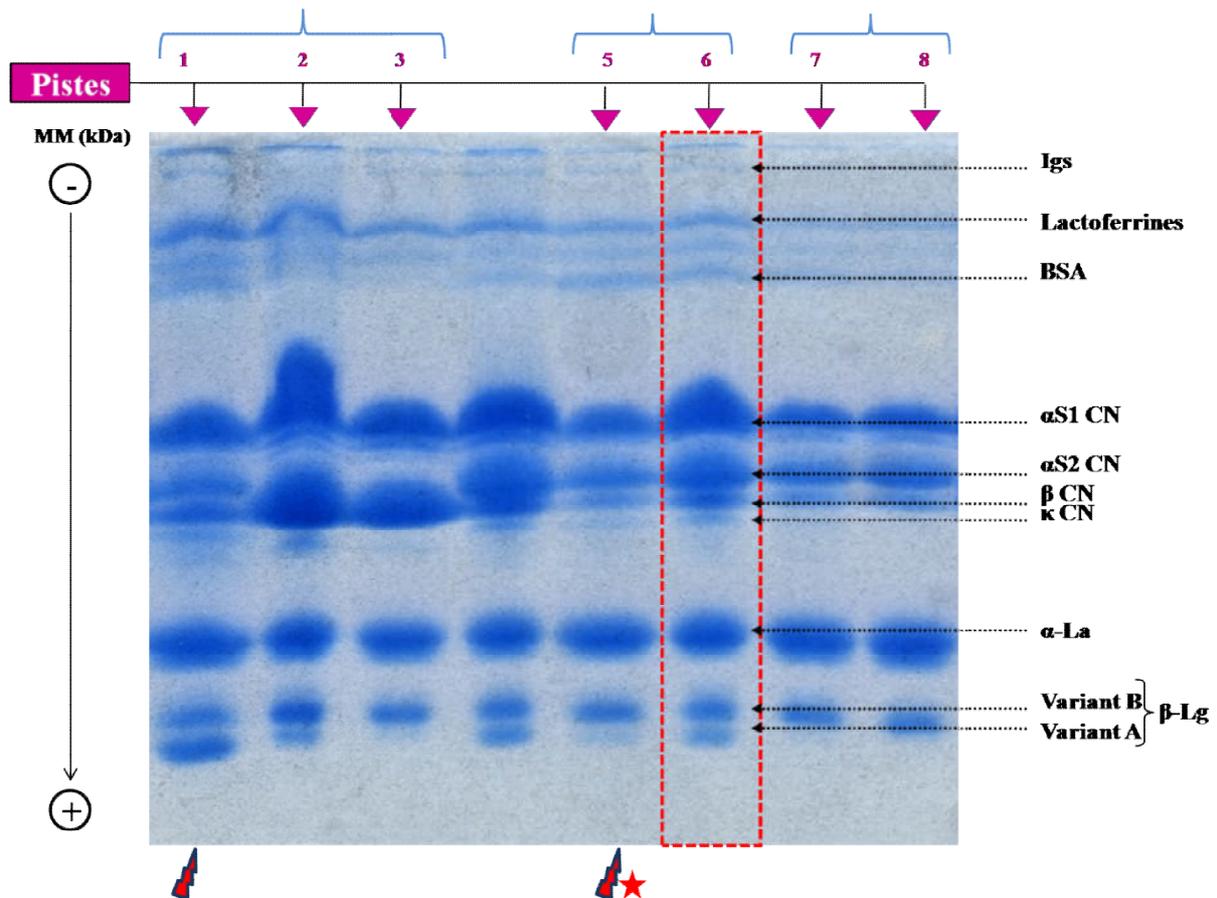


Figure 30 : Profils électrophorétiques 1 des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).
1: $V_2.AD^+$, **2:** $V_2.AG^-$, **3:** $V_2.PD^-$, **5:** $V_4.PD^+$, **6:** $V_4.PG^-$, **7:** $O_1.PD^+$, **8:** $O_1.PG^-$.

Le profil électrophorétique de trois vaches issues d'un même élevage à Ouacif (**Figure 31**) révèle pour :

La vache O_3 , aux échantillons de lait mammitieux en pistes 1 et 2, un profil différent de celui du lait sain en piste 3. Ce qui est le plus remarquable c'est l'apparition de plusieurs bandes au niveau de l'emplacement de migration de la $\alpha S1$ -CN, β -CN, κ -CN et l' α -La (Piste 1) et à un degré moindre au niveau de la piste 2.

Les échantillons des 4 trayons atteints de la vache O_5 ayant migré dans les puits 6, 7, 8 et 9, se caractérisent par des profils similaires, marqués par des bandes de migration des Igs, lactoferrines et BSA bien focalisées et plus intenses que les deux témoin de référence du même élevage. En revanche on constate que les caséines $\alpha S1$ -CN deviennent diffuses et non focalisées.

Les deux échantillons de lait issus de trayons atteints de la vache O_6 (Pistes 10 et 11), comparativement à leur témoin négatif (Piste 12), se distinguent par la disparition des bandes

β -CN, κ -CN et l'intensification à des degrés différents de la bande α -La, les lactoferrines et BSA des laits mammitieux.

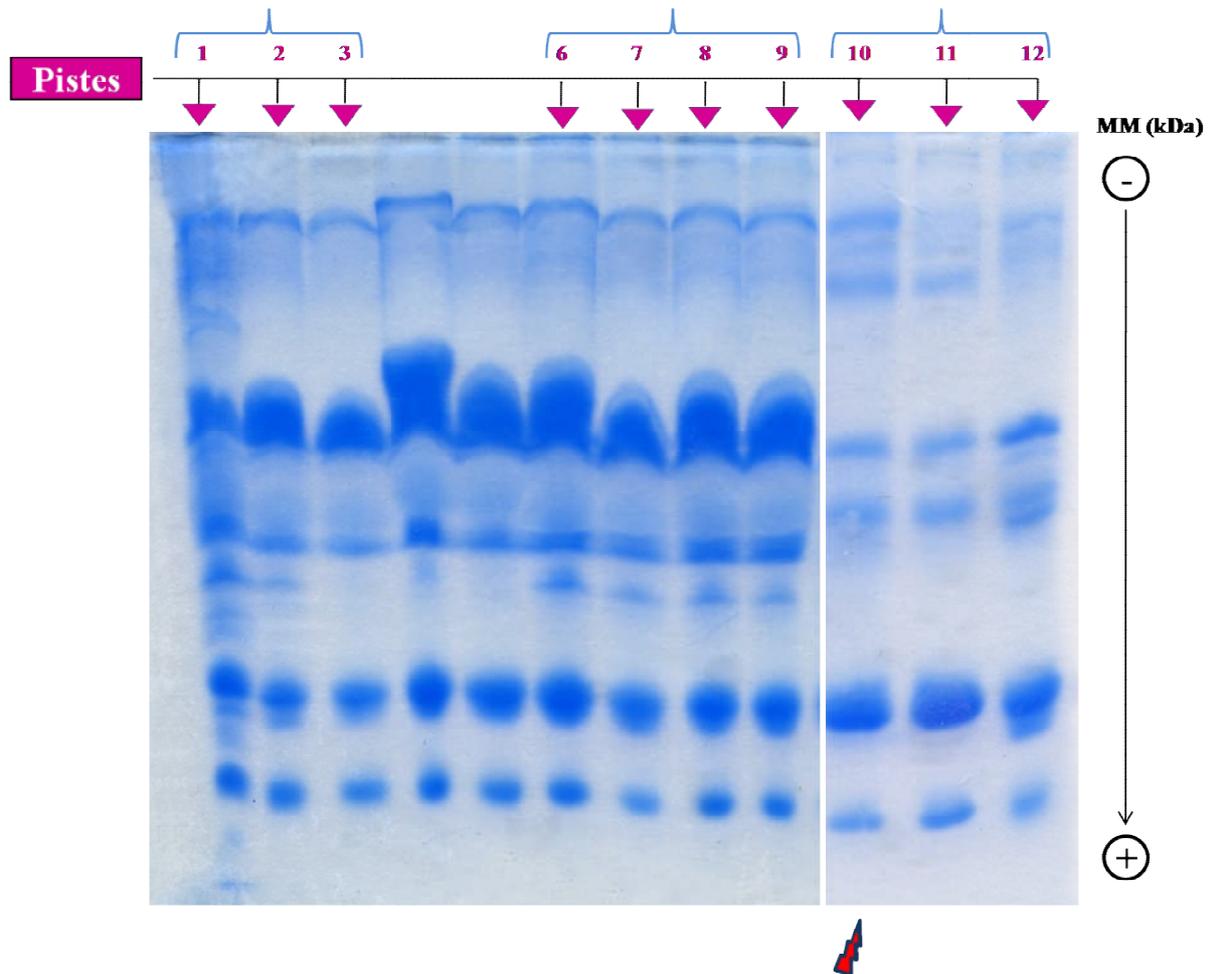


Figure 31: Profils électrophorétiques 2 des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).
1: O₃.AG⁺, **2:** O₃.PG⁺, **3:** O₃.AD⁻, **6:** O₅.AD⁺, **7:** O₅.AG⁺, **8:** O₅.PD⁺, **9:** O₅.PG⁺, **10:** O₆.PD⁺, **11:** O₆.PG⁺, **12:** O₇.PD⁻.

Les échantillons des pistes 1,2,3 et 4 (**Figure 32**) de la même vache KV₅ atteinte de mammite subclinique, montrent des profils ayant perdu leurs comportements dans un gel d'électrophorèse (pistes 1,2 et 3), ce qui les démasque nettement de la migration dans l'échantillon de référence (**Figure 30**) par des bandes correspondant aux lactoferrines et BSA, à des intensités différentes et aussi la migration en bandes non focalisées avec apparition de plusieurs bandes dans les emplacements correspondant aux CN, α -La et β -Lg. Il est à signaler que l'intensité des bandes de ces échantillons positifs est variable (pistes 1,2 et 3). De plus, on signale la disparition des bandes de κ -CN (Piste 4).

Pour la vache KV₄, comparativement à l'échantillon de lait sain (piste 6), on constate une intensification des bandes de lactoferrines et BSA (Pistes 5 et 7) avec un profil montrant des bandes contigües et intenses dans la zone de migration des CN surtout α S₂ et β -CN (Piste 7) et un profil avec des bandes moins intenses mais avec plusieurs fragmentations au niveau des bandes de β -CN et κ -CN ainsi que l' α -La et la β -Lg.

Enfin, l'échantillon de lait mammitique (piste 9) de la vache KV₁ marque une différence significative comparativement à son témoin négatif (piste 8) où on note une migration sous forme de plages ayant perdues leurs propriétés de migrer et de se focaliser avec disparition des bandes κ -CN et le variant A de la β -Lg. Notons que le témoin négatif dans ce cas se caractérise par une augmentation de la proportion massique de la CN soluble α S1-CN.

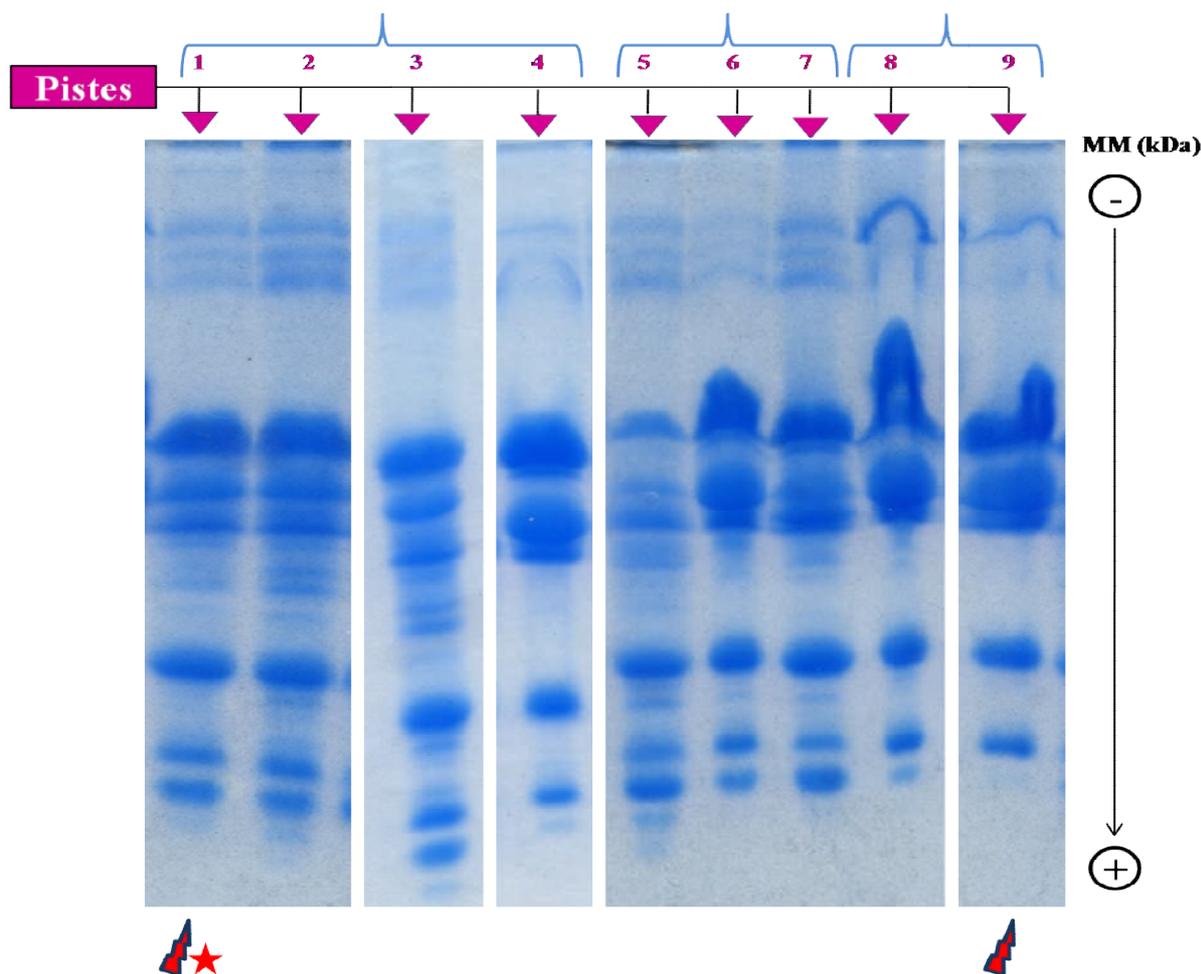


Figure 32: Profils électrophorétiques 3 des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).

1: KV₅PG⁺, **2:** KV₅AG⁺, **3:** KV₅PD⁺, **4:** KV₅AD⁺, **5:** KV₄PG⁺, **6:** KV₄AG⁺, **7:** KV₄AD⁺, **8:** KV₁PD⁻, **9:** KV₁AD⁺.

3.4.3. Activité de coagulation

Afin de mettre en évidence la différence de l'aptitude à la coagulation des échantillons de laits analysés, nous avons sélectionné 31 échantillons dont 17 mammitieux et 14 sains. L'activité de coagulation des l'échantillon mammitieux testés est de $2,55 \pm 1,49$ UP alors qu'elle est de $7,80 \pm 4,46$ UP dans les échantillons de laits sains.

Comparativement à l'activité de coagulation du lait standard "poudre de lait reconstitué à 0% MG", l'activité enregistrée sur les laits sain et mammitieux s'avère supérieure (**Tableau XIX**).

Le diagramme ci-joint montre que l'activité de coagulation est inversement proportionnelle à la conductivité. En effet, l'augmentation de la conductivité synonyme d'infection intramammaire est à l'origine de l'augmentation du temps de coagulation. De ce fait, l'activité de coagulation est faible.

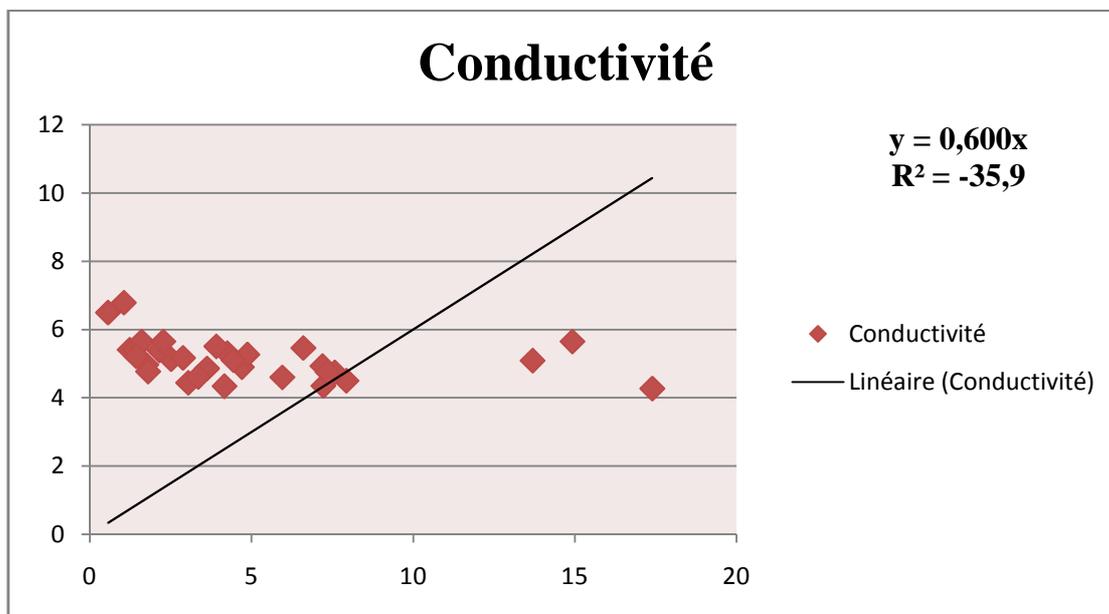


Figure 33: Courbe de tendance de la conductivité des échantillons de laits

Tableau XIX: Comparaison de l'activité de coagulation des échantillons de laits mammites et sains.

/	Code	Temps de coagulation					Moyenne	Activité de coagulation (UP)
Témoin standard	T ₁	14'12''					14'25''	2,31
	T ₂	14'38''						
SCP	Témoin positif	Conductivité	Temps de coagulation	Activité de coagulation (UP)	Témoin négatif	Conductivité	Temps de coagulation	Activité de coagulation (UP)
	V ₄ .PD ⁺	5,41	26'58''	1,23	V.AG ⁻	5,09	2'26''	13,69
	KV ₅ .PG ⁺	6,50	58'56''	0,56	KV ₄ .AG ⁻	5,51	8'31''	3,91
	O ₁ .PD ⁺	4,9	7'05''	4,70	O ₂ .PD ⁻	5,27	6'50''	4,87
	O' ₁ .PG ⁺	4,34	7'60''	4,16	O' ₁ .PD ⁻	4,35	4'37''	7,22
	O' ₃ .AG ⁺ A	4,60	5'36''	5,95	O' ₃ .AD ⁻	4,50	4'12''	7,93
	O' ₄ .AG ⁺ A	4,97	19'03''	1,74	O' ₄ .PD ⁻	4,75	4'24''	7,57
	8. AG ⁺	5,13	13'15''	2,51	9. AD ⁻	5,17	11'33''	2,88
	T ₁ .PG ⁺	5,43	23'54''	1,39	T ₂ .PD ⁻	4,93	4'38''	7,19
	SCN	O ₆ .PD ⁺	5,65	20'45''	1,60	O ₇ .PD ⁻	4,27	1'55''
V ₁ .PD ⁺		5,39	15'30	2,15	V ₁ .PG ⁻	4,75	2'52''	7,35
KV ₁ .AG ⁺		4,44	10'56''	3,04	KV ₁ .PD ⁻	5,46	5'03''	6,60
6. AG ⁺		4,86	9'11''	3,62	6. PD ⁻	5,65	2'14''	14,92
V ₂ .AD ⁺		6,79	31'38''	1,05	V ₂ .AG ⁻	4,61	9'56''	3,35
O ₄ .AD ⁺		5,65	10'37''	2,27	O ₄ .PG ⁻	5,1	7'30''	4,44
O' ₄ .PG ⁺		4,77	18'25''	1,80	-	-	-	-
O ₂ .PG ⁺		5,31	7'50''	4,25	-	-	-	-
KV ₁ .AD ⁺	5,22	23'12	1,43	-	-	-	-	
/	Moyenne ± écart type	5,25 ± 0,65	/	2,55 ± 1,49	Moyenne ± écart type	4,95 ± 0,43	/	7,80 ± 4,46

SCP : *Staphylococcus* à coagulase positive ; **SCN** : *Staphylococcus* à coagulase négative ; **UP** : unité présure ; **T** : témoin standard.

4. Discussion

4.1. Protocol d'étude et qualité des données

Notre enquête a concerné 8 élevages appartenant à 3 régions de la wilaya de Tizi-Ouzou. Une attention particulière est portée à la minimisation des informations subjectives liées à l'analyse des échantillons, l'enregistrement des données et enfin leur traitement statistique.

L'impact de la mammité sur le niveau de production n'a pas fait objet d'investigation en raison de la nécessité d'un suivi rapproché des vaches sur une longue période.

Dans nos conditions pratiques, vu ses vertus de praticabilité, le CMT est adopté comme outils de distinction des trayons indemnes de ceux atteints de mammites subcliniques. Seul l'aspect qualitatif a été retenu lors de l'interprétation. Or, pour étudier l'intensité de l'inflammation, le recours au comptage de cellules somatiques pourrait être d'une utilité supérieure.

De plus, le recours à la congélation des échantillons pourrait engendrer des cultures négatives notamment pour les entérobactéries. Seule la présence bactérienne a été évoquée, or en microbiologie alimentaire un dénombrement bactérien est indispensable. Enfin, comparativement à la méthode visuelle utilisée dans le suivi de la coagulation, des résultats plus fiables pourraient être obtenus avec des appareils dédiés à cet effet.

4.2. Prévalence globale des mammites chez les vaches laitières

Le dépistage des mammites subcliniques est à la base de leur contrôle. Sur le plan élevage, toutes les fermes ont présentées au moins un cas de mammité. Ceci révèle l'importance des infections intramammaires dans les élevages étant donné que celles-ci pourraient être dues à la contamination par des germes contagieux et environnementaux.

L'utilisation du CMT a permis de détecter des prévalences individuelles et trayons de 46,66% et 21,25% respectivement. Sur le plan individuel, nos résultats se rapprochent de ceux rapportés par AGGAD *et al* en 2009, portant sur l'évaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'Ouest Algérien ainsi que ceux de BELKHEIR *et al* en 2016 dans le cadre du dépistage de mammites subcliniques chez des vaches en zone montagneuse de Tizi-Ouzou, avec une prévalence de 47%.

En revanche, plusieurs travaux, à l'instar de SAIDI *et al.* (2015) ainsi que AKKOU en 2017, ont rapporté des prévalences légèrement supérieures à la notre, et qui sont de 50% et 52,2% respectivement. D'autres prévalence plus élevées, à savoir 79% et 61,6% ont été rapportées par BOUFAIDA *et al* en 2012 et FARTAS *et al* en 2017 respectivement.

Sur le plan quartier, nos résultats se rapprochent de 24,5% rapportés par AKKOU en 2017.

En plus de l'utilisation de différentes méthodes de détection (test CMT, examens bactériologiques, comptage cellulaire), la race des animaux, la réponse immunitaire, les conditions climatiques et la définition de l'infection, qui est variable d'un auteur à un autre pourraient être à l'origine de ces différences de prévalence. D'autres facteurs pouvant influencer la prévalence, pourraient être attribués aux conditions de traite et à l'environnement des animaux.

4.3. Analyse bactériologique du lait

4.3.1. Culture bactérienne et identification

Dans notre étude 8% des prélèvements étaient bactériologiquement stériles, se rapprochant de ce fait des 9,6% rapporté par AKKOU en 2017 et 11% rapporté par BOUFAIDA-ASNOUNE en 2012 au Nord-est de l'Algérie.

En plus de l'insuffisance des techniques de bactériologie pour l'isolement des germes comme les mycoplasmes, le traitement préalable des mammites peut induire une guérison symptomatique et une stérilité bactériologique vraie ou apparente.

De plus, cela pourrait être lié aux facteurs ayant un impact sur la variation du comptage de cellules somatiques tels que le stade de lactation, l'âge, la saison, le stress et la variation diurne. SCHEPERS *et al.* (1997) ont rapporté des niveaux physiologiquement élevés de cellules somatiques au début et en fin de la lactation chez les vaches. A ces stades, bien que la mamelle soit saine, un dépistage par le CMT sera révélé positif.

Parmi les 64% de prélèvements de laits mammitiques infectés par les staphylocoques, *S. aureus* était impliquée à 18% dans ces infections. Par ailleurs, des taux d'implication de 30,3% et 40% dans les cas de mammites subcliniques ont été enregistrés respectivement dans les régions Est et centre de l'Algérie (BOUFAIDA-ASNOUNE *et al.*, 2012 ; SAIDI *et al.*, 2015).

4.3.2. Résistance aux antibiotiques

Dans la présente étude, 3 isolats de staphylocoques ont montré une résistance à la céfoxitine. Ils pourraient donc être considérés comme des phénotypes résistants à la méticilline. Ces phénotypes doivent faire l'objet de confirmation génotypique via la recherche des gènes *mecA* et *mecC*.

Les β -lactamines, tels que la pénicilline G, font parti des antibiotiques les plus largement utilisés pour le traitement des mammites (BOUTET *et al.*, 2005). Une résistance de 83,33% à

la pénicilline des souches bovines a été enregistrée. Ce taux est plus proche de 86,5% de résistance rapporté par AKKOU *et al.* (2016) que celui de SAIDI *et al* estimé à 95,2% en 2015. De plus, des résistances sont observées vis-à-vis de l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline avec des taux de 61,11%, 41,66% et 33,33% respectivement.

Considérant l'ensemble des présents résultats et ceux des études antérieurs, il ressort qu'il peut être suggéré que la pression sélective engendrée par l'usage abusif des antibiotiques dans les élevages pourrait expliquer, du moins en partie, ces taux élevés d'antibiorésistance.

4.4. Impact de la mammite sur les propriétés et la composition du lait

4.4.1. Impact de la mammite sur les propriétés du lait

Les résultats de notre étude mettent en évidence l'augmentation du pH de $6,44 \pm 0,22$ dans les laits sains à $6,56 \pm 0,23$ dans les laits mammites. Dans ce contexte et selon des études récentes de JEANTET *et al.* (2017), le pH peut augmenter jusqu'à atteindre 7 à 7,2.

De plus, une augmentation en moyenne 2 fois plus (infection par un pathogène mineur) ou 10 fois plus (infections par un pathogène majeur) de cellules dans le lait de vaches infectées que les vaches saines (SERIEYS, 2015), va dans le sens de l'augmentation de la densité du lait mammitique jusqu'à $33,15 \pm 5,49$ en moyenne comparativement au lait sain qui est de $32,90 \pm 3,07$.

4.4.2. Impact de la mammite sur la composition du lait

La diminution de la teneur en sels dans le lait de mammite révélée par cette étude est principalement due aux dommages cellulaires en particulier au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales, à l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et à l'altération du système de pompage ionique. Les transporteurs d'ions peuvent ne plus être fonctionnels à cause des toxines bactériennes présentes dans le milieu. Le résultat est que les ions Na^+ et Cl^- diffusent dans le lait selon un gradient de concentration et les ions K^+ et le lactose diminuent en concentration de manière similaire (JACQUINET, 2009). Ce bouleversement des équilibres minéraux est également associé à une augmentation du pH par rapport à la normale (BERTHELOT, 2018).

De plus la diminution de matière grasse révélée par l'étude est justifiée par le fait que les membranes enveloppant les globules gras se trouvent altérées, les teneurs en enzymes protéolytiques et lipolytiques augmentées, ainsi que la teneur en acides gras libres, ce dernier

point dénotant une lipolyse du lait, qui peut être multipliée par trois par rapport à un lait sain (BERTHELOT, 2018).

4.4.3. Impact de la mammite sur les protéines totales du lait

Les caractéristiques physico-chimiques des laits de mammites subcliniques diffèrent des laits sains. Concernant les protéines, des différences sont mises en évidence dans cette étude à travers une électrophorèse PAGE-SDS.

Les variations de migration entre les échantillons de lait sains pourraient s'expliquer par une infection mammaire antérieure (SERIEYS, 2015). Le taux protéique a tendance à diminuer surtout si l'infection est récurrente ou qu'il s'agit d'un début d'infection où le nombre de cellules somatiques n'a pas encore atteint le seuil requis pour l'indication d'une mammite.

Cela pourrait également être relatif au stade de lactation, du moment que les teneurs du lait en protéines solubles, en plasmine et en cellules somatiques augmentent mais la part des différentes caséines dans les protéines évolue peu (BERTHELOT, 2018).

Les conditions d'environnement pourraient aussi justifier ce fait, car elles jouent un rôle sur la composition du lait et plus particulièrement l'alimentation, sachant qu'un déficit en énergie de la ration protéique provoque une baisse des protéines (CAUTY et PERREAU, 2009). De même, ces différences peuvent être attribuées à la différence entre races.

De plus, une variabilité entre individus d'une même espèce et d'une même race existe y compris lorsque les conditions d'élevage et le statut physiologique des animaux sont identiques. L'amplitude de cette variabilité individuelle étant nettement supérieure à celle observée entre races (BERTHELOT, 2018). Ou encore à la présence d'enzymes protéolytiques naturellement présentes dans le lait due d'une part aux protéases venant directement du sang, notamment la plasmine reconnue comme étant responsable de l'essentiel de la protéolyse des caséines dans le lait à faible concentration cellulaire (ANDREW, 1983), et d'autre part, la protéolyse d'origine cellulaire

Le report au froid pourrait aussi être à la base de l'augmentation de la proportion massique des CN solubles, principalement de la β -CN et dans une moindre mesure la κ -CN et α S-CN (JEANTET *et al*, 2017).

La lactoferrine, la BSA et les IgG peu visibles dans le lait avant l'infection, apparaissent de manière beaucoup plus intense après infection due à un accroissement des teneurs en composants d'origine sanguine (CAUTY et PERREAU, 2009).

Lors de mammite, un rôle majeur est attribué à la fois à la plasmine-plasminogène, mais aussi aux cellules somatiques et les bactéries. L'intensité de ces dernières peut dépendre de la souche bactérienne mise en jeu, du nombre, du type, de la maturité des cellules somatiques, de la régulation du système plasmine-plasminogène et des interactions entre ces différents facteurs.

L'augmentation significative de l'activité de la plasmine est liée à une évolution de la perméabilité de la barrière épithéliale pendant l'inflammation (NICKERSON et PANKEY, 1984). Associés à cela, de nombreux activateurs de plasmine proviennent du sang et des bactéries. Selon YAMAGATA *et al.* (2001), la concentration des activateurs des sérines protéases augmente considérablement pendant les mammites.

La α 1-CN est faiblement hydrolysée par la plasmine. Il semblerait qu'elle ne lui soit pas accessible car elle aurait une position centrale au niveau de la micelle (FARRELL *et al.*, 1993).

Les peptides issus de l'hydrolyse par la plasmine de la α 2-CN sont négligeables par rapport à ceux issus de l'hydrolyse de la caséine β , indiquant donc son inaccessibilité. La caséine κ étant la plus résistante à la plasmine (GRUFFERTY et FOX, 1988).

La plasmine hydrolyse préférentiellement dans l'ordre : β -CN > α 2-CN > α 1-CN >> κ -CN (GRIEVE et KITCHEN, 1985). Une augmentation de la teneur en protéose-peptones du lait est expliquée par l'augmentation de la protéolyse de la caséine- β et des autres caséines (ANDREWS et ALICHANIDIS, 1983). En revanche, la protéolyse est préférentiellement dans l'ordre : CN- α 1 > CN- β >> CN- κ pour les enzymes des cellules somatiques (GRIEVE et KITCHEN, 1985).

La protéolyse exogène, flore psychrotrophe, provoque une dégradation des caséines préférentiellement dans l'ordre κ >> β > α (FAIRBAIRN et LAW, 1986); elle n'est significative, que pour des contaminations supérieures à 10^6 - 10^7 germes/mL (GUINOT-THOMAS *et al.*, 1995). Très peu d'études ont abordé la dégradation des protéines laitières par les protéases de bactéries pathogènes. Les extraits d'enzymes extracellulaires de *S. aureus* et *E. coli* sont capables de dégrader 9,6% et 6,7% de la caséine β respectivement (VERDI et BARBANO, 1991). Et évidemment ces modifications s'observent différemment d'un lait mammitieux à un autre selon la sévérité de l'infection.

4.4.4. Impact de la mammite sur l'activité de coagulation

Tous les auteurs sont d'accord sur le fait que le lait de mammite peut se coaguler lentement et parfois même pas du tout, selon le degré d'inflammation (WAES et BELLEGHEM, 1969; JEANTET *et al*, 2017). En effet, cela est en accord avec les résultats obtenus dans notre étude, avec une activité de coagulation des laits mammitiques de $2,55 \pm 1,49$ UP inférieure par rapport à l'activité de coagulation des laits sains estimée à $7,80 \pm 4,46$ UP.

Par ailleurs, l'aptitude d'un lait à se coaguler est influencée par quatre caractéristiques propres au lait qui sont la teneur en caséines, la concentration en calcium et en phosphate de calcium, le pH et la dimension des micelles. Intervient également, de façon significative, les proportions relatives des différentes caséines dans les micelles et la nature de leurs variants génétiques (POUGHEON, 2001). De plus, les laits sains de début et de fin de lactation et les laits de mammites ont une composition protéique différente. Ainsi, BERTHELOT. (2018) a rapporté des temps de 8,4min, 8,6min et 9,6min en début, milieu et fin de lactation respectivement.

Ces résultats confirment également nos observations quant à la conductivité. En fonction des études, la distribution des valeurs de la conductivité d'un lait sain pouvait chevaucher celle d'un lait infecté. Dans l'étude de MANSELL *et al*. (2003), les intervalles de valeurs de conductivité donnent pour les quartiers sains une distribution des valeurs allant de 4,2 à 7,2 mS/cm, pour les quartiers infectés par des pathogènes majeurs de 4,5 à 8,4 mS/cm et pour les quartiers infectés par des pathogènes mineurs de 4,5 à 7,7 mS/cm.

Les variations de concentrations en ions dans le lait de mammites sont principalement dues aux dommages cellulaires, à l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et à l'altération du système de pompage ionique. Les transporteurs d'ions peuvent ne plus être fonctionnels à cause des toxines bactériennes présentes dans le milieu (JACQUINET, 2009).

Conclusion

A la lumière de nos résultats, il s'avère que les mammites demeurent l'une des pathologies dominantes qui sévissent dans les élevages bovins. La prospection des vaches en lactation au sein des élevages de Tizi-Ouzou reflète le fardeau que représentent les infections intramammaires pour les éleveurs et les transformateurs. On enregistre en effet, à l'échelle troupeau, individu et trayon des prévalences de 100%, 46,66% et 21,25% respectivement. Or, l'analyse bactériologique des échantillons de lait mammitieux montre, que 64% des trayons atteints étaient infectés par des staphylocoques et *S. aureus* est isolé dans 18% des laits mammitieux.

L'utilisation abusive des antibiotiques en thérapeutique vétérinaire justifie l'ampleur de la pression de sélection exercée sur les germes du portage au sein des élevages. Plus de 77,77% des staphylocoques causant l'infection intramammaire sont multi-résistants. La céfoxitine est sans effet sur trois isolats et la résistance à la pénicilline, l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline frôle les 83,33%, 61,11%, 41,66% et 33,33% respectivement. L'impact économique se justifie par des pertes occultes liées aux mammites subcliniques et à la contagiosité des germes tels que les staphylocoques, ayant pour réservoir les trayons infectés ainsi qu'aux échecs thérapeutiques.

Comparativement aux laits sains, les laits atteints de mammites subcliniques présentent un faible taux butyreux, une composition protéique déséquilibrée et une aptitude à la coagulation basse. Ainsi, la moindre aptitude à la coagulation d'un lait de mélange contenant du lait normal et du lait de mammitite dépendra dans une large mesure du pourcentage et de la nature du lait de mammitite entrant dans le mélange.

Les conclusions de notre travail ont montré que les infections intramammaires restent un sérieux problème. Pour en réduire l'incidence et la prévalence, la mise en place de plans de lutte contre les mammites se justifie donc pleinement. Il faut agir à deux niveaux : limiter les nouvelles infections et diminuer les taux des infections existantes. Les mammites subcliniques doivent faire l'objet d'un dépistage régulier et périodique dans les exploitations de bovins laitiers afin de construire une base de données et un historique de la santé de la mamelle pour chaque vache laitière de manière individuelle. Ainsi, on dispose de données permettant de prendre une décision quant à la conduite à tenir pour le traitement de mammitite subclinique et d'en prévenir d'autres dans l'exploitation. Or ceci constitue une des limites de notre étude, et donc impossible de quantifier parmi les vaches la persistance des infections et l'apparition de nouvelles infections intra-mammaires suite à une précédente.



AGGAD H., MAHZOUZ F., AHMEDAMMAR Y. et KIHAL M. (2009). Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Rev. Méd. vét.*, **169** : 590-595.

AKKOU M. (2017). Caractérisation de *Staphylococcus aureus* isolé de mammites et impact sur les personnes à risque. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire. Alger. Algérie.

AKKOU M., ANTRI K., BACHTARZI M.A., BES M., TRISTAN A., DAUWALDER O., KAIDI R., MEUGNIER H., TAZIR M., ETIENNE J., LAURENT F. et RAMDANI-BOUGUessa N. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastitis and nasal carriage of workers in contact to animals in Algeria. *Pak Vet J*, **36**: 184-188.

ANDREW A.T. et ALICHANIDIS E. (1983). Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of milk. *J. Dairy Res.* **50** : 275-290

Andrews A.T. & Alichanidis E. (1983) **BELKHEIR B., GHOZLANE F., BENIDIR M., BENAHMED N. et BOUSBIA A. (2016).** Dépistage de mammites subcliniques chez des vaches en zone montagneuse de Tizi-Ouzou. *Renc. Rech. Ruminants*, **23**.

BERRIDGE N.J. (1945). The purification and crystallization of rennin. *Biochem. Journal*, **39**: 179-187.

BERTHELOT V. (2018). Alimentation Des Animaux Et Qualité De Leurs Produits. Editions TEC & DOC. Agriculture d'Aujourd'hui, Lavoisier. Paris.

BOUFAIDA ASNOUNE Z., BUTEL M.J. et OUZRout R. (2012). Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au Nord-Est de l'Algérie. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, **65**:5-9.

BOUJENANE I. (2003). Programme national de transfert de technologie en agriculture (PNTTA). Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Rabat, Maroc.

BOUTET P., DETILLEUX J., MOTKIN M., DELIEGE M., PIREAUX E., DEPINOIS A., DEBLIQUE P., MAINIL J., CZAPLICKI G. et LEKEUX P. (2005). Comparaison du taux cellulaire et de la sensibilité antimicrobienne des germes responsables de mammites

subclinique bovine entre les filières conventionnelle et biologique. *Ann Med Vét*, **149**: 173-182.

CA-SFM, 2019. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations. Société Française de Microbiologie, Soussy CJ.

CAUTY I. et PERREAU J.M. (2009). Conduite Du Troupeau Bovin Laitier. Production, Qualité, Rentabilité. 2^{ème} Ed., Editions France Agricole. Paris. 334p.

CHARTIER C. (2009). Pathologie caprine : du diagnostic à la prévention. Editeurs du Point Vétérinaire, Sine qua non. **325**: 207-220.

CHARTON C. (2017). Caractérisation de l'adaptation de la glande mammaire des vaches laitières à l'allongement de l'intervalle entre traites. Biologie animale. Thèse de Doctorat. Agrocampus Ouest. Université Bretagne. Loire.

COLLIN J.C., GRAPPIN R. et LEGREAT Y. (1977). Etude de la méthode de mesure, selon BERRIDGE, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Revue Laitière Française*, **355** :389-394.

COURTET LEYMARIOS F. (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Créteil.

COUVREUR S. et HURTAUD C. (2007). Le globule gras du lait : Sécrétion, composition, fonctions et facteurs de variation. *INRA Prod, Prod anim*, **20** :365-382.

CROGUENNEC T., JEANTET R. et BRULE G. (2008). Fondements Physicochimiques De La Technologie Laitière. Editions TEC &DOC. Lavoisier, Paris.

DELOUIS C. et RICHARD P. (1991). La lactation ; *In* : La Reproduction Chez Les Mammifères Et Chez L'homme. Thibault C. et Levasseur M.C, Editions INRA, Ellipse, Paris, France.

FAIRBAIRN D.J. et Law B.A. (1986). Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res*, **53**:139-177.

FARRELL H.M., BROWN E.M. et KUMOSINSKI T.F. (1993). Three dimensional molecular modelling of bovine caseins. *Food Stru.*, **12**:235-250.

FARTAS H., BOUZEZBDA Z., AFRI F. et KHAMASSI S. (2017). Prévalence et impact des mammites subcliniques sur la rentabilité de bovins laitiers dans l'extrême Est Algérien. *Livestock Research for Rural Development*, **29**:9.

FREDOT E. (2012). Connaissance Des Aliments. Bases Alimentaires Et Nutritionnelles De La Diététique. 3^{ème} Ed., TEC & DOC, Lavoisier, Paris.

FRENEY J., RENAUD F., LECLERCQ R. et RIEGEL P. (2007). Précis de Bactériologie Clinique. 2^{ème} Ed., Editions Eska, Paris. 1764p.

GAUTIER M. et LE LOIR Y. (2010). *Staphylococcus aureus*. Editions TEC & DOC (Monographies de microbiologie), Lavoisier, Paris. 283p.

GOURREAU J.M., CHASTANT S., MAILLARD R., NICOL J.M. et SCHELCHER F. (2011). Guide Pratique Des Maladies Des Bovins. Editions France Agricole. Paris.

GRIEVE A.P. et KITCHEN J.B. (1985). Proteolysis in milk: The significance of proteinase extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. *J. Dairy Sci*, **74**: 772-782.

GRUFFERTY M.B. et FOX P.F. (1988). Milk alkaline proteinase. *J. Dairy Res*, **55**:609-30.

GUINOT-THOMAS P., AI AMMOURY M., Le ROUX Y. et LAURENT F. (1995). Study of proteolysis during storage of raw milk at 4°C: effect of plasmin and microbial proteinases. *Int. Dairy J*, **47**:685-697.

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

HURTAUD C., BUCHIN S., MARTIN B., VERDIER-METZ I., PEYAUD J.L. et NOEL Y. (2001). Milk quality and consequences on quality of dairy products: some techniques of measure in dairy cows trials.

JACQUINET S.A. (2009). Evaluation du dépistage des mammites par la conductivité électrique du lait. Thèse de Doctorat. Université Paul-Sabatier. Toulouse.

JEANTET R., CROGUENNEC T., GARRIC G. et BRULE G. (2017). Initiation à La Technologie Fromagère. 2^{ème} Ed., Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris. 209p.

LARBALETRIER A. (2015). Traité Pratique De La Laiterie. Lait, crème, beurre, fromages. Edition MAXTOR. Paris.266p.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent.*Journal of Biochemistry*, **193**:265-275.

MIR Y. et SADKI I. (2018). Evaluation de la conductivité électrique du lait comme moyen de détection précoce des mammites bovines dans différentes fermes au sud du Maroc. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét*, **6**:308-313.

National Mastitis Council, Arlington, VA, USA.

NICKERSON S.C. et PANKEY J.W. (1984). Neutrophil migration through test end tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci*, **67**:826-34

NMC, 1990. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Udder Infection-3rd Edition

PERREAU J.M. (2014). Conduire Son Troupeau De Vaches Laitières. Editions France Agricole. Paris

PETON V. et Le Loir Y. (2014). *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. *Infect. Genet. Evol*, **21**: 602–615.

POUGHEON S. (2001). Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse de Doctorat. Université Paul-Sabatier. Toulouse.

PRESCOTT L.M., HARLEY J.P. et KLEIN D.A. (2010). Microbiologie. 2^{ème} Ed. De Boeck : Bruxelles.

QUIN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. et CARTER G.R. (1994). Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London, UK, pp: 95-101.

RAINARD P. et Gilbert F. (2010). Les mammites dues à *Staphylococcus aureus* ; *In : Staphylococcus aureus*. Gautier M. et Le Loir Y. Editions TEC & DOC, Lavoisier, Paris.

REMY D. (2010). Les Mammites. Hygiène, prévention, environnement. Guides France Agricole. 260p.

SAIDI R., CANTEKIN Z., KHELEF D., ERGUN Y., SOLMAZ H. et KAIDI R. (2015). Antibiotic susceptibility and Molecular Identification of Antibiotic resistance genes of staphylococci isolated from bovine mastitis in Algeria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **21**: 513-520.

SCHEPERS A.J., LAM T.J., SCHUKKEN Y.H., WILMINK J.B. et HANEKAMP W.J. (1997). Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J. Dairy Sci*, **80**:1833-1840.

SCHMIDT D.G. (1982). Association of Caseins and Casein Micelle Structure; *In: Developments Of Dairy Chemistry-1. Proteins.* Applied Science Publishers, London.

SERIEYS F. (2015). Le Tarrissement Des Vaches Laitières. Une période clé pour la santé, la production et la rentabilité du troupeau. 2^{ème} Ed., Editions France Agricole. Paris.

SHARIF A. et MUHAMMAD G. (2009). Mastitis control in dairy animals. *Pak Vet J*, **29**:145-148.

SWAISGOOD H.E. (1982). Chemistry of milk protein; *In: Developments in Dairy Chemistry 1-Proteins*, Applied Science Publishers, London.

VERDI R.J. et BARBANO D.M. (1991). Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. *J.Dairy Sci*, **74**:772-782.

VIGNOLA C.L. (2002). Science Et Technologie Du Lait. Transformation Du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique. Canada.

WAES G. et BELLEGHEM V. (1969). Influence de la mammite sur les propriétés technologiques du lait et sur la qualité des produits laitiers. *Le Lait*, INRA Editions, **49** :485-486.

WALSTRA P. et JENNESS R. (1984). Dairy Chemistry And Physics. Editions Wiley-Interscience. New York, USA, 467p.

WOLTER R. et PONTER A. (2012). Alimentation De La Vache Laitière. 4^{ème} Ed., Editions France Agricole. Paris.

YAMAGATA K., MATSUMURA K., INOUE W., SHIRAKI T., SUZUKI K., YASUDA S., SUGIURA H., CAO C., WATANABE Y. et KOBAYASHI S.(2001). Coexpression of

microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci.*, **21**:2669-77

A close-up photograph of a hand holding a silver pen, writing on a notepad. The background is blurred, and the lighting is soft. The word "Annexes" is overlaid in a red, cursive font.

Annexes

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

1-Lieu, le...../...../2019 Lot-souchier
n°:.....

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

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

4-Animaux élevés : Bovins Ovins Caprins
Oiseaux Canins Équins

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

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

9-Tableau :

Catégories	Vaches	Vaches en lactation	Mâles	Veaux
Nombre de têtes

10-Type d'élevage : Laitier Viandeux Mixte

11-Race des vaches :.....

II-USAGE DES ANTIBIOTIQUES ET APPARITION DES RESISTANCES

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

Origine :.....

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

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

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

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

6-Dépistage des mammites subcliniques : Oui

Non

7-Le tarissement est il : Progressif

Brusque

8-Traitement ATB de mammites au tarissement : Oui

Non

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

Non

10-Destination du lait : Consommation familiale

Industrie transformatrice

III-CARACTERISTIQUES DES PRATIQUES DE LA TRAITE

1-Mode de traite : Manuel Mécanique

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

3-Nettoyage systématique de la mamelle : Oui Non

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

5-Essuyage : Oui Non

6-Élimination des premiers jets : Oui Non Parfois

7-Égouttage régulier en fin de traite : Oui Non

8-Trempage des trayons après la traite : Oui Non

9-Traite à part des vaches à mammites subcliniques : Oui Non

Annexe II: Dépistage des mammites subcliniques

Test de CMT (Schalm test): s'effectue avant la traite et implique le contrôle de tous les quartiers. Les mamelles sales doivent être nettoyées.

Technique de réalisation de TEST de CMT: California Mastitis Test

Procédure	Interprétation des résultats	
<p>&- Traire pour chaque quartier quelques jets (sans écume!) de lait dans la palette du test.</p> <p>&- Incliner la palette de manière à ne laisser que 2 à 3 mL de lait par récipient (niveau marqué)</p> <p>&- Ajouter une quantité équivalente de solution test dans chaque récipient.</p>		<p>négatif (-) (pas de réaction) jusqu'à env. 250'000 cellules Le mélange lait-solution du test conserve la même fluidité</p>
<p>&- Mélanger par rotation horizontale pendant 30 secondes de lait et la solution test.</p> <p>&- Évaluer la fluidité du mélange en inclinant la palette.</p> <p>&- Interpréter les résultats</p>		<p>légèrement positif ou + < 1.5 millions de cellules / mL Formation de stries visibles uniquement lorsque la palette est en mouvement</p>
		<p>moyennement positif ou ++ < 5 millions de cellules / mL Formation nette d'une couche visqueuse. Possible de faire couler le mélange par portions.</p>
		<p>fortement positif ou +++ > 5 millions de cellules / mL Formation d'une couche de gelée restant collée. Plus possible de faire couler le mélange par portions.</p>

Vu la subjectivité de différenciation entre le degré de la lyse cellulaire, on prend en compte uniquement l'aspect qualitatif du test.

Annexe III : Limites acceptables des diamètres d'inhibition (mm) obtenus par diffusion en gélose (SFM, 2019)

Classe d'ATB	Antibiotiques	Charge du disque	Diamètres critiques	
			Résistant	Sensible
β-lactamines	Pénicilline	1UI	<26	≥26
	Oxacilline	5μg	<20	≥ 20
	Céfoxitine	30μg	<22	≥ 22
Macrolides	Erythromycine	15 UI	<17	≥ 22
	Spiramycine	100μg	<14	≥18
Lincosamides	Clindamycine	15μg	<14	≥ 21
Glycopeptides	Vancomycine	30μg	--	≥15
Tétracyclines	Tétracycline	30UI	<17	≥ 19
Phénicolés	Chloramphénicol	30μg	<19	≥ 22
Fusidanines	Acide fusidique	10μg	<24	≥ 24

Annexe IV : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951).

1. Solution

Solution alcaline A

- ☞ Soude 0.1N.....500ml
- ☞ Carbonate de sodium anhydre (Na₂CO₃).....10g

Solution cuivrique B

- ☞ Sulfate de cuivre (CuSO₄, 5H₂O) (0.32g/100ml).....2ml
- ☞ Tartrate double de Na et de K (1g/100ml).....2ml

Solution C

- ☞ Solution A.....50ml
- ☞ Solution B.....1ml

Solution mère de BSA

- ☞ BSA.....10mg
- ☞ Eau distillée.....100ml

Gamme étalon

A partir de la solution de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Concentration en BSA ($\mu\text{g/ml}$)	0	10	25	50	75	100
Solution mère de BSA (μl)	0	100	250	500	750	1000
Eau distillée (μl)	1000	900	750	500	250	0

2. Méthode

- 1 ml d'échantillon contenant 100 μg de protéine maximum et 25 μg minimum ;
- Ajouter 5ml de solution C et mélanger ;
- Laisser 10 mn à température ambiante ;
- Ajouter 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- Laisser 30 mn à l'obscurité ;
- Lire la DO à 750nm au spectrophotomètre UV-visible.

3. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparée et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration de la protéine inconnue X est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

Annexe V : Électrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Solution d'acrylamide (A)

☞ Acrylamide.....	36g
☞ Bisacrylamide.....	1g
☞ Eau distillée.....	100 ml

Tampon de gel de séparation

☞ Tris.....	18.15g
☞ Eau distillée.....	100ml

Ajuster à pH 8.8 avec du HCl 4N

Tampon de gel de concentration

☞ Tris.....	6g
☞ Eau distillée.....	100ml

Ajuster à pH 6.8 avec du HCl 4N

Tampon d'électrode

☞ Tris	1.2g
☞ Glycine.....	5.76g
☞ SDS.....	0.2g
☞ Eau distillée.....	200 ml

Ajuster à pH 8.3 avec du Tris

Tampon d'échantillon

☞ Solution (C).....	500µl
☞ Eau distillée.....	250µl
☞ SDS (10%).....	250µl
☞ 2- mercaptoéthanol.....	50µl

Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon

Chauffage à 100°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide

Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu de bromophénol

Solution de fixation

☞ TCA.....	12 g
☞ Eau distillée.....	100 ml

Solution de coloration

☞ Bleu de Coomassie R250.....	0.5 g
☞ TCA.....	4 g
☞ Méthanol.....	100 ml
☞ Eau distillée.....	100 ml

Solution de décoloration

☞ Acide acétique.....	37.5 ml
☞ Eau distillée.....	312.5 ml
☞ Méthanol.....	150 ml

Solution de persulfate d'ammonium

☞ Persulfate d'ammonium.....	0.1g
☞ Eau distillée (qsp).....	1 ml

Electrophorèse

Préparation du gel de séparation : T=12% et C=2.7% (pour une plaque)

☞ Solution (A).....	4.15 ml
☞ Solution (B).....	2.5 ml
☞ Eau distillée.....	3.35 ml

Dégazer le mélange (maximum 2mn)

☞ SDS 10%.....	100 µl
☞ TEMED.....	13 µl
☞ Persulfate d'ammonium 10%.....	75 µl

Couler à environs 1.5 cm du sommet de la plaque de moindre

Préparation du gel de concentration : T=4.8 % et C=2.7% (pour une plaque)

☞ Solution (A).....	1.13 ml
☞ Solution (B).....	2.5 ml
☞ Eau distillée.....	5.8 ml

Dégazer quelques secondes

☞ Solution de SDS 10%.....	100 µl
☞ TEMED.....	20 µl
☞ Persulfate d'ammonium 10%.....	80 µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 250V

Fixation : 45mn dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe VI : Comparaison de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammitesux.

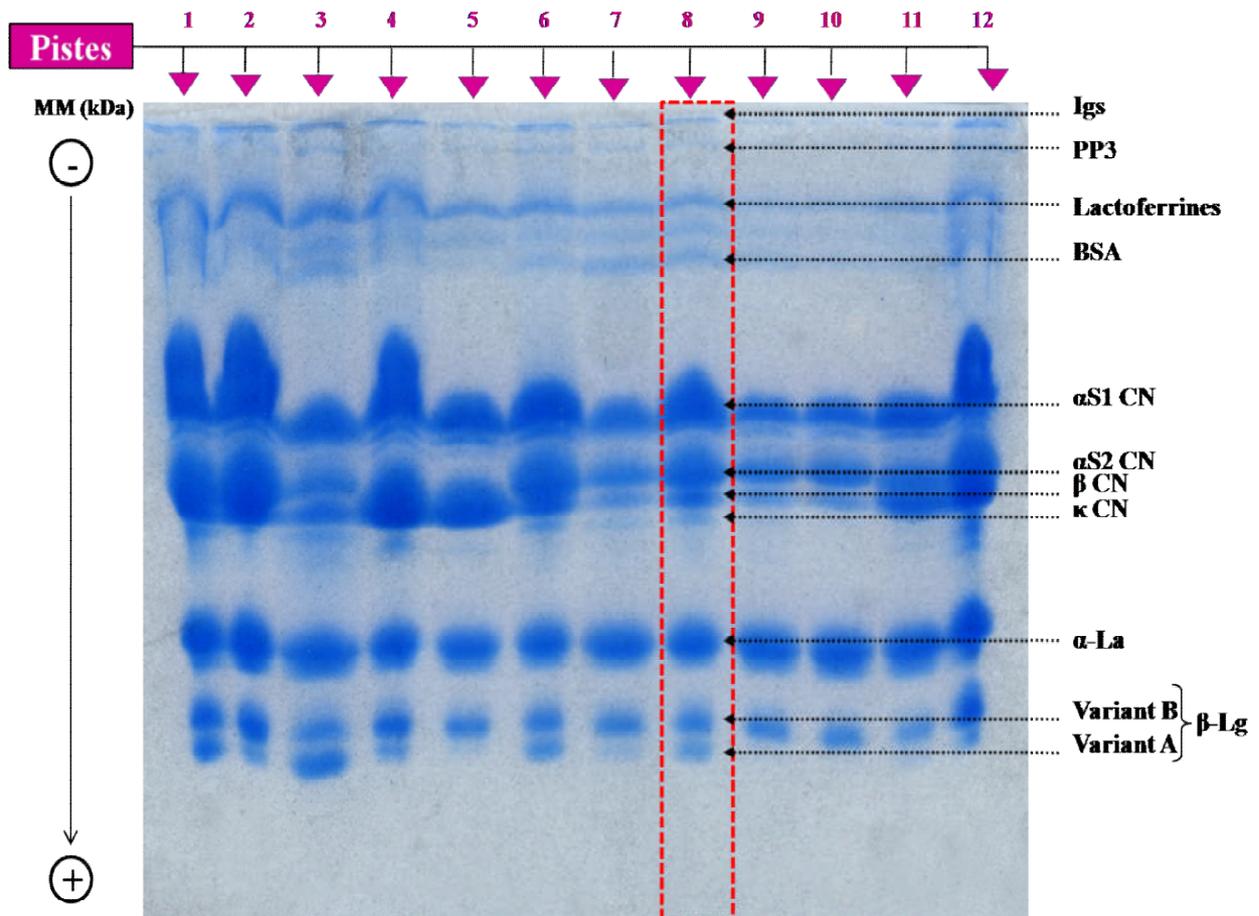


Figure 1: Profils électrophorétiques des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).
1: $V_1.PD^+$, **2:** $V_1.PG^-$, **3:** $V_2.AD^+$, **4:** $V_2.AG^-$, **5:** $V_2.PD^-$, **6:** $V_3.AD^+$, **7:** $V_4.PD^+$, **8:** $V_4.PG^-$,
9: $O_1.PD^+$, **10:** $O_1.PG^-$, **11:** $O_2.PD^-$, **12:** $O_2.PG^+$.

Tableau I : Analyse comparative de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammites de l'électrophorèse 1.

EPS	Pistes	Protéines totales										
		Igs	PP3	lactoferrines	BSA	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN	α -La	β -Lg	
											B	A
1	1	+	-	+	-	++	+	+	-	+	+	+
	2	+	-	+	±	++	+	±	-	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	-	+	-	++	+	+	-	+	+	+
	5	+	±	+	-	+	+	±	-	+	+	±
	6	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	±	+	±	+	+	+	±	+	+	-
	10	+	±	+	±	+	+	+	-	+	+	-
	11	+	±	+	±	+	+	+	-	+	+	±
	12	+	+	+	±	++	+	+	+	+	+	+

EPS : électrophorèse ; Igs : immunoglobulines ; PP3 : protéoses peptones, BSA : bovine sérum albumine ; CN : caséines ; La : lactalbumine ; Lg : lactoglobulines.

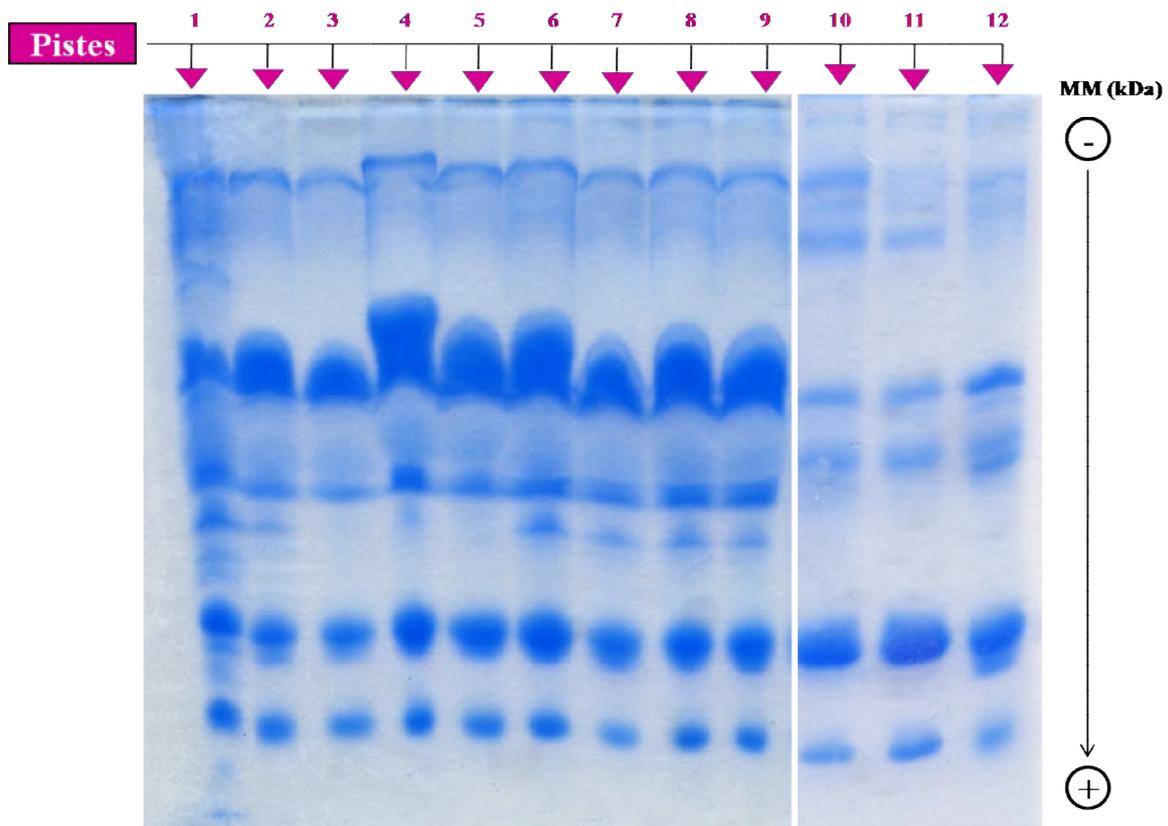


Figure 2: Profils électrophorétiques des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).
1: O₃.AG⁺, **2:** O₃.PG⁺, **3:** O₃.AD⁻, **4:** O₄.AD⁺, **5:** O₄.PG⁻, **6:** O₅.AD⁺, **7:** O₅.AG⁺, **8:** O₅.PD⁺, **9:** O₅.PG⁺, **10:** O₆.PD⁺, **11:** O₆.PG⁺, **12:** O₇.PD⁻.

Tableau II : Analyse comparative de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammites de l'électrophorèse 2.

EPS	Pistes	Protéines totales										
		Igs	PP3	lactoferrines	BSA	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN	α -La	β -Lg	
											B	A
2	1	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	\pm
	2	+	-	+	-	+	+	+	\pm	+	+	-
	3	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
	4	+	-	+	-	++	+	+	-	+	+	-
	5	+	-	+	-	++	+	-	-	+	+	-
	6	+	+	+	\pm	++	+	+	-	+	+	-
	7	+	+	+	\pm	+	+	+	-	+	+	-
	8	+	+	+	\pm	++	+	+	-	+	+	-
	9	+	+	+	\pm	++	+	+	-	+	+	-
	10	+	+	+	+	\pm	+	-	-	+	+	-
	11	+	\pm	+	+	\pm	+	-	-	+	+	-
	12	+	+	+	-	\pm	+	+	-	+	+	-

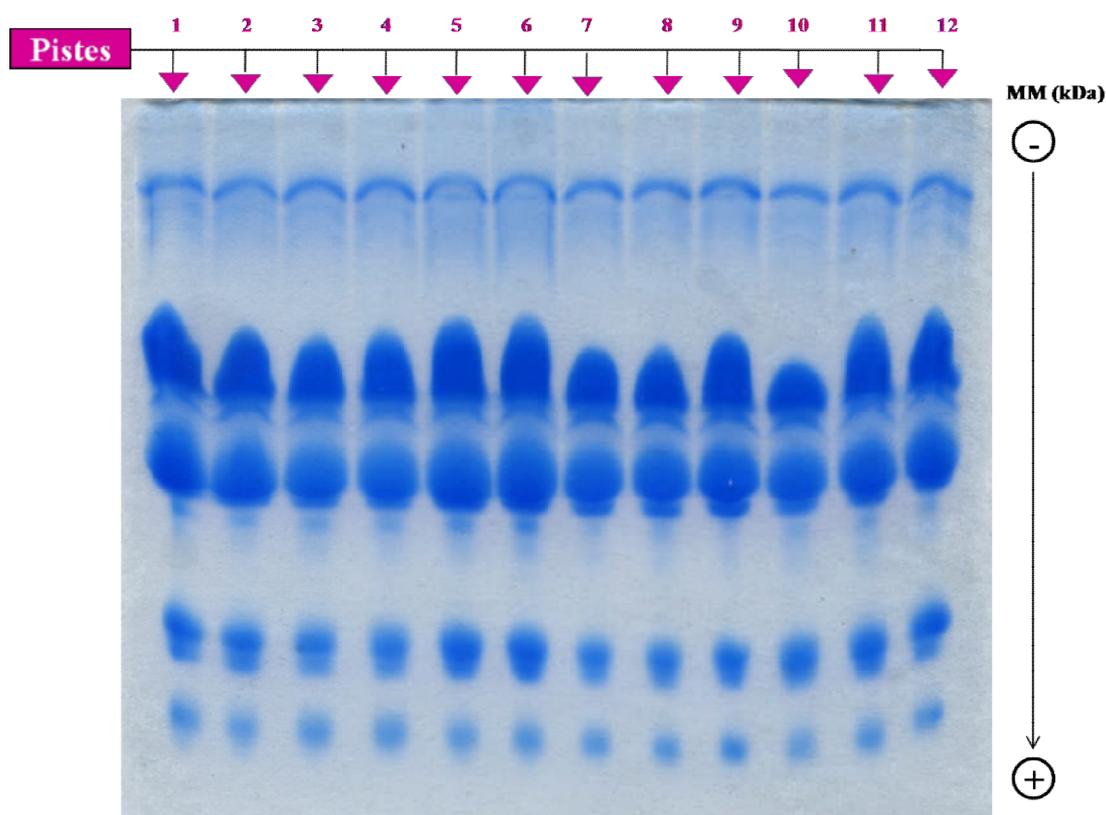


Figure 3: Profils électrophorétiques des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).

1: O₁.PD⁻, 2: O₁.PG⁺, 3: O₂.PD⁻, 4: O₂.PG⁺, 5: O₃.AD⁻, 6: O₃.AG⁺, 7: O₄.AG⁺, 8: O₄.PG⁺, 9: O₄.PD⁻, 10: 6.AD⁺, 11: 6.AG⁺, 12: 6.PD⁻.

Tableau III : Analyse comparative de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammitéux de l'électrophorèse 3.

EPS	Pistes	Protéines totales											
		Igs	PP3	lactoferrines	BSA	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN	α -La	β -Lg		
											B	A	
3	1	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	4	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	6	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	7	-	-	+	-	+	+	+	±	+	+	+	-
	8	-	-	+	-	+	+	+	±	+	+	+	-
	9	-	-	+	-	+	+	+	±	+	+	+	-
	10	-	-	+	-	+	+	+	±	+	+	+	-
	11	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	12	-	-	+	±	+	+	+	±	+	+	+	-

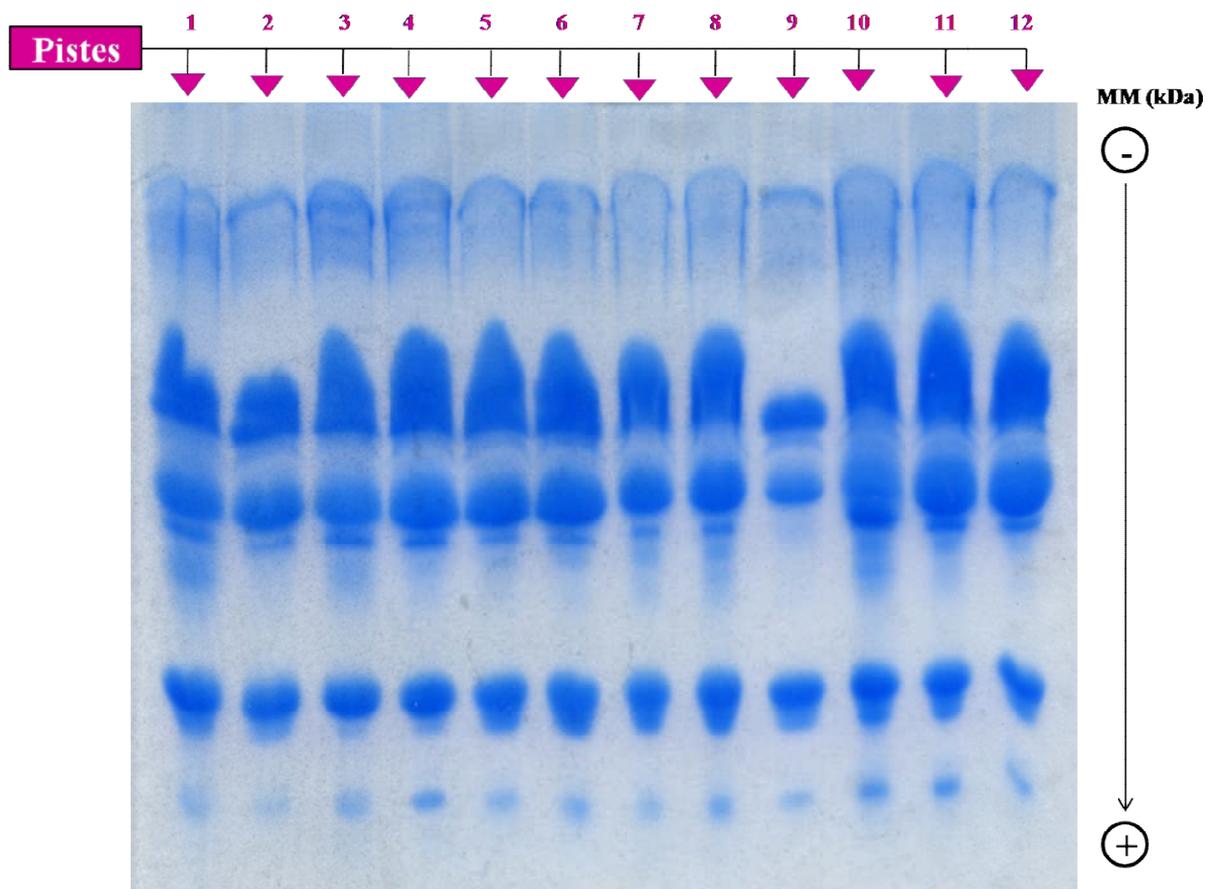


Figure 4: Profils électrophorétiques des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).

1: 7.AD⁺, **2:** 7.AG⁺, **3:** 7.PG⁺, **4:** 7.PD⁺, **5:** 8.AD⁺, **6:** 8.AG⁺, **7:** 8.PD⁺, **8:** 8.PG⁺, **9:** 9.AD⁻,
10: 11.AG⁺, **11:** 11.PD⁺, **12:** 11.AG⁻.

Tableau IV: Analyse comparative de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammitieux de l'électrophorèse 4.

EPS	Pistes	Protéines totales										
		Igs	PP3	lactoferrines	BSA	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN	α -La	β -Lg	
											B	A
4	1	-	-	+	-	++	+	+	+	+	+	-
	2	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	-
	3	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	-
	4	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	-
	5	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	-
	6	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	-
	7	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	-
	8	-	-	+	-	++	+	+	+	+	+	-
	9	-	-	+	\pm	+	+	-	-	+	+	-
	10	-	-	+	-	++	+	+	+	+	+	-
	11	-	-	+	-	++	+	+	+	+	+	-
	12	-	-	+	\pm	++	+	+	-	+	+	-

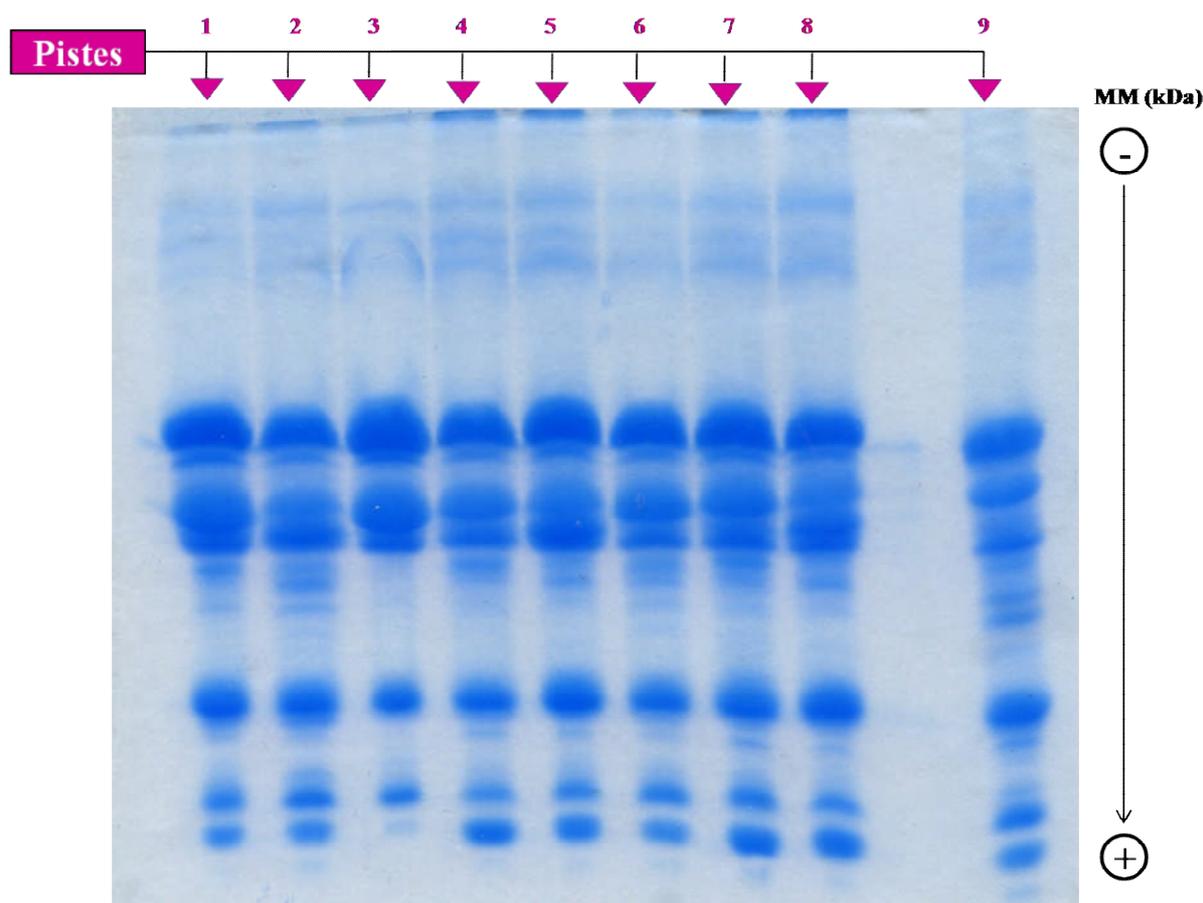


Figure 5: Profils électrophorétiques des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).
 1:KV₂.PD⁻, 2:II. AG⁺, 3: KV₅.AD⁺, 4: T₂.AD⁻, 5: T₁.PG⁺, 6: T₁.PD⁺, 7: T₂.AG⁺, 8: T₁.AD⁺, 9: KV₅.PD⁺.

Tableau V : Analyse comparative de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammitéux de l'électrophorèse 5.

EPS	Pistes	Protéines totales										
		Igs	PP3	lactoferrines	BSA	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN	α -La	β -Lg	
											B	A
5	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	±	-	+	+	+	+	+	+	+
	3	-	-	±	-	+	+	-	-	+	+	+
	4	-	-	±	+	+	+	+	-	+	+	+
	5	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+	+
	7	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+

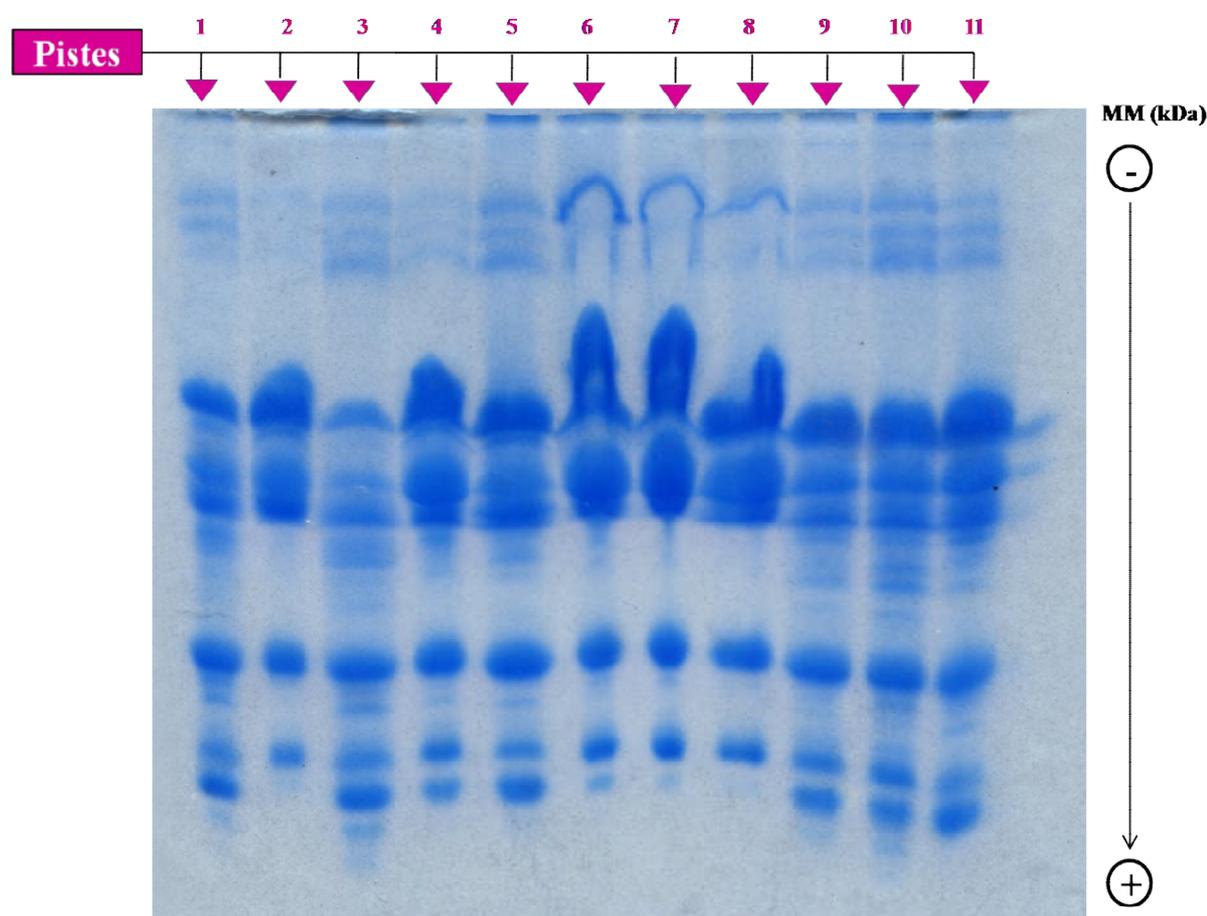


Figure 6: Profils électrophorétiques des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).

1: $KV_2.AD^+$, **2:** $KV_3.AD^-$, **3:** $KV_4.PG^+$, **4:** $KV_4.AG^-$, **5:** $KV_4.AD^+$, **6:** $KV_1.PD^-$, **7:** $KV_1.AG^+$, **8:** $KV_1.AD^+$, **9:** $KV_5.PG^+$, **10:** $KV_5.AG^+$, **11:** $T_2.PD^-$.

Tableau VI: Analyse comparative de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammitieux de l'électrophorèse 6.

EPS	Pistes	Protéines totales										
		Igs	PP3	lactoferrines	BSA	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN	α -La	β -Lg	
											B	A
6	1	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	±	-	+	+	+	-	+	+	-
	3	-	-	+	+	±	±	+	±	+	+	+
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	+
	7	-	-	+	-	++	+	+	-	+	+	+
	8	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

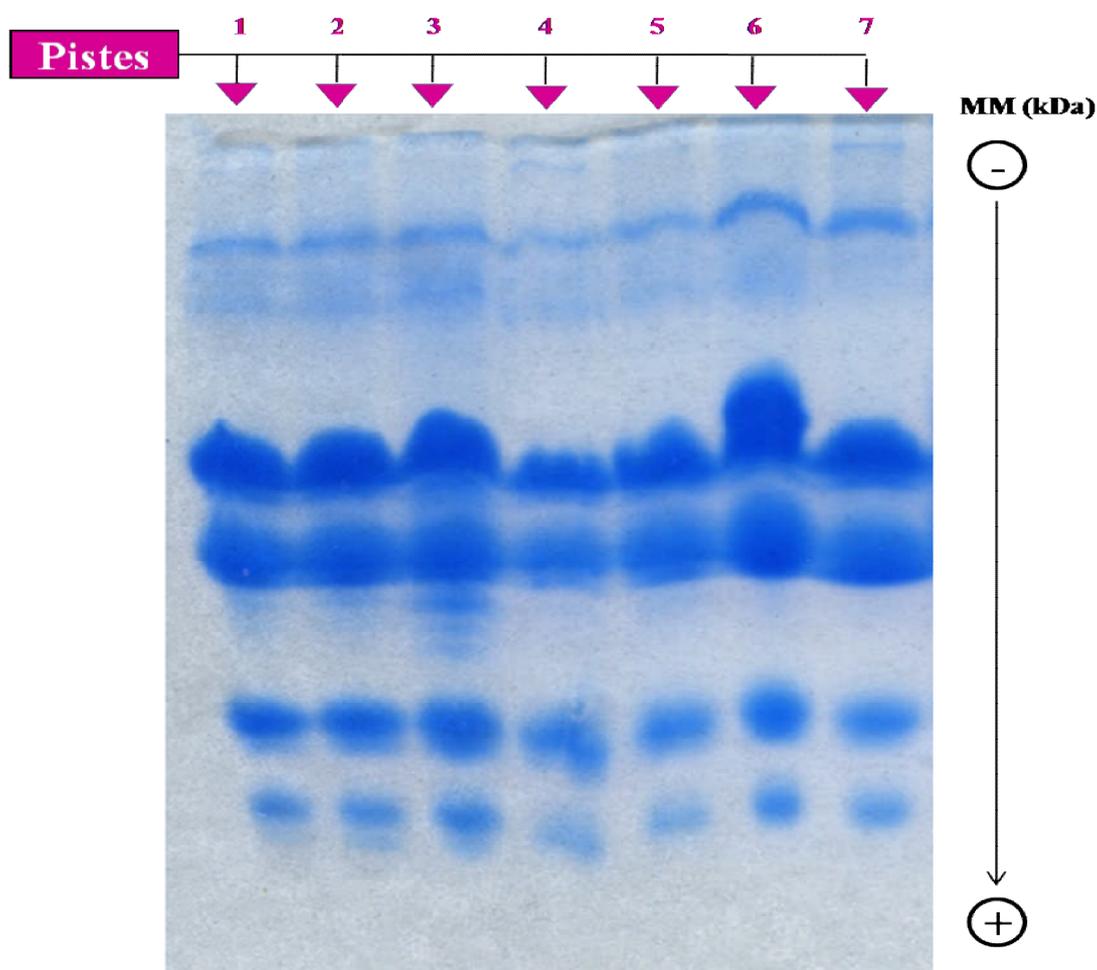


Figure 7: Profils électrophorétiques des protéines totales en PAGE-SDS ; gel de séparation ; (T=12% ; C=2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% et C= 2,7% ; pH 6,8).

1: IV.AG⁺, 2: IV.PG⁺, 3: IV.PD⁺, 4: IV.AD⁻, 5: V.PD⁺, 6: V.AG⁻, 7: O₇.AD⁻.

Tableau VII: Analyse comparative de la composition en protéines totales des échantillons de laits sains et mammitieux de l'électrophorèse 7.

EPS	Pistes	Protéines totales										
		Igs	PP3	lactoferrines	BSA	α S1-CN	α S2-CN	β -CN	κ -CN	α -La	β -Lg	
											B	A
7	1	-	-	+	\pm	+	+	+	-	+	+	-
	2	-	-	+	\pm	+	+	+	-	+	+	\pm
	3	-	-	+	\pm	+	+	+	+	+	+	\pm
	4	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	5	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	6	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
	7	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-