



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR- KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER

FILIERE : Biologie

OPTION : Microbiologie appliquée

Thème

**Occurrence et profil d'antibiorésistance
des *Staphylococcus* isolés du lait de
vache cru**

Présenté par :

BELAIDI Khawla

DERNANI Aicha

Soutenu le: 28/06/2017

Membres du jury

Président : Mr ABAIDIA A. (M.A.A)

Université Abbès Laghrou – Khenchela

Encadreur : M^{lle} CHORFI K. (M.A.A)

Université Abbès Laghrou – Khenchela

Examineur : Mr BOUSSAA A. (M.A.A)

Université Abbès Laghrou – Khenchela

Promotion : 2016/2017

Dédicace

*Je remercie tout d'abord mon **Dieu** de m'avoir donné courage, patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail.*

Toutes les lettres ne seraient trouver les mots qu'il faut....

Je dédie ce travail à :

Mes adorables parents qui étaient toujours présents avec leur soutien moral et matériel, derrière toutes mes réussites depuis l'école primaire Jusqu'à ce jour.

A mon très cher père :

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A ma très chère mère :

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi , Mama, tues la seule qui me comprenne : Je te demande pardon et encore une fois Merci. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A mon unique frère : Mohammed el amine ; merci pour votre amour, soutien et encouragements.

Mes charmantes sœurs : Radja, lillia et khitam surtout ma cousine et son enfant Abdel Moez Pour leur soutien moral, et leur encouragement incessant pendant ce travail.

A mon Fiancé Halim et à toute sa famille, surtout à son neveu Loay , Pour ses encouragements son dévouement ainsi son soutien moral tout au long de la réalisation de ce travail.

Mon binôme, Aicha, qui est pour moi une vraie sœur et toute sa famille.

Mes copines : Aicha , Radhia, Zakia djennet, Zineb, Safa, Rihanna

Sans oublier Sara notre cher ingénieur de laboratoire.

A tous mes enseignants et enseignantes, durant mes 5 années d'études universitaires.

***A toute ma promotion de Master Microbiologie
KHENCHELA 2016 /2017.***

Khawla



ALLAH

Je remercie tout d'abord ALLAH tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Le plus cher à mon cœur mon papa Djamai

L'école de mon enfance, qui à été mon ombre durant mes années d'études, qui a pris soin de moi tout au long de ma vie, qui m'a encouragé, m'a donné de l'aide et la protection, Il est mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Vos conseils m'ont beaucoup aidé et je crois avoir atteint en partie vos objectifs. Aucune dédicace ne pourrait t'exprimer mes sentiments mon cher papa, Tu me manque beaucoup, Vous resterez toujours dans mon cœur. Qu'ALLAH te garde dans son vaste paradis

A ma chère mère

La lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur qui a contribué à ma réussite, qui m'a toujours aidée avec sa d'Oaa ses conseils précieuses et j'espère rendre tout ce qu'elle a fait pour moi. Merci de tout cœur, que dieu vous accorde santé et longue vie.

A mes chers frères et sœur

Salah, Adel, Nacira, Rofaida, Ouarda, son mari et ses petites Radhia, Houda, Amina, Sara, Loubna, Rima, Dalel et Amira. Merci pour tous les efforts auxquels vous avez toujours consentis pour me voir réussir. Merci pour vos encouragements et vos conseils. Je ne saurais exprimer tout l'amour que j'éprouve pour vous. Je suis fière de faire partie d'une famille aussi unie et solidaire.

A mon collègue dans la vie Karim et sa mère

Source de mes efforts, la personne la plus digne de mon estime Et de mon respect, Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi. Qu'Allah puisse vous accorder santé, bonheur et nous protège ta mère.

A mes proches amies

A mes belles amies les plus près dans mon cœur qui sont Khawla, Radhia, chahira, Safaa, Zineb, Zakia, Naouel, Souad, Hayate et Widad, Merci, pour votre présence avec moi dans les bons et les difficiles moments, vos bons conseils et nos fous rires partagés.

Ma famille

Je veux remercier mon père Abd Arahmane, mes tantes et mes oncles, mes cousins et mes cousines surtout Sabrina, Lotfi et Zahia, pour leurs encouragements incessants et leur soutien moral aux moments difficiles

A mes camarades de la promotion 2^{ème} année Master Microbiologie (2016/2017).

Aicha

Remerciements

Nous remercions ALLAH tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénies jusqu'à la réalisation de ce modeste travail.

On tient à remercier particulièrement notre Promoteur de thèse Madame CHORFI Keltoum d'avoir proposé et dirigé ce travail, pour toute l'aide qu'elle nous a fournie pendant la préparation de ce mémoire. Merci pour votre patience ainsi que votre générosité. On n'a pas assez des mots pour décrire votre noblesse. Malgré vos multiples occupations, vous étiez toujours disponible. Apprendre à vos côtés a été un grand honneur. Que Dieu vous récompense.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury:

Mr ABAIDIA A. Maître assistant A à l'Université Abbés Laghrour Khenchela qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. On le remercie profondément.

Mr BOUSSAA A. maître assistant A à l'Université Abbés Laghrour Khenchela, on vous suis très reconnaissantes d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie et en particulier Mr. KHABTHANE A. doyen de la faculté.

On remercie aussi Madame CHORFI R. responsable des laboratoires pédagogiques de l'université Abbés Laghrour Khenchela pour son accueil et son aide dans le déroulement des expérimentations et aussi tout le personnel.

Ce travail de thèse a été aussi réalisé au laboratoire central de l'hôpital Ahmed ben belle de Khenchela, merci aux employés du laboratoire central pour leur aide et surtout pour leur gentillesse durant notre période de stage.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Aïcha et Khawla

Sommaire

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Liste des photographies	iii
Liste des abréviations.....	iv
Liste des annexes.....	vi

Revue bibliographique

Introduction	01
--------------	----

Chapitre I Généralités sur le lait

1. Généralités sur le lait.....	04
1.1. Définitions du lait.....	04
1.2. Le lait cru.....	04
1.3. Composition du lait de vache	04
1.3.1. L'eau.....	05
1.3.2. Matière grasse.....	05
1.3.3. Matière azotée.....	06
1.3.4. Les glucides	06
1.3.5. Vitamines.....	07
1.3.6. Enzymes.....	07
1.4. Caractéristiques physico-chimiques de lait.....	08
1.4.1. La densité du lait.....	08
1.4.2. Le pH.....	08
1.4.3. Le point de congélation	08
1.4.4. Conductivité électrique.....	08
1.4.5. Acidité.....	09
1.5. Qualité organoleptique du lait.....	09
1.5.2. L'odeur.....	09
1.5.3. Saveur.....	09
1.6. Microbiologie de lait cru.....	09
1.6.1. La flore originale.....	10
1.6.2. La flore de contamination.....	10

Chapitre II : Microflore pathogène de lait

I. La flore pathogène de lait.....	13
II. Généralités sur le genre <i>Staphylococcus</i>	13
II.1. Historique et nomenclature.....	14
II.2. Habitat.....	14
II.3. Classification.....	15
II.5. Caractères culturels.....	17
II.6. Pathogénicité et virulence.....	17
II.7. Les toxi-infection alimentaire staphylococcique	18
III. L'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	18
III.1. Caractères morphologiques.....	19
III.2. Caractères biochimiques.....	19

III.3. Facteurs de virulence.....	20
III.4. Exo protéines enzymatiques et toxique.....	20
III.4.1. Toxine.....	21
III.4.2. Enzymes.....	21
IV. Résistance aux antibiotiques chez <i>Staphylococcus aureus</i>	22

Matériel et méthodes

I. Caractéristiques générales du site d'étude.....	25
II. Procédure d'échantillonnage.....	25
III. Les paramètres microbiologiques.....	22
III.1. Matériel et réactifs utilisés.....	23
III.1.1. Appareillages.....	23
III.1.2. Verreries.....	23
III.1.3. Milieux de culture.....	23
III.1.4. Outils des tests biochimiques.....	23
III.2. Réalisation des dilutions en série.....	23
III.3. Méthode d'enrichissement au milieu de Giolliti Cantonii.....	24
III.3.1. Préparation du milieu d'enrichissement.....	24
III.3.2. L'ensemencement.....	24
III.3.3. Tests de confirmation.....	24
III.3.4. Expression des résultats.....	25
III.3.5. Tests complémentaires.....	26
III.3.5.1. Test catalase.....	26
III.3.5.2. Test coagulase libre.....	26
III.3.5.3. La coloration de Gram.....	27
III.3.6. L'identification biochimique (système API).....	28
III.3.7. L'étude de l'antibiorésistance.....	33
III.3.7.1. L'antibiogramme standard (méthodes des disques).....	33

Résultats et discussion

I. Isolement et identification des <i>Staphylococcus spp</i>	36
I.1. Résultats d'enrichissement sur milieu Giolliti Contonii.....	36
I.2. Résultats des tests de confirmation	37
I.2.1. Résultats d'isolement sur gélose Baird Parker.....	37
I.2.2. Résultats d'isolement sur gélose Chapman.....	37
I.3. Résultats des tests complémentaires.....	38
I.3.1. Coloration de Gram.....	38
I.3.2. Test catalase.....	38
I.3.3. Test de coagulase.....	39
I.4. Identification biochimique des isolats.....	32
II. Antibiorésistance des espèces identifiées.....	44
III. La multirésistance.....	47
Conclusion et Perspectives.....	49
Références Bibliographiques.....	52
Résumé	
Résumé Anglais	
Résumé Arabe	

Liste des tableaux

Tableau I	Composition générale du lait de vache	04
Tableau II	Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L)	06
Tableau III	Présentaton des espèces du genre <i>Staphylococcus</i>	14
Tableau IV	Différents caractères bactériologiques de <i>Staphylococcus</i>	15
Tableau V	Facteurs de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Tableau VI	Toxines impliquées dans la virulence de <i>S. aureus</i>	19
Tableau VII	Enzymes de virulence de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Tableau VIII	Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques	31
Tableau IX	Résultats des tests de confirmation	36
Tableau X	Résultats d'identification biochimique des espèces de Staphylocoques	37
Tableau XI	Pourcentage et nombre des différentes espèces identifiées	39
Tableau XII	La résistance aux antibiotiques des <i>Staphylococcus</i> identifiées	41
Tableau XIII	Les taux de résistance aux antibiotiques des <i>Staphylococcus</i> identifiées.	41

Liste des figures

Figure 01	Composition de la matière grasse du lait	04
Figure 02	Protocole d'enrichissement au milieu Giolliti Contonĭ	25
Figure 03	Test de Catalase	26
Figure 04	Principe du test Coagulase	27
Figure 05	Les différentes étapes de coloration de Gram	28
Figure 06	Répartition des isolats de <i>Staphylococcus</i> selon leurs coagulase	36
Figure 07	Répartition des isolats de <i>Staphylococcus</i> selon l'espèce identifiée	39
Figure 08	Pourcentage de résistance des <i>Staphylococcus</i> identifiées vis à vis les 13 antibiotiques testés	42
Figure 09	Pourcentage d'isolats de <i>Staphylococcus</i> résistants à au moins 3, 7, 8 et 9 antibiotiques	43

Liste des Photographies

Photographie 01	Les vaches traitées et parcelles de terrain de notre site d'étude	22
Photographie 02	Un microscope équipé d'un appareil photographique numérique.	27
Photographie 03	La galerie API 20 STAPH inoculée avant l'incubation	30
Photographie 04	Application des disques d'antibiotique	31
Photographie 05	Résultats d'enrichissement sur de bouillon Giolliti Contonii après incubation	32
Photographie 06	Résultats d'isolement sur gélose Baird Parker	33
Photographie 07	Résultats d'isolement sur gélose Chapman	33
Photographie 08	Résultats de la coloration de Gram	34
Photographie 09	Production de catalase par les cocci à Gram positif isolés	35
Photographie 10	Test de coagulase	35
Photographie 11	Les espèces bactériennes identifiées et l'aspect de leurs galeries biochimiques	38
Photographie 12	Résultats des antibiogrammes.	40

Liste des abréviations

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius .

ADH : Hormone antidiurétique .

Agr : Gène accessoire .

API : Appareil et Procédés d'Identification .

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

BN : Bouillon nutritif.

DNase : Deoxyribonuclease.

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

FAO : Organisation mondiale de la santé animale.

g/L : Gramme / Litre .

GC : Giolliti Contonii

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

I : Intermédiaire

mg/L : Milligram / Litre .

NaCl : Chlorure de sodium.

OMS : l'Organisation mondiale de la santé .

ONA : Office National de l'Assainissement .

pH : Potentiel hydrogène.

R : Résistante.

S : Sensible.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline .

SCN : Staphylocoques sont à coagulase négative .

SCP : Staphylocoques sont à coagulase positive .

SE : Entérotoxines staphylococciques .

TB : Taux butyreux .

TBE : Tick Born Encephalitis Virus.

TCR : T Cell Receptor .

TIAC : Toxi-infections alimentaires collectives .

TNF : Tumor necrosis factor.

TSST : Toxic shock syndrome toxin .

Introduction

Introduction

Le lait est un fluide biologique complexe, sécrété par les mammifères (**Rasolofo, 2010**). Il constitue un aliment important dans l'alimentation quotidienne de l'homme vu sa composition équilibrée en nutriments de base (protéines, lipides et glucides), sa richesse en calcium et son apport non négligeable en vitamines (A, B2, B5 et B12) et en divers sels minéraux (**Ouali, 2003**).

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de 3 milliards de litres par an (**Kirat, 2007**). Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens, il apporte la plus grande part de protéines d'origine animale. Acteur clé de l'industrie agroalimentaire, la filière Lait connaît une croissance annuelle de 8%. Avec un taux de collecte inférieur à 15%, cette filière reste, cependant, fortement dépendante de l'importation de poudre de lait (**Silait, 2008**).

Le lait n'est pas seulement un aliment nutritif pour l'homme mais il est souvent un milieu de culture idéale pour la croissance microbienne. Par conséquent il peut être sujet à de nombreuses altérations et contaminations lors de la traite ou la collecte par les microorganismes dont certains sont potentiellement pathogènes de point de vue sanitaire. Le lait cru et les produits laitiers contaminés ont été associés à des intoxications alimentaires causées par *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* entérohémorragique.

Les intoxications alimentaires sont considérées comme l'une des principales causes de toutes les maladies d'origine alimentaire. Elles ont un impact majeur sur la santé publique dans le monde entier.

Parmi les bactéries prédominantes impliquées dans ces maladies, *Staphylococcus aureus*, reconnu dans le monde entier comme un important agent pathogène polyvalent à l'homme et l'animal, provoquant ainsi une grande variété de maladies, allant de la sévérité de l'intoxication alimentaire, le syndrome du choc toxique, à des infections moins graves, comme les furoncles

De nombreuses études portant sur les *Staphylococcus* se justifient par l'immense rôle qu'il joue en pathologie infectieuse humaine et vétérinaire. La recrudescence de la multirésistance aux agents antimicrobiens constitue un problème majeur de santé publique dans le monde en raison des fréquences qui ne cesse d'augmenter et provoquent des impasses thérapeutiques dans le prochain avenir.

Staphylococcus est présent de même sur la peau et les muqueuses des animaux producteurs de denrées alimentaires, tels que les ruminants où il est fréquemment associé aux mammites subcliniques conduisant à la contamination du lait et ses dérivés.

La virulence de cet agent pathogène dépend en fait de plusieurs facteurs parmi eux, la résistance aux antibiotiques, qui constitue une menace majeure pour la santé publique de part le monde, en raison de la circulation de souches résistantes dans l'environnement et la possible contamination de l'eau et de la nourriture.

Afin de surveiller l'innocuité du lait de vache cru, il est impératif d'évaluer le degré de contamination microbiologique de cet aliment destiné à la consommation humaine, ce qui nous a motivé pour le choix de ce thème, dont **l'objectif principal** a été :

- D'isoler et identifier des souches de *Staphylococcus* dans le lait de vache cru collecté à partir d'une petite ferme traditionnelle de la wilaya de kenchela;
- D'étudier la résistance des souches identifiées vis-à-vis de certaines familles d'antibiotiques ;
- Déterminer le pourcentage de résistance aux antibiotiques et mettre en évidence le caractère multirésistant des souches selon leur profil de sensibilité aux familles d'antibiotiques

Pour ce faire notre étude est divisée en deux parties :

- Une synthèse bibliographique : subdivisée en deux chapitres à savoir, généralités sur le lait et la microflore pathogène du genre *Staphylococcus* dans le lait.
- Une partie pratique : subdivisée en matériel et méthodes, résultats et discussion, et finalement une conclusion.

Chapitre 01

1. Généralités sur le lait

1.1. Définitions du lait

Le lait a été défini en 1908, au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum» (**Alais, 1975**).

Le lait est produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires des mammifères femelles. La fonction première du lait pour chaque espèce de mammifères est de nourrir les nouveau-nés, en leur apportant une excellente source d'acides aminés. (**Picaud J-C, 2008**).

Le lait cru est le lait qui sort directement du pis de la vache. N'ayant subi aucun traitement thermique (au-delà de 40°C) ou non thermique afin de réduire la concentration en microorganismes, celui-ci conserve toute la flore microbienne d'origine et doit donc être consommé dans les 48 heures suivant la traite et se conserver au frais (entre 2 et 4°C). (**Haller et Floquet, 2002**).

1.2. Le lait cru

Le lait cru est un lait qui n'a subi aucun traitement de conservation sauf la réfrigération à la ferme. La date limite de vente correspond au lendemain du jour de la traite. Le lait cru doit être porté à l'ébullition avant consommation (car il contient des germes pathogènes). Il doit être conservé au réfrigérateur et consommé dans les 24h (**Fredot, 2005**).

Le lait cru est un produit hautement nutritif sur le plan de la nutrition. Sa production doit être sévèrement contrôlée en raison des risques éventuels qu'il peut présenter pour la santé humaine. En effet, des souches pathogènes pour l'Homme et l'Animal, pouvant avoir acquis des résistances multiples aux antibiotiques peuvent y proliférer. Une évaluation de la qualité hygiénique du lait permet de rechercher la microflore naturelle et des microorganismes témoins de contaminations extra-mammaires éventuelles (**Mofredj et al., 2007**).

1.3. Composition du lait de vache

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants : eau, lipides, protéines (principalement de la caséine), acides aminés, vitamines et minéraux. (**Alves de Oliveira L, 2007**).

Le lait de vache est un lait caséineux. Sa composition générale est représentée au **Tableau I**. Les données sont des approximations quantitatives, qui varient en fonction d'une multiplicité de facteurs : race animale, alimentation et état de santé de l'animal, période de

lactation, ainsi qu'au cours de la traite. Il reste que la composition exacte d'un échantillon de lait ne peut s'obtenir que par analyse (**Roudaut et Lefrancq, 2005**).

Tableau I : Composition générale du lait de vache (**Fédération des producteurs de lait du Québec, 2000**).

Constituants majeurs	Variation limites %	Valeur moyenne %
Eau	85,5 - 89,5	87,5
Matière grasse	2,4 - 5,5	3,7
Protéines	2,9 - 5,0	3,2
Glucides	3,6 - 5,5	4,6
Minéraux	0,7 - 0,9	0,8

1.3.1. L'eau

L'eau est l'élément quantitativement le plus important : 900 à 910 g par litre. En elle sont dispersés tous les autres constituants du lait, tous ceux de la matière sèche (**Mathieu, 1998**).

L'eau de lait se trouve sous deux formes : l'eau libre (96% de la totalité) et l'eau liée (4%) liée à la matière sèche. (**Ramet, 1985**).

1.3.2. Matière grasse

La matière grasse est présente dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras. La teneur en matière grasse du lait est appelée taux butyreux (TB) (**Courtet Leymarios, 2010**).

Les matières grasses du lait se compose principalement de triglycérides 98%, de phospholipides 01 % et d'une fraction insaponifiable 01% constituée en grande partie de cholestérol et de β carotène (**Grappin., Pochet, 1999**).

La matière grasse est dispersée en émulsion, sous forme de microgouttelettes de triglycérides entourées d'une membrane complexe, dans la phase dispersante qu'est le lait écrémé (**Boutonnier, 2008**).



Figure 01: Composition de la matière grasse du lait (**Bylund, 1995**).

1.3.3. Matière azotée

La matière azotée du lait englobe deux groupes, les protéines et les matières non protéiques qui représentent respectivement 95% et 5% de l'azote minéral du lait (**Goursaud, 1985**).

Les protéines se répartissent en 2 phases : une phase micellaire représente la caséine totale (environ 78% des protéines du lait) du lait. Elle est formée par quatre protéines individuelles : (**Bachtarzi, 2012**).

- Alpha-caséines ou caséines α_1 36 % et α_2 10 %
- Bêta-caséine ou caséine β 34 %
- Kappa-caséine ou caséine κ 13 %
- Gamma-caséines ou caséine γ 7 % (produits de la protéolyse de la β -caséine) (**Goy et al., 2005**).

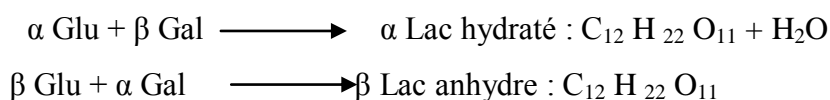
Une micelle de caséine contient environ 92 à 93% de protéines, les caséines, et 8% de minéraux. La partie minérale de la micelle comporte 90% de phosphate de calcium et 10% d'ions citrate et de magnésium (2,9 % de Ca, 0,1% de Mg, 4,3% d'ions phosphate, 0,5% d'ions citrate) (**Cayot et Lorient, 1998**).

La présence de phosphate de calcium lié à la caséine est l'une des forces responsables de la stabilité de la structure des micelles de caséine (**Marchin, 2007**).

La deuxième phase ou la phase soluble, englobe les protéines du lactosérum (β -lactoglobuline et α -lactalbumine, sérumalbumine et immunoglobuline plus les protéoses peptones) qui représentent 17% de la matière azotée. Les protéines du lactosérum sont des protéines d'excellente valeur nutritionnelle, riche en acides aminés soufrés, en lysine et tryptophane. Elles ont de remarquables propriétés fonctionnelles mais sont sensibles à la dénaturation thermique (**Ghaoues, 2011**).

1.3.4. Les glucides

Le lactose, disaccharide composé de glucose et de galactose, est le seul glucide libre du lait présent en quantités importantes, sa teneur est très stable entre 48 et 50 g/L. Cette teneur présente de faibles variations à la différence du taux butyreux, ce qui est à l'origine de la présence de 2 lactoses (**Luquet, 1985**) :



Le lactose est le seul glucide libre dans le lait, synthétisé par la glande mammaire à partir du glucose prélevé dans le sang. Il joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme élément de fermentescibilité. Il peut être hydrolysé par les acides forts, mais

surtout par la lactase. La saveur sucrée du lactose est faible; lorsqu'on impute au saccharose une valeur arbitraire de 100%, celle du lactose atteint environ le tiers (de 27 à 39%) (**Courtet Leymarios, 2010**).

1.3.5. Vitamines

Les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à la vie puisqu'elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle des membranes cellulaires. L'organisme humain n'est pas capable de les synthétiser (**Vignola, 2002**).

On distingue d'une part les vitamines hydrosolubles (vitamine du groupe B et vitamine C) en quantité constantes, et d'autre part les vitamines liposolubles (A, D, E et K) (**Jeantet et al., 2008**).

Tableau II: Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L) (**FAO, 1998**).

Teneur en Vitamines hydrosolubles	
- B ₁ (thiamine)	0,42
- B ₂ (riboflavine)	1 ,72
- B ₆ (pyridoxine)	0,48
- B ₁₂ (cobalamine)	0,0045
- Acide nicotinic (niacine)	0,92
- Acide folique	0 ,053
- Acide panthothénique	3,6
- Biotine	0,036
- C (acide ascorbique)	8
Teneur en Vitamines lyposolubles	
- A	0,37
- β-carotène	0 ,21
- D (cholécalférol)	0 ,0008
- E (tocophérol)	1,1
- K	0 ,3

1.3.6. Enzymes

Ce sont des substances organiques de nature protidique, produites par des cellules ou des organismes vivants, agissant comme catalyseurs dans les réactions biochimiques. Plus de 60 enzymes principales ont pu être isolées du lait ou dont l'activité a été déterminée. La moitié d'entre elles sont des hydrolases (**Blanc, 1982 ; Pougheon, 2001**).

Le lait contient principalement trois groupes d'enzymes : les hydrolases, Les déshydrogénases (ou oxydases) et les oxygénases. En effet, chaque enzyme possède un pH et une température d'activité maximale (**Veisseyre, 1975**).

1.4. Caractéristiques physico-chimiques de lait

1.4.1. La densité du lait

La densité du lait a été étudiée à plusieurs reprises : elle varie peu avec la race et l'âge de l'animal, sous l'influence de l'alimentation du travail et présente parfois des variations brusques et accentuées chez le même animal, quoi que soumis à la même alimentation durant un laps de temps prolongé. Tenant compte de ces facteurs on peut considérer les chiffres extrêmes de la densité à 150°C. la densité du lait de vache est de 1,031 dans 80% des cas (**Tooher, 1925**).

1.4.2. Le pH

Le pH renseigne précisément sur l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH de l'ordre de 6,7. S'il y a une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H_3O^+) et donc une diminution du Ph.

A la différence avec l'acidité titrable qui elle mesure tous les ions H^+ disponibles dans le milieu, dissociés ou non (acidité naturelle + acidité développée), reflétant ainsi les composés acides du lait (**CIPC lait, 2011**).

Un lait mammitieux, contenant des composés à caractéristiques basiques, aura un pH > 7 et le colostrum un pH voisin de 6 (**Luquet, 1985**). (**Remeuf et al., 1989**).

1.4.3. Le point de congélation

Le point de congélation du lait est l'une de ses caractéristiques physiques les plus constantes. Sa valeur moyenne, si l'on considère des productions individuelles de vache, se situe entre $-0,54\text{ }^\circ\text{C}$ et $-0,55\text{ }^\circ\text{C}$ (**Mathieu, 1998**).

La mesure du point de congélation du lait de troupeau est couramment utilisée pour contrôler l'absence de mouillage lors de la traite, de la conservation ou de la collecte (**Parguel et al., 1994**).

1.4.4. Conductivité électrique

Elle est utilisée pour évaluer la teneur ionique totale du lait et est définie comme la mesure de la résistance électrique de la solution en ohms réciproques (ohms). Les éléments qui contribuent le plus à la conductivité sont le sodium, le potassium et les ions de chlorure. Comme les quantités de sodium et de chlorure augmentent en cas de mammité, des mesures de la

conductivité du lait sont employées pour détecter des cas cliniques de la maladie. (**Betelgeux, S-L**).

1.4.5. Acidité

Selon **Jean Cau (1993)**, l'acidité du lait résulte de l'acidité naturelle, due à la caséine, aux groupes phosphate, au dioxyde de carbone et aux acides organiques et de l'acidité développée, due à l'acide lactique formé dans la fermentation lactique.

Normalement l'acidité du lait est proche de la neutralité (PH=7,0). Il est légèrement acide et son pH varie normalement de 6,6 à 6,8. Cependant, lorsque le lait n'est pas refroidi rapidement à 4°C après la traite, l'acidité est suffisamment forte à température ambiante (un pH inférieur à 4,7) la caséine du lait coagule. Si la température est plus élevée, la coagulation de la caséine du lait se produit en présence de moins d'acide (un pH plus élevé). (**Wattiaux, 1997**).

1.5. Qualité organoleptique du lait

1.5.1 Couleur

Le lait est un liquide blanc mat, opaque à cause des micelles de caséinates, ou parfois bleuté ou jaunâtres du fait du β carotène ou de la lactoflavine contenue dans la matière grasse (**Guiraud, 1998**).

1.5.2. L'odeur

Selon **Vierling (2003)**, l'odeur est caractéristique le lait du fait de la matière grasse qu'il contient fixe des odeurs animales. Elles sont liées à l'ambiance de la traite, à l'alimentation (les fourrages à base d'ensilage favorisent la flore butyrique, le lait prend alors une forte odeur), à la conservation (l'acidification du lait à l'aide de l'acide lactique lui donne une odeur aigrelette).

1.5.3. Saveur

Il est difficile de définir cette caractéristique du lait normal car elle provient de l'association d'éléments diversement appréciés selon l'observateur. En effet, on distingue la saveur douce du lactose, la saveur salée du NaCl, la saveur particulière de lécithines qui s'équilibre et qui est atténuée par la masse des protéines (**Benallegue., Debbeche. (2015)**).

1.6. Microbiologie de lait cru

Le lait sortant du pis est pratiquement stérile. Une fois que le lait sort du pis, passe par la trayeuse et le réservoir, il se contamine par la microflore naturelle de l'animal et la microflore de l'environnement immédiat de la ferme. Les bactéries mésophiles, les bactéries psychrophiles, les coliformes et les staphylocoques, de même que les virus (bacteriophages), les levures et les

moisissures en sont les représentants majeurs (**Lamontagne et al., 2002**). Lorsque la pasteurisation est utilisée, une grande proportion des microorganismes est éliminée, mais une partie de la microflore n'en demeure pas moins présente.

On répartit les microorganismes du lait, selon leur importance, en deux grandes classes : La flore indigène ou originelle et la flore contaminant. Cette dernière est subdivisée en deux sous classe : la flore d'altération et la flore pathogène (**Vignola, 2002**).

A côté de cette flore pathogène et d'altération, nous avons dans le lait la flore d'intérêt technologique ou utile représentée essentiellement par les bactéries lactiques, les levures et les moisissures.

1.6.1. La flore originale

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions, à partir de la mamelle d'un animal sain (moins de 10^3 germes /ml). Il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques, lactobacilles.

La flore naturelle du lait cru est un facteur essentielle particulièrement à ces propriétés organoleptiques (**Fotou et al., 2011**).

Le Lait cru est protégé contre les bactéries par des substances inhibitrices appelées« lacténines» mais leur action est de très courte durée environ 1 heure (**Guiraud, 2003**)

Des germes pathogènes (Staphylocoques) et dangereux du point de vue sanitaire peuvent être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade. Ainsi, hormis les maladies de la mamelle, l'ensemencement du lait se fait pour l'essentiel au cours des diverses manipulations dont il est l'objet à partir de la traite (**Guiraud, 2003**).

1.6.2. La flore de contamination

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui est capable de causer des défauts sensoriels ou de réduire la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les consommateurs de lait (**Vignola, 2002**).

La flore d'altération peut causer des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture du lait entraînant la réduction de sa durée de vie. Parfois, certains microorganismes nuisibles du lait peuvent aussi être pathogènes. (**Guiraud, 2003**).

Les germes pathogènes auxquels on accorde une importance particulière, en raison de la gravité ou de la fréquence des risques qu'ils présentent sont cités ci-dessous :

- Les principales bactériennes infectieuses sont *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* et *Campylobacter sp*.

- Les principales bactéries toxigènes sont *Staphylococcus sp* *Clostridium botulinum* (Vignola, 2002).

Le lait se contamine par des microorganismes d'origines diverses :

Fèces et téguments de l'animal : *Coliformes*, *Clostridies*, et éventuellement des *Enterobactéries* pathogènes (*Salmonella*).

Sol : *Streptomyces*, bactéries sporulées, spores fongiques, *Listeria*.

Litière et aliments : flore banale variée, en particuliers, *Lactobacilles*, *Clostridium butyrique* (Ensilages).

Air et eau : flore diverse dont *Pseudomonas*, bactérie sporulées, etc.

Équipements de traite et de stockage du lait : flore lactique, microcoque, *Lactobacilles*, *Streptocoques*, *Leuconostoc*, levure, cette flore sera souvent spécifique d'une usine à une autre.

Manipulateurs : *Staphylocoques* dans le cas de traite manuelle.

Vecteurs divers : Insectes en particulier, flore de contamination fécale (Guiraud, 1998).

Chapitre 02

I. La flore pathogène de lait

Le lait et les produits laitiers peuvent contenir des germes pathogènes pour l'homme. C'est une flore dont la persistance et/ ou le développement dans le lait et les produits laitiers constituent un risque pour la santé du consommateur. Le risque pour la santé humaine provient de la conjonction de trois facteurs: le pouvoir pathogène de la bactérie, la concentration de toxine ingérée (liée au nombre de bactéries présentes) et la résistance de l'individu (liée à l'efficacité du système immunitaire). Les seuils de contamination à risques sont beaucoup plus faibles que pour une contamination ayant pour origine une flore commune.

L'animal, l'environnement, l'homme et le matériel mal nettoyé sont à l'origine de ces contaminations. Parmi les microorganismes pathogènes que l'on trouve dans le lait, on peut citer les Staphylocoques, les Entérobactéries, les germes zoonotiques comme les Brucelles et le Bacille tuberculeux sans oublier certains virus comme celui de l'Hépatite A (**Lamontagne, 2002**).

Les entérobactéries susceptibles de se retrouver dans le lait sont les salmonelles, *Escherchia coli*, et *Yersinia*. Ces entérobactéries sont responsables des toxi-infections alimentaires et ont pour origine la consommation du lait et des produits laitiers qui n'ont pas subi de traitement d'assainissement par la chaleur, ou recontaminés après le traitement thermique.

Les Staphylocoques sont retrouvés fréquemment dans le lait. L'origine de la contamination est la mamelle malade mais aussi l'homme. Les Staphylocoques provoquent, par la production d'une toxine thermostable, des intoxications de gravité variable pouvant être redoutables chez l'enfant. Les produits laitiers responsables sont le plus souvent le lait cru, le lait concentré, le lait en poudre et les crèmes glacées. Une fermentation inhibe dans une certaine mesure la croissance des staphylocoques. Ainsi, au cours de l'affinage des fromages, ils disparaissent progressivement, mais le risque subsiste s'il y a eu accumulation préalable de toxines. (**Guiraud, 2003**)

II. Généralités sur le genre *Staphylococcus*

Les Staphylocoques sont parmi les bactéries pathogènes les plus importantes chez l'homme et peuvent être divisés en souches pathogènes et souches relativement non pathogènes sur base de la synthèse de coagulase. Les souches coagulase positive identifiées comme *Staphylococcus aureus* produisent souvent un pigment caroténoïde jaune, ce qui leur a valu l'appellation commune de Staphylocoques dorés, les souches non productrices de coagulase, telles que *Staphylococcus epidermidis*, sont non pigmentées et sont généralement moins invasives, mais elles sont associées de plus en plus comme bactéries pathogènes opportunistes, à des infections nosocomiales graves.

Les staphylocoques peuvent aussi se diviser en producteurs et non producteurs de mucus qui est une couche visqueuse extracellulaire permet aux bactéries d'adhérer à des surfaces lisses. Cette propriété de produire du mucus est proposée comme marqueur des souches pathogènes (**Prescott et al., 2007**).

II.1. Historique et nomenclature

Les premières descriptions des Staphylocoques (bactéries en forme de coques) isolés à partir de pus d'abcès datent de 1871 mais ce n'est que quelques années plus tard que ces travaux permettront de proposer un nom à la bactérie rencontrée. Ainsi en 1878 Robert Koch en Allemagne et Louis Pasteur en 1880 en France décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine (**Fasquelle, 1974 ; Karthik, 2007**).

En 1882, le nom "*Staphylocoque*" a été donné par le chirurgien **Ogston**, pour décrire ces grains (*kokkos*), groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (*Staphylos*) (**Eykin, 1996 ; Ogston, 1882**).

En 1884. En Allemagne **Rosenbach** donne la première description du genre *Staphylococcus* en obtenant des cultures pures de ces bactéries sur milieu solide. Il différencie ainsi *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus albus* par la coloration des pigments produits par les colonies (blanches ou dorées) (**Avril et al., 1992 ; Karthik, 2007**).

En 1885, **Zopf** a placé les Staphylocoques et les microcoques dans le genre *Micrococcus*, puis, en 1886, le genre *staphylococcus* a été séparé du genre *Micrococcus* par **Flugge**. Celui-ci différencie les deux genres principalement sur la base de leur action sur la gélatine et la relation à leurs hôtes. Les Staphylocoques liquéfiaient la gélatine et étaient pathogènes, tandis que les microcoques étaient variables dans leur action sur la gélatine et étaient saprophytes (**Götz et al., 2006**).

II.2. Habitat

Les Staphylocoques sont très répandus dans la nature et occupent une variété de niches écologiques. Parmi les membres du genre *Staphylococcus*, certaines espèces démontrent des préférences d'habitat et de niches chez leurs hôtes particuliers. Les staphylocoques sont également isolés à partir d'un large éventail de produits alimentaires comme la viande, le fromage et le lait, et à partir de sources environnementales telles que le sol, le sable, l'air et l'eau. L'habitat principal des staphylocoques est la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux à sang chaud (**Bannerman et Peacock, 2007**).

Chez l'homme, les staphylocoques en particulier les espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* font partie de la flore résidente cutanée de nombreux individus qui sont des porteurs asymptomatiques.

Ils jouent un rôle important dans l'équilibre physico-chimique de la peau et constituent une barrière de colonisation, empêchent l'implantation de bactéries de la flore transitoire (Wylie *et al.*, 2005 ; Hirsh *et al.*, 2004).

II.3. Classification

Selon la Classification de Bergey (1994) et dans la deuxième édition de Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, la classification phylogénétique du genre *Staphylococcus* est la suivante :

- **Phylum XIII** : *Firmicutes*
- **Domaine** : *Bacteria*
- **Classe**: *Bacilli*
- **Ordre** : *Bacillales*
- **Famille**: *Staphylococcaceae*
- **Genre** : *Staphylococcus* avec 38 espèces et des sous-espèces

Le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des *Firmicutes* constitué de quatre classes : *Clostridia*, *Mollicutes*, *Bacilli*, *Togobacteria*. La classe des *Bacilli* est constituée de deux ordres: *Bacillales* et *Lactobacillales*, dont chacun est divisé en quatre familles; *Staphylococcaceae* constitue la 4^{ème} famille des *Bacillales*, celle-ci comprend un seul genre: *Staphylococcus* (GC% 30-39%). Le genre *Staphylococcus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animale.

La taxonomie du genre *Staphylococcus* a subi plusieurs remaniements successifs grâce au développement du séquençage d'ARNr 16S, on distingue plus de quarante espèces de *Staphylococcus* dont 24 sous espèces comme il est indiqué dans le **Tableau III**. Un certain nombre d'entre elles sont trouvées chez l'homme, d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (viandes, produits laitiers, etc...) (Avril *et al.*, 1992 ; Quinn *et al.*, 2011).

Le groupe de *staphylococcus* à coagulase négative avec 33 espèces dont la majorité ne présente pas un risque sanitaire telle que *Staphylococcus xylosus* *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* isolés de lait ou de fromage (Morea *et al.*, 1999 ; Blaiotti *et al.*, 2004). D'autre espèces telles que *Staphylococcus epidermidis* *Staphylococcus haemolyticus* sont impliquées dans les infections nosocomiales (Freney *et al.*, 1999).

Le groupe de *Staphylococcus* à coagulase positive est constitués de 7 espèces identifiées à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus scheleiferi* (**Tableau III**). Celles-ci peuvent être impliquées dans les infections humaines (Avril *et al.*, 1992 ; Quinn *et al.*, 2011).

Tableau III : Présentation des espèces du genre *Staphylococcus* (Krieg et Holt, 1984).

Espèces	Présence en produits alimentaires	Risque ou intérêt
<i>Staphylococcus</i> a coagulase positive		
<i>S. aureus</i> subsp. anaerobius		Pathogène
<i>S. aureus</i> subsp .aureus	Lait, fromage, viande	Pathogène
<i>S. delphini</i>	Lait	Pathogène
<i>S. hyicus</i> subsp.chromogenes	Lait	Pathogène
<i>S. hyicus</i> subsp .hyicus	Lait	Pathogène
<i>S. intermedius</i>	Lait, fromage, viande	Pathogène
<i>S. lutrae</i>		
<i>S. pseudintermedius</i>		
<i>S. schleiferi</i> subsp.coagulons	Lait	Pathogène
<i>S. schleiferi</i> subsp. schleiferi	Lait	Pathogène
<i>Staphylococcus</i> coagulase négative		
<i>S. arlettae</i>	Lait	Pathogène
<i>S. auricularis</i>	Lait, fromage, viande	
<i>S. capitis</i> subsp. capitis	Lait, viande	
<i>S. capitis</i> subsp.urealyticus	Lait	
<i>S. caprae</i>	Lait, viande	Ferment
<i>S. carnosus</i> subsp. carnosus	Saucisson, Mozzarella	
<i>S. carnosus</i> subsp utilis	Lait	
<i>S. caseolyticus</i>	Lait, Fromage, Saucisson	
<i>S. chromogenes</i>		
<i>S. cohnii</i> subsp. Cohnii	Lait, fromage	Ferment
<i>S. cohnii</i> subsp. urealyticus		
<i>S. conclimenti</i>		
<i>S. epidermidis</i>		
<i>S. equorum</i> subsp equorum	Lait, Fromage, Saucisson	
<i>S. equorum</i> subsp linens	Lait, Fromage, Saucisson	
<i>S. felis</i>	Lait, Fromage	
<i>S. fleurettii</i>		
<i>S. gallinarum</i>	Lait, fromage	
<i>S. haemolyticus</i>	Fromage	
<i>S. hominis</i> subsp hominis	Lait, viande	
<i>S. hominis</i> subsp.novobiosepticus	Lait	
<i>S.kloosii</i>		
<i>S. lentus</i>		
<i>S. lugdunensis</i>	Lait, fromage	
<i>S. muscae</i>	Lait	
<i>S.nepalensis</i>		
<i>S. pasteurii</i>		
<i>S. piscifermentans</i>	Saucisson	
<i>S. pulvereri</i>	Poisson	
<i>S. saccharolyticus</i>	Saucisson	
<i>S. saprophyticus</i> subsp saphrophyticus		
<i>S. saprophyticus</i> subsp. bovis	Lait, fromage, saucisson	
<i>S. sciuri</i> subsp. sciuri	Lait	
<i>S. sciuri</i> subsp camaticus	Lait, Fromage	
<i>S. sciuri</i> subsp rodentium		
<i>S. sciuri</i> subsp lentus		
<i>S. simiae</i>	Lait	
<i>S. simulens</i>		
<i>S. succinus</i> subsp. casei	Lait	
<i>S. succinus</i> subsp. Succinus		
<i>S.vitulinus</i>	Saucisson	
<i>S.warneri</i>	Saucisson	
<i>S. xylosus</i>	Lait, saucisson	
	Lait, fromage, viande, saucisson	Ferment

II.4. Caractères phénotypiques

Les Staphylocoques sont des analogues de *Micrococcus*, il s'agit de cocci, 0,5 à 1 µm de diamètre en grappe de raisin (**Buttiaux et al., 1966**).

Ces bactéries du genre *Staphylococcus* sont Gram positif. Elles ne sont ni sporulées, ni mobiles, ni capsulées. Elles sont différenciables des autres coques à gram positif, telles que les bactéries de la famille des *Streptococcaceae*, par leur activité catalase positive. Les staphylocoques sont aéro-anaérobies facultatifs. Ces bactéries sont commensales de la peau et des muqueuses de l'animal et de l'homme (**Gyles et al., 2010**).

II.5. Caractères cultureux

Les staphylocoques se multiplient très bien en 24 heures sur la plupart des milieux usuels : température optimale de croissance est 37°C (culture entre 12 et 46°C), pH optimal est 7,2- 7,4. Ils se développent facilement, en aérobiose ou en anaérobiose.

Des milieux sélectifs, hypersalés ou contenant du tellurite de potassium, facilitent leur isolement à partir des prélèvements plurimicrobiens.

Tableau IV : Différents caractères bactériologiques de *Staphylococcus* (**Prescott et al., 2007**).

Morphologie	Regroupé en paire, tétrade ou amas réguliers, immobile, non sporulé
Dimension (µm)	0.5 – 1.5
Type respiratoire	Aéro anaérobie facultatif
Type trophique	Chimioorganotrophe
Métabolisme	Fermentaire et / ou respiratoire
Autre caractère	Catalase positive – oxydase négative Halophile – mésophile (37°C) psychrophile (6-12°C) Neutrophile PH = 07

II.6. Pathogénicité et virulence

La pathogénicité des bactéries du genre *Staphylococcus* s'explique par la présence de nombreux facteurs de virulence à leur surface et qui facilitent la colonisation de l'organisme. De plus, les bactéries produisent des enzymes et des toxines qui permettent la colonisation des tissus. Les staphylocoques à coagulase négative expriment globalement moins de facteurs de pathogénicité par rapport aux staphylocoques à coagulase positive. De plus, parmi les staphylocoques à coagulase positive, *Staphylococcus aureus* est le plus pathogène et est celui dont les facteurs de virulence sont les plus connus. Parmi les toxines produites par les staphylocoques, on retrouve les hémolysines α et β qui ont une action cytotoxique. On distingue également des entérotoxines qui sont responsables de toxi-infections d'origine alimentaire chez l'homme. Il en existe plus d'une vingtaine et elles expliquent les mesures de contrôle mises en place dans les processus de fabrication de fromages des petits ruminants (**De Matos, 2013**).

II.7. Les toxi-infection alimentaire staphylococcique

La toxi-infection alimentaire d'origine staphylococcique, appelée également « maladie des banquets », se caractérise par un temps d'incubation très court. Les symptômes apparaissent en moyenne deux à trois heures après l'ingestion de l'aliment contaminé (**Chaubeau et al., 1992**)

La symptomatologie est la suivante : nausées, vertiges, céphalées suivis rapidement par des vomissements incoercibles. Si des aliments ont le temps de progresser jusque dans l'intestin grêle, une diarrhée hydrique accompagnée de douleurs intenses est associée aux vomissements. Après une réhydratation par voie orale, la récupération est bonne et rapide (environ 24 heures). Une hospitalisation peut être nécessaire si des enfants ou des personnes âgées, plus sensibles à une déshydratation, sont touchés. La mortalité est exceptionnelle.

D'un point de vue pathogénique, même si les modalités d'absorption intestinale restent peu connues, le mode d'action des entérotoxines est bien compris. Les entérotoxines possèdent deux zones fonctionnelles distinctes.

Une zone est responsable d'une action neurotoxique. Elle entraîne une stimulation des terminaisons du nerf vague présentes au niveau du tube digestif et est responsable de l'effet émétique.

L'autre zone est responsable d'une action immunotoxique. Les toxines jouent le rôle de superantigènes et sont à l'origine d'une cascade de réponses immunitaires.

Contrairement à la réponse immunitaire classique et hautement spécifique, les entérotoxines, en temps que superantigènes, peuvent interagir de façon non spécifique avec un grand nombre de lymphocytes T. L'activation des cellules suppose simplement une reconnaissance des superantigènes par la chaîne beta des T Cell Receptor (TCR) présents sur la membrane des lymphocytes T et les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes notamment les macrophages. Il s'en suit une libération excessive de cytokines (IL 2, TNF) à l'origine des nausées et des vomissements. Bien que séparées sur la protéine, ces zones semblent fonctionner en corrélation. Une perte de l'activité superantigène, par exemple lors de mutation génétique, est responsable d'une perte de l'activité entérotoxique (**Balaban et al., 2000 ; Popoff, 1996**).

III. L'espèce *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est le micro-organisme pathogène le plus souvent incriminé dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) par le lait et les produits laitiers. *Staphylococcus aureus* est la première cause de pneumopathies nosocomiales et d'infections post-opératoires et la deuxième cause de bactériémies nosocomiales (**Emori, Gaynes, 1993**).

L'intoxication résulte de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) produites dans les aliments par des souches de *Staphylococcus aureus* productrices de SE (**Derzelle et al., 2009**). Elle déclenche des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales et maux de tête voire des conséquences plus graves chez les jeunes enfants, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées. La contamination du lait cru à la production est due à la flore présente dans la mamelle en cas d'infection, de la flore de contamination apportée par le milieu extérieur au cours des différentes manipulations (**Brouillette et al., 2004 ; Von Eiff et al., 2006**). Si le lait cru reste la principale source de contamination des produits laitiers en staphylocoques, il faut préciser que la pasteurisation détruit facilement ces bactéries mais pas l'entérotoxine produite dans le lait. (**Kouame-sina, 2013**).

III.1. Caractères morphologiques

A l'examen microscopique, les *Staphylococcus aureus* se présente sous l'aspect de cocci sphériques de 1µm de diamètre, à coloration de Gram positif, immobiles, non sporulés. La grande majorité des souches sont capsulées *in vivo* mais perdent progressivement leur capsule en culture, d'autres forment des colonies mucoïdes et sont entourées d'une pseudocapsule (**Fauchere et Avril, 2002 ; Guiraud et Rosec, 2004**).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**). Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) (**Le Loire et al., 2003**).

III.2. Caractères biochimiques

Toutes les souches de *Staphylococcus aureus* ont un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif, produisent une coagulase, une nucléase thermostable et une catalase mais pas d'oxydase (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**). Les *Staphylococcus aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, VP +, MR +, réduisant le tellurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine.

La plupart des souches sont lipolytiques produisant une zone opaque lorsqu'elles sont cultivées dans des milieux contenant le jaune d'œuf (**Ananthanarayan et Paniker, 2006**). La paroi cellulaire des staphylocoques est résistante au lysozyme et sensible au lysostaphine, qui clive spécifiquement les ponts pentaglycine de *Staphylococcus* spp (**Le Loire et al., 2003**).

Globalement, l'espèce *S. aureus* peut être différenciée des autres staphylocoques par la présence simultanée d'une coagulase libre et d'une DNase thermostable (**Fauchere et Avril, 2002 ; Couture, 1990**).

III.3. Facteurs de virulence

Les *Staphylococcus aureus* ont la capacité d'infecter un humain ou un animal d'une multitude de façon. Un des gènes importants dans la régulation de la virulence est le gène accessoire (*agr*) qui est un régulateur global des virulons, incluant des facteurs sécrétés comme des hémolysines et des facteurs de surface comme des coagulase et protéines de liaison (Novick, 2008).

La diversité dans le pouvoir pathogène des *Staphylococcus aureus* provient du fait qu'ils peuvent avoir plusieurs facteurs de virulence

Les cellules de *Staphylococcus aureus* expriment à leur surface des protéines qui favorisent l'attachement à l'hôte fonctionnant comme des adhésines qui sont ancrées dans le peptidoglycane. Ces adhésines peuvent jouer un rôle dans la colonisation de l'hôte et au cours de la maladie invasive (Stephen *et al.*, 2006).

Tableau V: Facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* (Cheung, 2001).

Facteurs	Gènes	Fonctions
Clumping factor A	<i>clfA</i>	Adhésion au fibrinogène
Clumping factor B	<i>clfB</i>	Adhésion au fibrinogène
Protéine Fib A	<i>fibA</i>	Liaison au fibrinogène
Fibronéctine liée à la protéine A	<i>fnbA</i>	Attachement à la fibronéctine
Fibronéctine liée à la protéine B	<i>fnbB</i>	Attachement à la fibronéctine
Collagène lié à la protéine	<i>Cna</i>	Adhésion au collagène
Elastine liée à la protéine	<i>Ebps</i>	Liaison à l'élastine
Protéine analogue MHC	<i>map</i> ou <i>eap</i>	Liaison à la protéine de la extracellulaire
Andésine intracellulaire polysaccharidique	<i>Pia</i>	Adhésion intracellulaire et formation de biofilm
Protéine A	<i>Psa</i>	Invasion possible de défenses l'hôte
Polysaccharides capsulaires (type 1, 5 et 8)	<i>Cap</i>	Molécule anti phagocytose

III.4. Exo protéines enzymatiques et toxiques

Toutes les souches de *Staphylococcus aureus* produisent des protéines excrétées dans le milieu extracellulaire et sont douées soit d'une activité enzymatique, soit d'une activité toxique; mais la distinction entre ces deux formes d'activité biologique est souvent difficile (Möllby ; Wadström, 1983).

III.4.1. Toxine

Les staphylolysines ont un effet cytotoxique mis en évidence sur les hématies (Fauchere, 2002). La leucocidine est cytotoxique, agissant sur les polynucléaires et les macrophages chez lesquels elle provoque la perte de mobilité, la dégranulation, la destruction nucléaire et la lyse cellulaire (Figarella, 2004).

La toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique ou TSST-1 est un super-antigène retrouvé chez plus de 90% des souches responsable de ce syndrome (Fauchere, 2002).

Tableau VI : Toxines impliquées dans la virulence de *S. aureus* (Vincenot *et al.*, 2008)

Famille	Principales toxines	Mécanismes d'actions ou syndromes toxiques spécifiques
Toxine superantigénique	Toxines de choc toxiques staphylococcique Entérotoxine A à E, G, I à U	Choc toxique staphylococcique par activation de système immunitaire et libération de cytokines de l'inflammation Reaction autoimmune (maladie de KAWASAKI, dermatite atopique, psoriasis, arthrites rhumatismales) Intoxication alimentaire
Toxines formants des pores	Toxine à hélice alpha Alpha-hémolysine Gamma-hémolysine Leucocidine de panton valentine	Destruction des cellules de défense de l'hôte par formation de pore au niveau des membranes cellulaires
Toxines à activité protéolytique	Exfoliatines	Syndrome d'exfoliation généralisé (ou syndrome staphylococcique de la peau ébouillantée) Impétigo bulleux staphylococcique

III.4.2. Enzymes

Staphylococcus aureus possède de nombreuses enzymes impliquées dans sa virulence, ayant une activité protéase, hyaluronidase, collagénase, lipase, ou nucléase. Ces exoprotéines sont impliquées dans la destruction des tissus de l'hôte et dans l'extraction de nutriments (Dinges *et al.*, 2000).

De nombreuses autres enzymes sont produites : désoxyribonucléase (Dnase) dont le rôle demeure ambiguë dans le processus d'agression (CEAE, 2012), fibrinolysine, hyaluronidase, gélatinase, lipase. Ces enzymes favorisent l'extension de l'infection dans les tissus. Par exemple, la fibrinolysine active le plasminogène en plasmine, ce qui entraîne la dislocation des embolus septiques et la survenue de localisation secondaires (Fauchere, 2002). (Buttiaux *et al.*, 1966)

Tableau VII: Enzymes de virulence de *Staphylococcus aureus* (Cheung, 2001)

Enzyme	Gènes	Fonctions
Coagulase	<i>Coa</i>	Liaison au fibrinogène
Lipase	<i>Geh</i>	Invasion des défenses de l'hôte
Protease V8	<i>sas P</i> ou <i>ssp</i>	Invasion des tissus et modification des protéines de Surface
Staphylokinase	<i>Sak</i>	Invasion des défenses de l'hôte
Phospholipase C	<i>Plc</i>	Lyse cellulaire
Elastase	<i>SepA</i>	Invasion des tissus
Hyaluronidase	<i>HysA</i>	Invasion des tissus

IV. Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*

La résistance bactérienne aux antibiotiques ou antibiorésistance est un phénomène de portée universelle, il n'a cessé d'augmenter de manière progressive au cours de ces dernières années. Ce problème de santé publique touche à la fois la santé animale et la santé humaine (Faye, 2005). La diffusion d'un grand nombre de bactéries pathogènes résistantes à plusieurs antimicrobiens a été reconnue par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme un problème sérieux en raison de la fréquence avec laquelle de nouveaux phénotypes de résistance apparaissent parmi les agents pathogènes et même chez les microorganismes commensaux (OIE, 2008).

L'histoire des résistances bactériennes commence avec l'utilisation des sulfamides dans les années 30. Les streptocoques résistants émergèrent et compliquèrent le traitement. Plus tard, dans la première année d'utilisation de la pénicilline, la résistance de certaines souches bactériennes apparaît, détruisant la molécule par une pénicillinase. D'abord découverte chez *Escherichia coli* (Sanders, 1999), une enzyme ayant les mêmes propriétés était retrouvée peu après dans d'autres espèces, notamment chez les Staphylocoques à coagulase positive. L'augmentation des Staphylocoques résistants à la pénicilline s'accrut dramatiquement en quatre ans : 14 % en 1944 et 59 % en 1948.

Le mécanisme de résistance à la pénicilline repose sur la synthèse par la bactérie d'une enzyme appelée β -lactamase ou pénicillinase. Cette enzyme plasmidique inductible hydrolyse le cycle β -lactame des pénicillines A et G et les rend inactives (Korta et Mobashery, 1998).

Aujourd'hui presque toutes les souches de *Staphylococcus aureus* sont résistantes aux pénicillines naturelles, celle-ci implique aussi une résistance à l'ampicilline, l'amoxicilline, la ticracilline, la pipéracilline et à l'aminopénicilline (Rice, 2006).

La méticilline, l'oxacilline et d'autres pénicillines résistants à l'action de la pénicillase sont introduites dès les débuts des années 1960 pour le traitement des infections causées par les *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline. Cependant, au fil du temps des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (**SARM**) commencent à apparaître et à se répandre au sein du milieu hospitalier et plus récemment au sein de la communauté (**Pesavento et al., 2007**). La résistance à la méticilline est croisée vis-à-vis des autres bêta-lactamines, ce qui implique que les souches méticillino-résistant doivent toujours être considérées comme résistantes à toutes les β lactamines y compris aux céphalosporines de 3^{ème} génération (**Katayama et Hiramatsu, 2000**).

Matériel et

Méthodes

I. Caractéristiques générales du site d'étude

Le site choisi pour cette étude est une petite ferme aux alentours de la ville de Khenchela. Son propriétaire élève quelques vaches en plus de petites parcelles de terrains cultivés avec différentes cultures agricoles.



Photographie 01 : Les vaches traitées et parcelles de terrain de notre site d'étude

II. Procédure d'échantillonnage

Les échantillons à analyser sont du lait de vache cru entier obtenu après une traite manuelle des quatre vaches femelles présentes au niveau de notre site d'étude. La collecte a eu lieu à la fin de mois de Mars 2017 à 8h du matin.

Le lait a été prélevé dans des flacons en verre lavés puis rincés, ensuite, séchés à l'abri de l'air et enfin stérilisés par la chaleur au four Pasteur à 180 °C pendant 30 min. Avant la traite manuelle, on a désinfecté les trayons avec de l'alcool dilué afin d'éviter la contamination de la mamelle par les nombreux microorganismes présents sur le pis et des trayons de la vache. L'échantillon est transporté à température ambiante à l'obscurité jusqu'au laboratoire.

Les analyses microbiologiques ont été réalisées après conservation de 4 jours dans le réfrigérateur.

III. Les paramètres microbiologiques

Ce travail a été réalisé au sein des laboratoires pédagogiques de Biologie de l'Université Abbés Laghrou Khenchela. Il a consisté :

- à effectuer une recherche des Staphylocoques sur des milieux sélectifs appropriés (Giolliti Contonii, Chapman, Biard Parker) au moyen des méthodes normalisées actuellement en vigueur. Les méthodes d'analyse se basent sur des procédures normalisées : Les milieux de culture et réactifs proviennent de l'Institut Pasteur d'Algérie.
- à prélever les différentes colonies caractéristiques et procéder à leur purification ceci à partir de repiquage sur les cultures de l'étape précédente.

- à identifier les souches correspondantes, au moyen de tests complémentaires et biochimiques spécifiques, (galerie API).

- à évaluer la résistance de ces souches vis à vis de différents antibiotiques utilisés en thérapeutique clinique.

III.1. Matériel et réactifs utilisés

III.1.1. Appareillages

- Etuve de 37°C
- Bec bensen
- Bain marie
- Agitateur vortex
- Réfrigérateur pour conservation d'échantillon
- Autoclave
- Microscope optique

III.1.2. Verreries

- Pipettes pasteur
- Boîtes pétrie
- Pipettes graduée
- Tubes à essai
- Verre de montre
- Flacons
- Lames

III.1.3. Milieux de culture

- Gélose Chapman.
- Gélose nutritive
- Gélose Baird Parker
- Mueller Hinton
- Milieu Giolliti Contonii (GC)
- Bouillon nutritif (BN)

III.1.4. Outils des tests biochimiques

- Eau oxygénée
- Eau physiologie
- Galeries API20 STAPH
- Disques des antibiotiques pour Staphylocoques
- Ecouvillons

III.2. Réalisation des dilutions en série

Les dilutions sont nécessaires car on doit prélever de très faibles volumes à cause de la charge bactérienne souvent très élevée, et permettent d'obtenir seulement les microorganismes dominants dans les dilutions les plus élevées. On dilue successivement l'échantillon de lait à analyser à l'aide de l'eau physiologique.

Toutes les manipulations ont été effectuées avec un maximum de précision et d'une manière aseptique selon la norme **NF EN ISO 6887-1** relative à la suspension mère et dilutions décimales; règles générales. Et la norme **NF V08-057-2** microbiologie alimentaire directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique. (**JORA, 1993**)

- On a d'abord bien homogénéisé l'échantillon en agitant vigoureusement le flacon afin de permettre une répartition homogène des microorganismes. Le lait étant un produit liquide il sera considéré comme une solution mère égale à 1.
- A partir de la solution mère, 1 ml est introduit stérilement dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. On obtient ainsi une dilution au 1/10, le tube est ensuite agité manuellement,
- Puis on prélève 1 ml de la dilution 1/10 et on l'introduit dans un deuxième tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, on obtient ainsi une dilution 1/100.
- Puis on prélève 1 ml de la dilution 1/100 et on l'introduit dans un troisième tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile, on obtient ainsi une dilution 1/1000.
- Une homogénéisation par au moins 10 secondes d'agitation est nécessaire avant chaque dilution.

III.3. Méthode d'enrichissement au milieu de Giolliti Cantonii

III.3.1. Préparation du milieu d'enrichissement

Au moment de l'emploi, on ouvre aseptiquement le flacon contenant le milieu de Giolliti Cantonii pour préparer les 5 tubes de milieu d'enrichissement pour la solution mère et les 4 dilutions avec étiquetage, à l'aide d'une pipette graduée, on met 15 ml de Giolliti Cantonii avec 0.1 ml d'une solution de Tétrurite de Potassium dans chaque tube. Mélanger soigneusement. Le milieu est alors prêt à l'emploi. (Lebres, 2005)

III.3.2. L'ensemencement

A partir de la solution mère et des dilutions décimales retenues, on a porté aseptiquement 1 ml dans le tube contenant le milieu d'enrichissement comme l'indique la **figure 03**. Bien mélanger le milieu et l'inoculum. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Dans la lecture, les tubes qui seront présumés positifs sont les tubes virés au noir. Pour s'assurer qu'il s'agit bien d'un développement de Staphylocoques, ces tubes feront l'objet d'une confirmation par isolement sur des milieux sélectifs solides. (Lebres, 2005)

III.3.3. Tests de confirmation

Faire fondre un flacon de gélose Chapman et un autre du milieu Baird Parker dans le bain marie à 100°C bouillant, puis couler les milieux dans les boîtes de pétri dans la zone stérile du bec bunsen, 5 boîtes avec le Chapman et 5 boîtes avec le Baird Parker. Laisser solidifier les boîtes sur paille.

A partir des tubes positifs sur le milieu d'enrichissement de Giolliti Cantonii, porter aseptiquement 0.1 ml de chaque tube et l'étaler sur toute la surface de milieu à l'aide d'un râteau,

comme l'indique la **figure 03**. Les boîtes sont ensuite incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures. (Lebres, 2005)

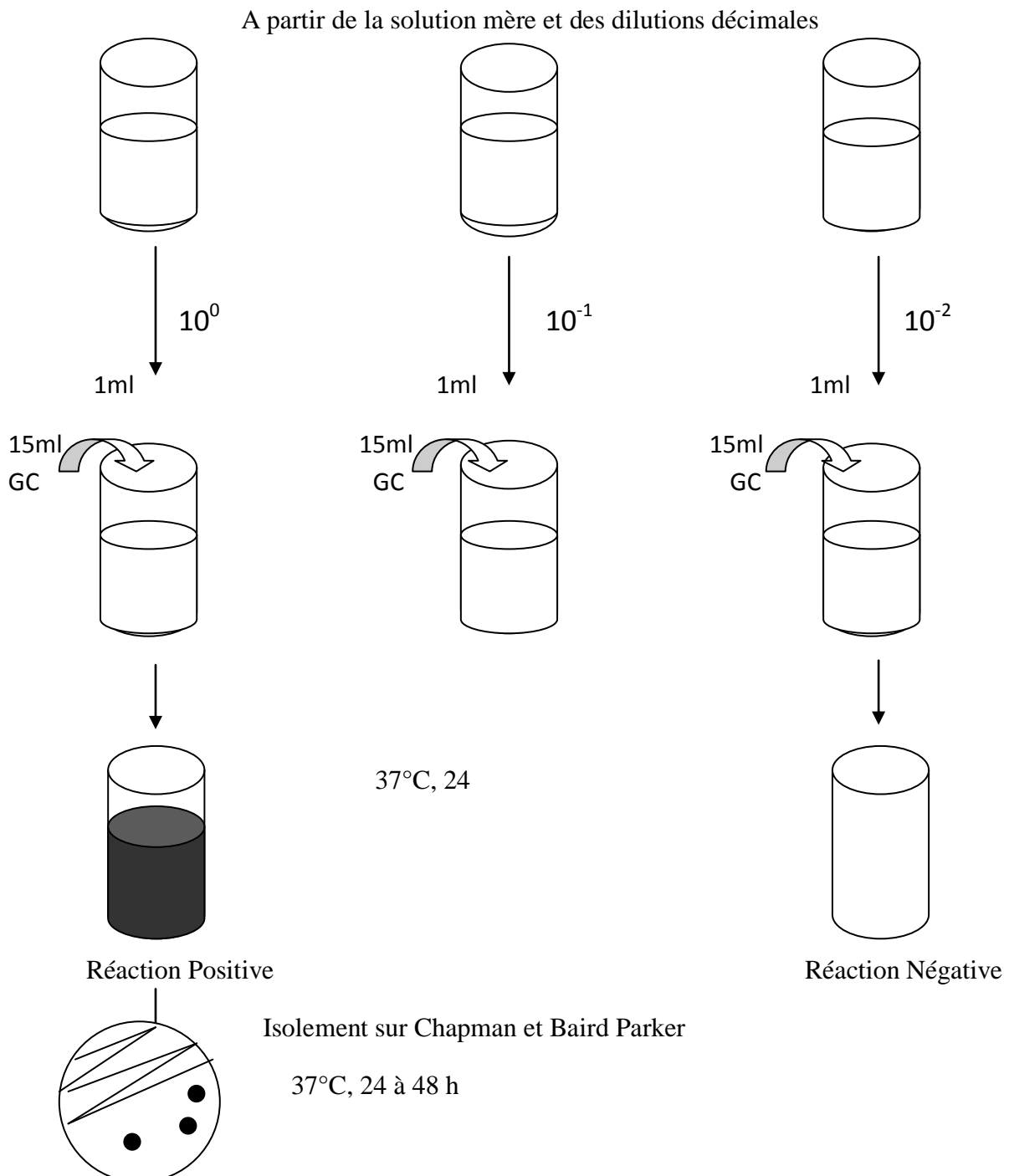


Figure 03 : Protocole d'enrichissement au milieu Giolliti Contoni

III.3.4. Expression des résultats

Sur milieu Chapman les Staphylocoques pathogènes formeront de petites colonies luxuriantes, pigmentées, entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du mannitol. Les staphylocoques non pathogènes forment en général de petites colonies blanches qui ne modifient pas la teinte du milieu.

Sur milieu Baird Parker les Staphylocoques seront considérées comme positives quand les colonies seront noires, brillantes, convexes entourées d'une zone de transparente qui peut être translucide.

Vingt cinq (25) colonies caractéristiques isolées sur Chapman et Baird Parker été ont reprises de manière aléatoire et ont fait l'objet d'un test de purification par repiquages successifs sur gélose nutritive. Les colonies caractéristiques pures feront l'objet de trois tests complémentaires à savoir : une coloration de GRAM, une recherche de l'enzyme catalase et une d'une coagulase

III.3.5. Tests complémentaires

III.3.5.1. Test catalase

On dépose sur une lame propre et sèche **une goutte d'eau oxygénée H_2O_2** (peroxyde d'hydrogène), à l'aide d'une pipette Pasteur on prélève une colonie et on la dissocie dans la goutte d'eau oxygénée.

Si la bactérie possède la catalase, elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles. (Anonyme, 2006) La réaction se fait selon l'équation :

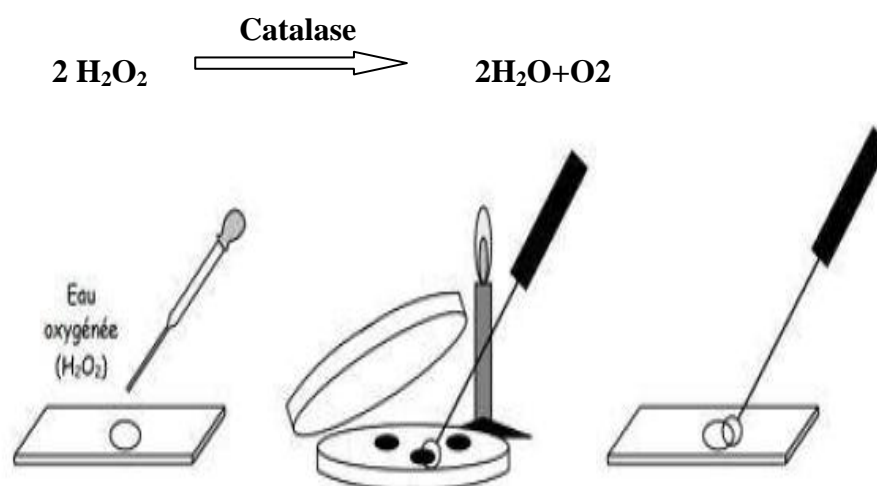


Figure 10 : Test de Catalase

III.3.5.2. Test coagulase libre

La coagulase libre est présente chez *Staphylococcus aureus*, mais aussi peut être produite par *Staphylococcus intermedius* ou *Staphylococcus hyicus*. Ce test consiste à mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur.

La détection de cette coagulase s'effectue en ajoutant dans un tube à hémolyse 0.5 ml de plasma humain et 0.5 ml d'une culture de staphylocoques de 24 h en bouillon. Le mélange est placé à l'étuve à 37°C et est incubé pendant 24 heures. Les souches de *Staphylococcus aureus*

provoquant la coagulation du plasma le plus souvent les trois premières heures, Un test positif se traduit par la formation d'un coagulum. (Karam, 2004).

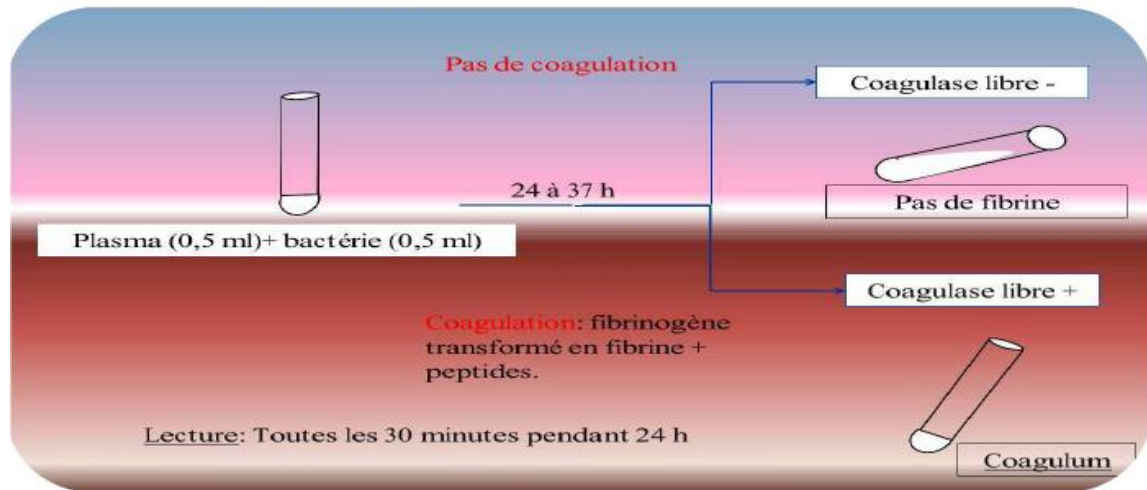


Figure 11 : Principe du test Coagulase

III.3.5.3. La coloration de Gram

La coloration de Gram est un procédé qui permet de diviser les bactéries en deux groupes distincts : les bactéries à coloration de Gram positif et les bactéries à coloration de Gram négatif. Cette coloration permet en plus de préciser la morphologie et le mode de regroupement des cellules. Les bactéries Gram négatif apparaissent colorées en rose tandis que les bactéries Gram positif sont colorées en violet. (Prescott *et al.*, 2003).

Après le séchage, on ajoute l'huile de cèdre sur les lames qui seront examinées sous microscope optique à l'aide de l'objectif (x100). Des microphotographies sont réalisées à l'aide d'un microscope doté d'un appareil photographique numérique.



Photographie 03 : Un microscope équipé d'un appareil photographique numérique

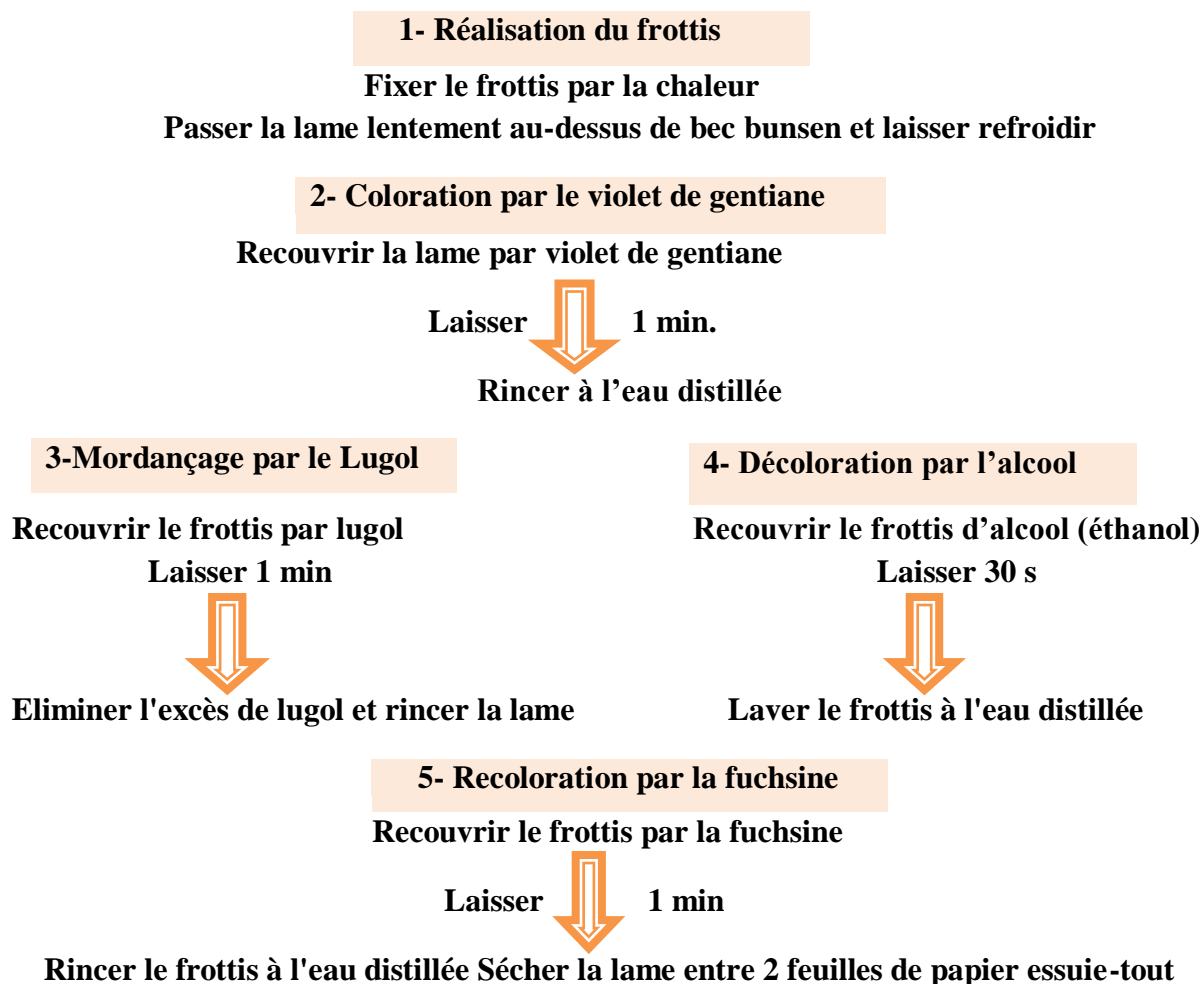


Figure 04 : Les différentes étapes de coloration de Gram

III.3.6. L'identification biochimique (système API)

L'identification a été réalisée par les galeries d'identification biochimiques. Le système API Bio Mérieux est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Une galerie API (Appareil et Procédés d'Identification) est un ensemble de petits puits et cupules prêts à l'emploi permettant l'identification de micro-organismes par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques.

La galerie API 20 Staph est destinée à l'identification des différentes espèces des Staphylocoques, elle se présente sous la forme d'une bandelette comportant 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés (urée, L-arginine, nitrate de potassium, ksylitol, etc.). Au-dessous de chaque tube, un sigle indique la nature du test. **(Biomérieux, 2009)**

Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne pure effectuée en eau physiologique. Les différents tests réalisés sont :

- Réduction de Nitrate en Nitrite
- Phosphatase Alcaline

- Production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)
- Production d'acétyl méthyl-Glucopyranoside
- Arginine Dihydrolase
- Uréase
- Acidification de Glucose, Fructose, Mannose E, Maltose, Lactose, D- Trehalose, D- Mannitol, Xylitol, D- Melibiose, Rafinose, Xylose, Saccharose, Méthyl- α D-Glucopyranoside, N-Acétyl-Glucosamine.

L'ensemencement de la galerie se déroule selon les étapes suivantes :

- **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et remplir avec l'eau physiologie les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte parce qu'on la écrit sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.
- Sortir de la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

A partir des souches bactériennes purifiées, on prépare 25 suspensions bactériennes pures dans des tubes stériles contenant 9 ml d'eau physiologique. La suspension est homogénéisée puis étuvée pendant 30 min à 37°C.

- **Inoculation de la galerie**

Pour les tests : ADH et URE on remplit les tubes avec la suspension bactérienne en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement et remplit les cupules avec l'huile de paraffine pour créer une anaérobiose.

Pour les autres tests on remplit uniquement les tubes et non les cupules. Une incubation de 18 à 24h à 37°C est nécessaire pour pouvoir observer les réactions entre bactéries et substrats.

La lecture des résultats se fait soit de manière directe, lorsque la réaction enzyme bactérienne-substrat est révélée par un changement de couleur du milieu du puits (en raison d'un changement de pH), soit de manière indirecte, auquel cas il faut rajouter certains révélateurs dans les puits concernés. (**Biomérieux, 2009**)

La lecture de ces réactions est réalisée à l'aide du tableau de lecture (**Annexe 03**) et l'identification obtenue à l'aide du Logiciel d'identification **API Excel** (**Annexe 04**).



Photographie 04 : La galerie API 20 STAPH inoculée avant l'incubation

III.3.7. L'étude de l'antibiorésistance

Après purification et identification des colonies reprises précédemment, le profil de résistance aux antibiotiques pour chaque espèce est déterminé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton.

III.3.7.1. L'antibiogramme standard (méthodes des disques)

C'est le test destiné à montrer la sensibilité d'une souche bactérienne à divers antibiotiques, la souche est déclarée sensible, intermédiaire ou résistante. En vue de sélectionner l'antibiotique le plus efficace pour lutter contre ce germe. (Boukhemis., Boutersa. 2015).

- **Principe**

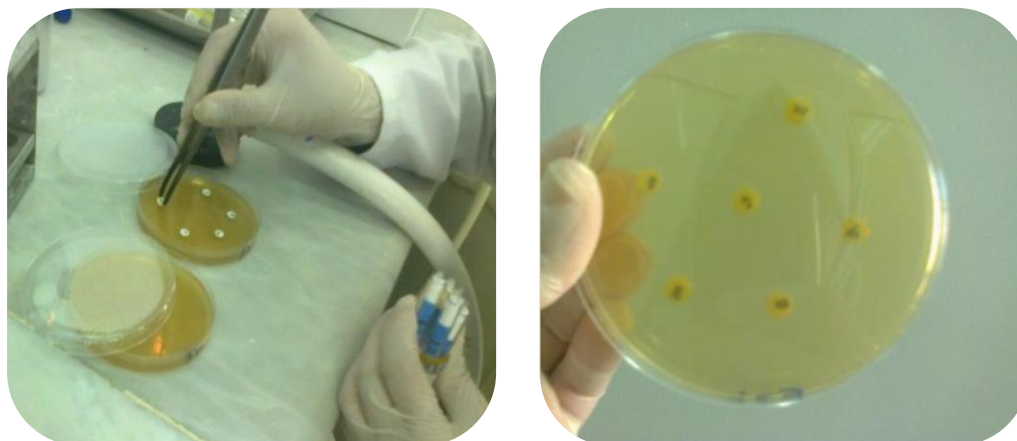
L'Antibiogramme standard consiste à disposer des disques de papier buvard imprégnés de concentration déterminée d'antibiotiques à la surface d'un milieu gélose. Dès l'application des disques, l'antibiotique diffuse à partir du disque de manière uniforme dans la gélose. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. (Soude, 2005).

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques. Les antibiotiques testés sont représentés dans le **Tableau VII**. Le mode opératoire est pratiqué selon la standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS

- **Mode opératoire**

- **Milieu** : La gélose Mueller-Hinton fondue au bain-marie a été coulée en boîte Pétri en respectant une épaisseur d'environ 4 mm.
- **Inoculum** : On prépare la suspension à partir d'une souche bactérienne de 18 heures. On prélève des colonies de la bactérie étudié à l'aide d'un écouvillon ou d'une anse de platine qu'on introduit dans un tube contenant 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile.
- **Ensemencement** : à l'aide d'un écouvillon trempé dans la suspension, on ensemence par stries serrées toute la surface du milieu en 3 reprises en changeant d'angle à chaque fois (30°), enfin on écouvillonne partout autour du bord de la surface de la gélose.

- **Application des disques d'antibiotiques** : on a déposé les disques à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Il y a des précautions à respecter lors de l'application, les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé et finalement presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de la pince pour s'assurer de son application. Les disques d'antibiotiques utilisés sont résumés dans le **Tableau VII**.



Photographie 05: Application des disques d'antibiotique.

- **Incubation** : les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas.
- **Lecture** : on mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibitions et on compare les résultats obtenus aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture (**Annexe 5**). On classe la bactérie dans l'une des catégories : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R).

Tableau VII : Liste des antibiotiques testés, charge et classification des disques.

Antibiotiques	Abréviation	Charge du disque	Classe
Pénicilline	P	10 µg	β Lactamines
Oxacilline	OX	1 µg	β Lactamines
Erytromycine	E	15 µg	Macrolides large spectre
Clindamycine	DA	2 µg	Macrolides large spectre
Pristinamycine	PT	15 µg	Macrolides large spectre
Vancomycine	VA	5 µg	Glycopeptides
Kanamycine	KMN	30 µg	Aminosides
Amikacine	AK	30 µg	Aminosides
Gentamycine	CN	10 µg	Aminosides
Ofloxacine	OFX	5 µg	Fluoroquinolones
Lévofloxacine	LVX	5 µg	Fluoroquinolones
Cotrimoxazol	SXT	1.25 µg	Sulfamides/diaminopyridine
Rifampicine	RD	5 µg	Rifamycine

Résultats et

Discussions

I. Isolement et identification des *Staphylococcus spp*

I.1. Résultats d'enrichissement sur milieu Giolliti Contonii

Le bouillon de Giolliti-Cantoni milieu d'enrichissement tellurite-mannitol glycolle, est basé sur la formule de Giolitti et Cantoni. Il est utilisé pour l'enrichissement de *Staphylococcus* dans les produits alimentaires.

Le mannitol et le pyruvate de sodium sont des facteurs de croissance pour les Staphylocoques, et permettent la détection de ce germe quand il est présent en petit nombre seulement. Les bacilles Gram – fermentant le lactose sont inhibés par le chlorure de lithium et les bacilles Gram + par le tellurite de potassium et le glycolle.

. En absence des *Staphylococcus*, on n'observe pas de noircissement du milieu. Si un noircissement apparaît au fond des tubes ou dans tout le milieu c'est le résultat d'une réduction de la tellurite en tellure (Fe^{3+} en Fe^{2+}) (**Roux, 2003**)

La photographie 05 montre le résultat obtenu pour l'étape d'enrichissement sur bouillon Giolliti Contonii, on remarque l'apparition d'une couleur noire dans tout le milieu pour le tube de la solution mère et celui des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Cette coloration noire est due à la réduction de la tellurite en tellure (Fe^{3+} en Fe^{2+}) et donc la présence des Staphylocoques dans notre échantillon de lait .



Photographie 05 : Résultats d'enrichissement sur de bouillon Giolliti Contonii après incubation

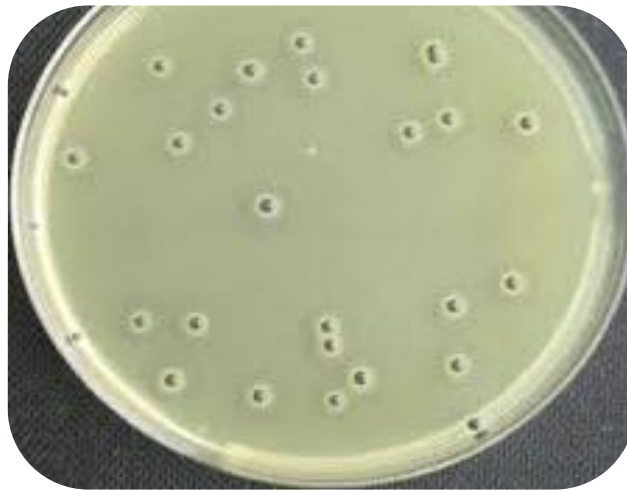
I.2. Résultats des tests de confirmation

I.2.1. Résultats d'isolement sur gélose Baird Parker

Sur le milieu Baird Parker, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent noires, convexes brillantes, de diamètre compris entre 0,5 et 2 mm entourées d'un halo clair due à l'hydrolyse des protéines de l'œuf, après une incubation de 48h à 37°C (Joffin *et al.*, 2006) .

Le développement bactérien sur ce milieu ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries (*Micrococcus*) peuvent également y être cultivées.

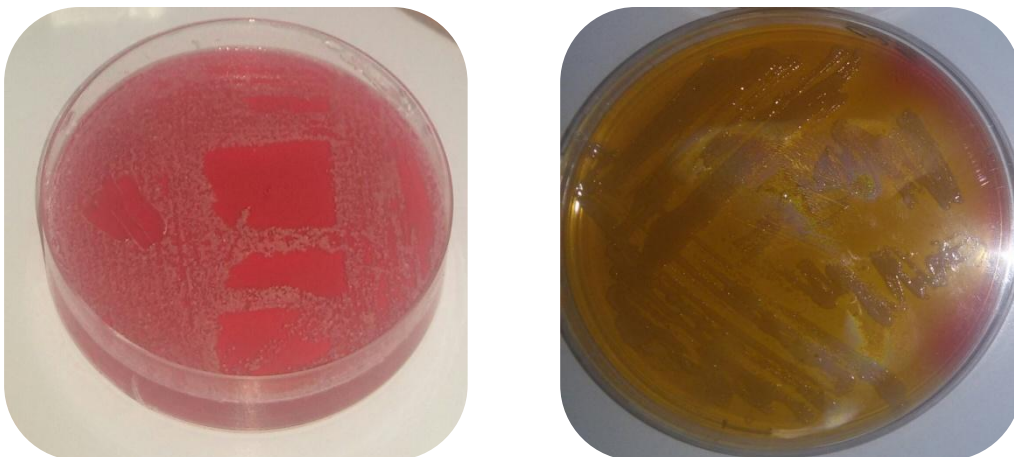
Sur la photographie 06 apparaissent les colonies obtenues après incubation de notre milieu.



Photographie 06 : Résultats d'isolement sur gélose Baird Parker

I.2.2. Résultats d'isolement sur gélose Chapman

Sur le milieu Chapman, les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une aréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté (**Photographie 07A**), dans le cas contraire, les colonies sont de couleur blanche (**Photographie 07 B**). Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 mm de diamètre après 24 heures d'incubation à 37°C.



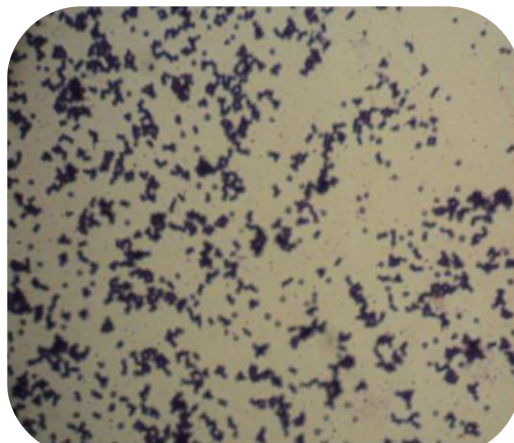
Photographie 07 : Résultats d'isolement sur gélose Chapman

I.3. Résultats des tests complémentaires

Vingt cinq (25) colonies caractéristiques isolées sur Chapman et Baird Parker été ont reprises de manière aléatoire et ont fait l'objet d'un test de purification par repiquages successifs sur gélose nutritive. Les colonies caractéristiques pures feront l'objet de trois tests complémentaires à savoir : une coloration de GRAM, une recherche de l'enzyme catalase et une d'une coagulase

I.3.1. Coloration de Gram

Une coloration de Gram a été pratiquée sur quelques colonies, l'observation des frottis colorés au microscope optique à l'objectif à l'immersion (G x 100) met en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, colorés en violet.



Photographie 08 : Résultats de la coloration de Gram

I.3.2. Test catalase

Un test catalase a été pratiqué sur quelques colonies, l'apparition d'un dégagement de bulles met en évidence un test catalase positif.

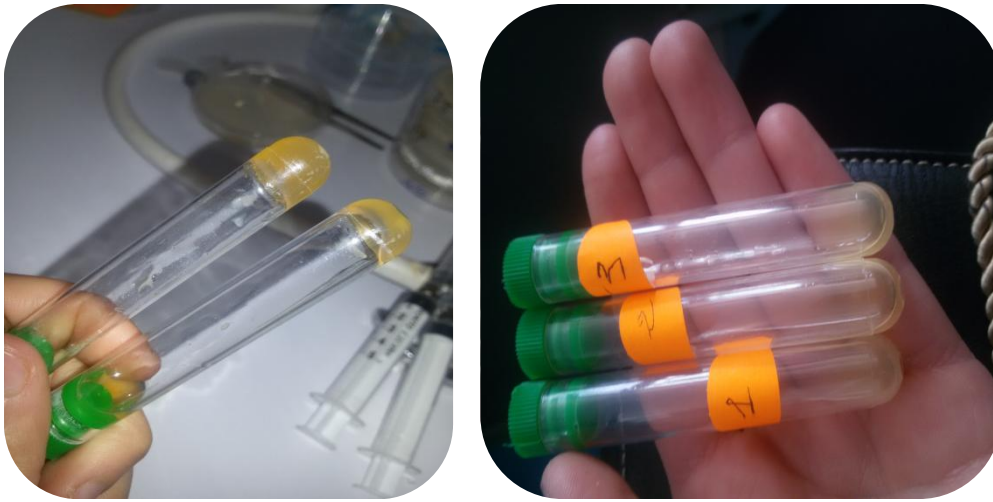


Photographie 09 : Production de catalase par les cocci à Gram positif isolés

I.3.3. Test de coagulase

Ce test permet la recherche de la coagulase, exo enzyme capable in vitro de transformer le fibrinogène en fibrine, ce qui conduit à la coagulation du plasma d'être humain (Zinzendorf *et al.*, 2008). Parmi les Cocci Gram positif, catalase positive, seules les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma oxalaté. Les cocci à Gram positif, catalase positive, testés pour la production d'une coagulase, présentent un phénotype variable.

- **Coagulase positive** : *Staphylococcus aureus*;
- **Coagulase négative** : Autres espèces de *staphylocoques*.



Photographie 10 : Test de coagulase

Coagulase positive : Il y a formation d'un coagulum de fibrine. Le fibrinogène (soluble) a donc été transformé en fibrine (insoluble) la bactérie possède donc une coagulase libre. Elle est dite coagulase positive.

Coagulase négative : Il n'y a pas de formation d'un coagulum de fibrine. Le fibrinogène (soluble) n'a donc pas été transformé en fibrine (insoluble) la bactérie ne possède donc pas de coagulase libre. Elle est dite coagulase négative.

Les résultats obtenus à partir des tests complémentaires sont résumés dans le tableau XX et montrent que des 25 isolats de Staphylocoques :

- 06 Staphylocoques sont à coagulase positive (SCP).
- 19 Staphylocoques sont à coagulase négative (SCN).

Tableau IX : Résultats des tests de confirmation

Souches Purifiées	L'aspect Macroscopique	Mannitol	Test catalase	Test coagulase	Souches suspectes
1, 2	Petite, Blanche, bombé, non brillante	Négatif	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène
3	Moyenne, Blanche, bombé, non brillant	Négatif	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène
4, 5, 6	Petite, Centre noir	/	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène
7	Petite, Centre noir	/	Positif	Positif	Staphylcoque pathogène
8	Blanche, Petite	Positif	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène
9, 10, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25	Dorée, petite, Un peu bombée	Positif	Positif	Négatif	Staphylocoque non pathogène
7, 11, 12, 13, 14	Dorée, petite, Un peu bombée	Positif	Positif	Positif	Staphylcoque pathogène

Sur la figure 16 on remarque que 76% des isolats sont des staphylocoques à coagulase négatifs et 24% des isolats sont à coagulase positif. Le nombre élevé de SCN isolé serait dû aux mauvaises conditions d'hygiène de la traite. Plusieurs travaux montrent que l'application d'une désinfection des trayons après la traite contribue à la diminution de la prévalence des SCN (Todhunter *et al.*, 1993).

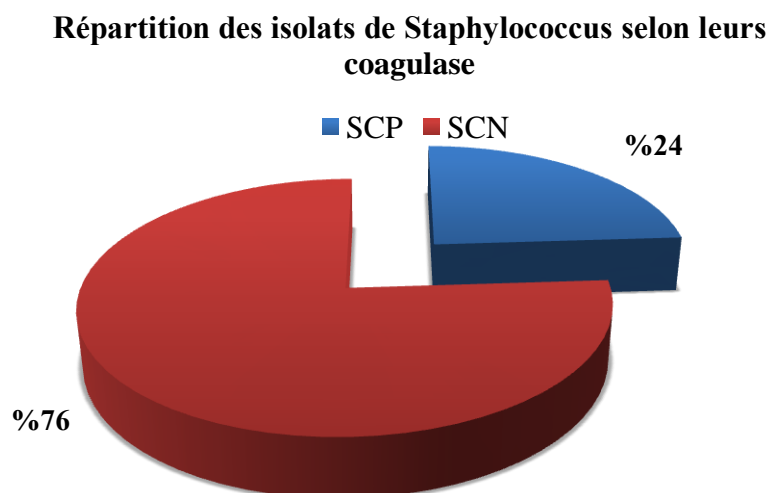


Figure 16 : Répartition des isolats de *Staphylococcus* selon leurs coagulase.

I.4. Identification biochimique des isolats

La lecture des galeries biochimiques est réalisée à l'aide du tableau de lecture (**Annexe 07**) et du logiciel **API Excel** (**Annexe 06**), la lecture des résultats se fait soit de manière directe, par un changement de couleur du milieu du puits (en raison d'un changement de pH), soit de manière indirecte, dans ce cas il faut rajouter certains révélateurs dans les puits concernés (NIT 1 et NIT 2, ZYM A et ZYM B , VP1 et VP 2). Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau XIII**.

Tableau XIII : Résultats d'identification biochimique des espèces de Staphylocoques

Souches	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	Espèces
01	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>S. hominis</i>
02	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	<i>S. xylosus</i>
03	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>S. hominis</i>
04	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	<i>S. hominis</i>
05	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>S. chromogenes</i>
06	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>S. hominis</i>
07	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>S. aureus</i>
08	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>S. xylosus</i>
09	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	<i>S. warneri</i>
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Micrococcus</i>
11	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>S. aureus</i>
12	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>S. aureus</i>
13	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>S. aureus</i>
14	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>S. aureus</i>
15	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	<i>S. hominis</i>
16	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	<i>S. hominis</i>
17	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>S. lugdunensis</i>
18	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>S. aureus</i>
19	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>S. hominis</i>
20	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	<i>S. warneri</i>
21	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>S. hominis</i>
22	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	<i>S. epidermidis</i>
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	<i>Micrococcus</i>
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>Micrococcus</i>
25	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>S. hominis</i>

(+) : Résultat positif, (-) : Résultat négatif; (0) : Témoin ; (GLU) : D-glucose ; (FRU) : D-fructose ; (MNE) : D-mannose ; (MAL) : D-maltose ; (LAC) : D-lactose ; (TRE) : D-tréhalose ; (MAN) : D-mannitol ; (XLT) : Xylitol ; (MEL) : D-mélibiose ; (NIT) : Nitrate de Potassium ; (PAL) : β-naphtyl phosphate ; (VP) : Sodium Pyruvate (réaction de Voges-Proskauer) ; (RAF) : D-raffinose ; (XYL) : D-xylose ; (SAC) : D-saccharose ; (MDG) : Méthyl-αD-glucopyranoside ; (NAG) : N-acétylglucosamine ; (ADH) : L-arginine ; (MEL) : D-melibiose ; (URE) : Urée.



Staphylococcus hominis



Staphylococcus xylosus



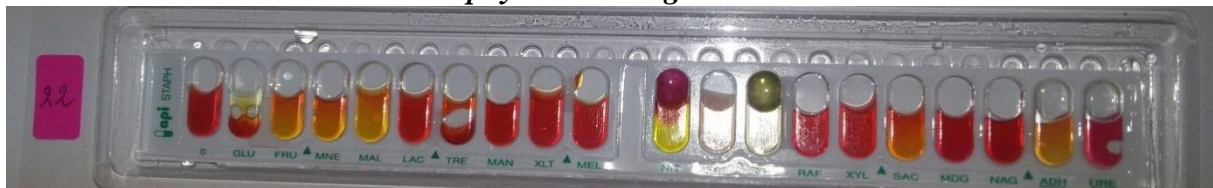
Staphylococcus aureus



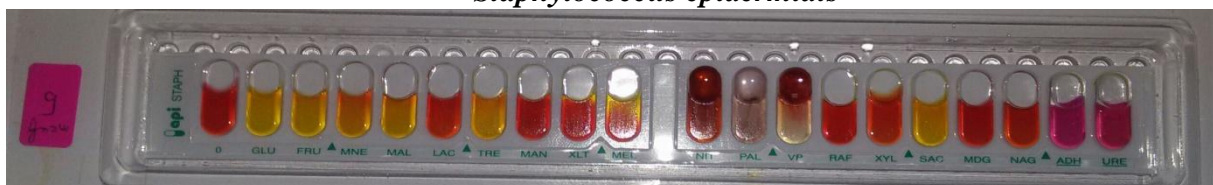
Staphylococcus chromogenes



Staphylococcus lugdunensis



Staphylococcus epidermidis



Staphylococcus warneri



Micrococcus

Photographie 12 : Les espèces bactériennes identifiées et l'aspect de leurs galeries biochimiques.

Au total 8 espèces différentes de *Staphylococcus* ont été identifiées à partir de notre échantillon de lait cru et sont représentées sur le **tableau III**.

Elles sont majoritairement représentées par *Staphylococcus hominis* avec un nombre de **09** soit **36%** des espèces, suivi par *Staphylococcus aureus* avec un pourcentage de **24%**, **8%** pour *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus warneri* (**02**), *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis* avec un pourcentage de 4 % chacun. **12%** des espèces appartiennent au genre *Micrococcus*.

La répartition des isolats de *Staphylococcus* selon l'espèce identifiée.esr représentés sur **la figure**

Tableau : Pourcentage et nombre des différentes espèces identifiées.

Les espèces	Nombre	Pourcentage
<i>Staphylococcus hominis</i>	09	36%
<i>Staphylococcus aureus</i>	06	24%
<i>Micrococcus</i>	03	12%
<i>Staphylococcus xylosus</i>	02	8%
<i>Staphylococcus warneri</i>	02	8%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	01	4%
<i>Staphylococcus chromogense</i>	01	4%
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	01	4%

Répartition des isolats de *Staphylococcus* selon l'espèce

- *S. hominis*
- *S. aureus*
- *Micrococcus*
- *S. xylosus*
- *S. warneri*
- *S. chromogenes*
- *S. lugdunensis*
- *S. epidermidis*

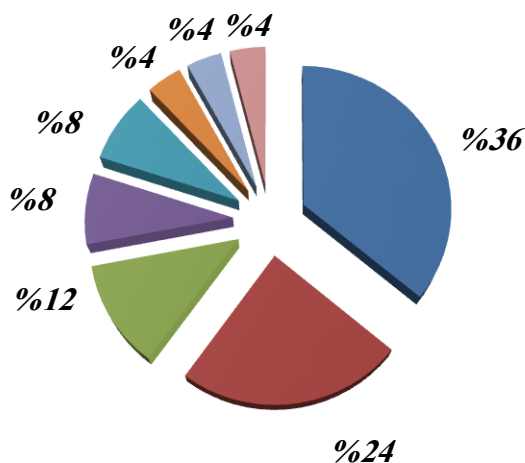


Figure : Répartition des isolats de *Staphylococcus* selon l'espèce identifiée.

La répartition des espèces de SCN est variable en fonction des études. Cette variation pourrait être attribuée à l'utilisation de différents systèmes d'identification.

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) constituent un des groupes de bactéries qui provoquent la mammite. Ces bactéries sont très intéressantes, car il s'agit actuellement des micro-organismes les plus fréquemment isolés chez les vaches et les génisses des troupeaux. • ce jour, ils sont considérés comme des agents pathogènes émergents de la mammite bovine (**Pyorala S. et al., 2009**).

Les SCN sont habituellement localisés sur la peau saine du trayon et sur les mains du trayeur. Ils sont souvent appelés « micro-organismes opportunistes », car ils vivent sur des zones leur permettant de coloniser facilement le canal du trayon et de pénétrer jusqu'aux tissus sécréteurs.

II. Antibiorésistance des espèces identifiées

La résistance aux antibiotiques à été testée pour chacune des bactéries identifiées vis-à-vis de 09 antibiotiques.

La **photographie 13** montre les résultats des antibiogrammes obtenus, les valeurs des diamètres d'inhibitions sont comparées aux valeurs du tableau de lecture (**Annexe 05**). Les valeurs obtenues nous ont permis de classer les bactéries en sensible (**S**), intermédiaire (**I**) ou résistante (**R**) à chaque antibiotique. **Tableau XIV**



Photographie 13 : Résultats des antibiogrammes.

Les taux de résistance pour chaque antibiotique sont calculés, les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau XV**.

Tableau XIV: La résistance aux antibiotiques des *Staphylococcus* identifiées

ATB \ Bactérie	P	OX	AK	CN	K	E	DA	PT	OFX	LEV	VA	RD	SXT
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. xylosus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. chromogenes</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. xylosus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. warneri</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>Micrococcus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. lugdunensis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. aureus</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. warneri</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>S. epidermidis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
<i>Micrococcus</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Micrococcus</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. hominis</i>	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S

S : Sensible

R : Résistante

Tableau XV : Les taux de résistance aux antibiotiques des *Staphylococcus* identifiées

ATB	% de R	% de résistance des Bactéries	% de sensibilité des Bactéries
P		100%	0%
OX		100%	0%
AK		0%	100%
CN		0%	100%
K		95.65%	4.35%
E		100%	0%
DA		95.65%	4.35%
PT		95.65%	4.35%
OFX		0%	100%
LEV		0%	100%
VD		0%	100%
RD		95.65%	4.35%
SXT		13.04%	86.96%

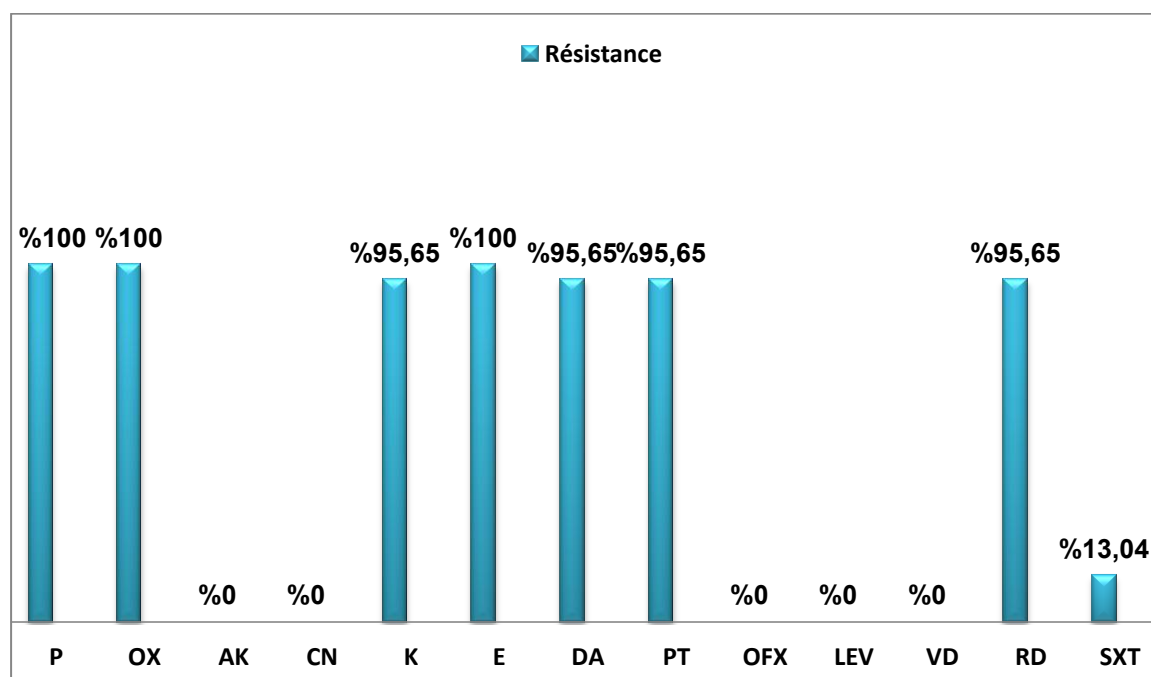


Figure 27 : Pourcentage de résistance des *Staphylococcus* identifiées vis à vis les 13 antibiotiques testés.

On observe que les taux de résistance varient nettement d'un antibiotique à l'autre. Les espèces étudiées de *Staphylococcus* ont présenté un taux de **100%** de résistance à la pénicilline, et à l'oxacilline. Un *Staphylococcus* résistant à toutes les β -lactamines doit être considéré comme un SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline). Deux mécanismes expliquent la résistance des staphylocoques aux β -lactamines : la production de β -lactamases et la modification de cible.

Pour les macrolides; les espèces étudiées de *Staphylococcus* ont présenté un taux de 100% de résistance à la l'Erythromycine, **95.65%** à la Clindamycine et la Pristinamycine.

Le taux de résistance obtenu pour les antibiotiques appartenant à la classe des aminosides est variable, un taux de résistance nul pour la gentamicine et l'Amikacine et **95.65%** pour la Kanamycine, L'explication possible de ce taux de résistance est la faible consommation de la gentamicine étant donné l'existence de molécules moins toxiques et plus efficaces.

Un taux de résistance nul pour l'Ofloxacine , Lévofoxacine et la vancomycine.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a fait ressortir des fréquences de résistance élevées notamment pour la pénicilline, où nous retrouvons une nette augmentation par rapport à une étude réalisée en 1991 par **Messadi**, 64 % contre 18,6%; pour la tétracycline, 36% contre 23,9 %. Pour la streptomycine, une fréquence plus faible a été observée, 20 % contre 47,2 %. Par contre les fréquences de résistance à la gentamicine sont plus faibles qu'en 1991. (**Ben Hassen et al., 2003**)

La résistance des souches isolées vis-à-vis de la pénicilline G est confirmée pour toutes les souches avec 100% de taux de résistance, les mêmes résultats ont été rapportés par **Rahal (2001)**, par **Bouaziz (2005)** à l'Est algérien et par **Ben Hassen et al., (2003)** en Tunisie. En effet selon **Guérin-Faublée et Brun (1999)**, certaines souches de *Staphylococcus* synthétisent des pénicillinases, enzymes limitant l'action de certains antibiotiques. La résistance à l'oxacilline est de 8%, cette faible résistance du germe a été confirmée par les deux études menées par **Ben Hassen et al. (2003)** et **Bouaziz (2005)**.

III. La multirésistance

Notre travail a également permis d'étudier le phénomène de multirésistance. Une souche multirésistante est une souche qui présente une résistance à au moins deux antibiotiques. On trouve des souches qui résistent à trois, sept, huit et à neuf antibiotiques.

Les pourcentages des souches résistantes à au moins trois, à au moins sept, à au moins huit et à au moins neuf ont été calculés et rapportés dans la **figure 15**.

La totalité des souches de *Staphylococcus* identifiées c'est-à-dire **100 %** résistent à au moins 3 antibiotique, **95.65 %** résistent à au moins 6 antibiotiques, **13.04 %** résistent à au moins 7 antibiotiques et faible pourcentage **4.35 %** résistent à au moins 8 antibiotiques.

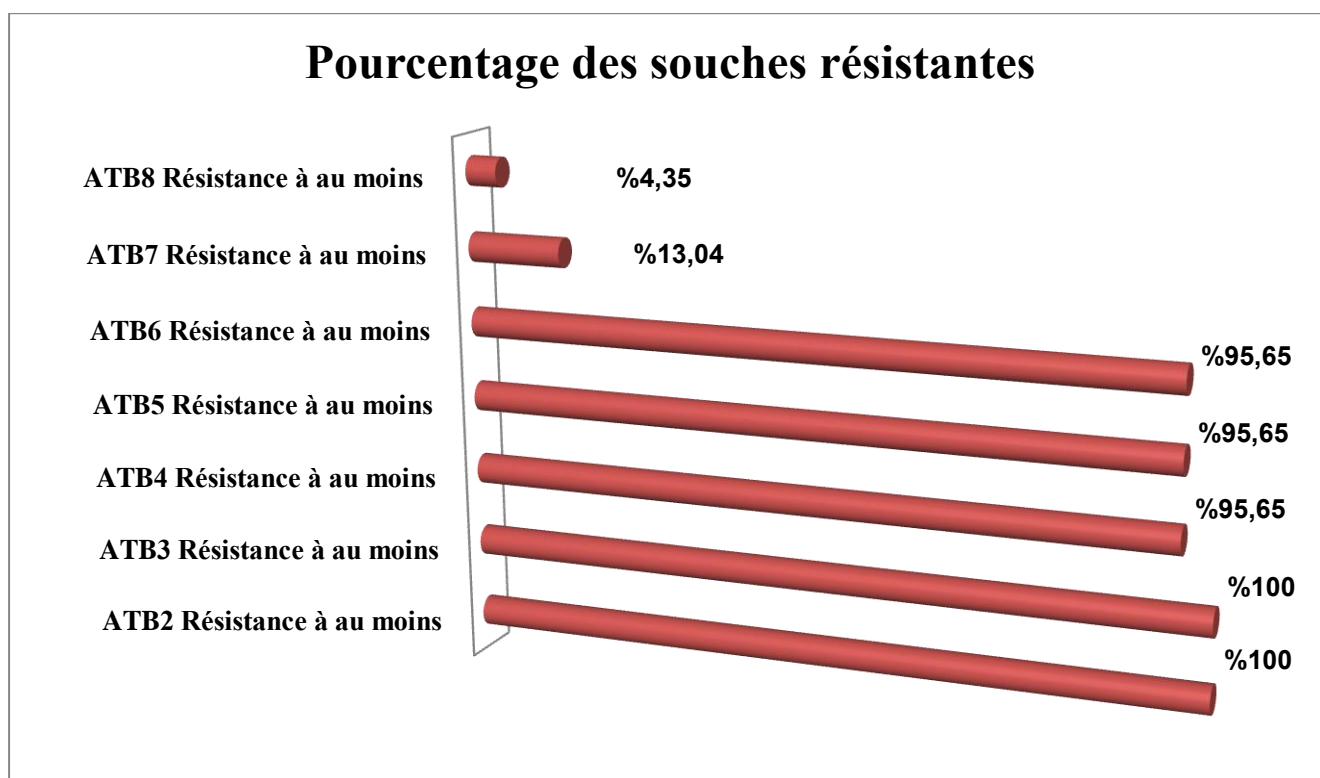


Figure 15 : Pourcentage d'isolats de *Staphylococcus* résistants à au moins 3, 6, 7 et 8 antibiotiques.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

A travers cette étude, nous avons évalué le degré de contamination du lait de vache cru en germe pathogènes appartenant au genre *Staphylococcus*, ce lait est collecté à partir d'une ferme traditionnelle située aux alentours de la ville de Khenchela.

Les résultats obtenus montrent que 76% des isolats sont des staphylocoques à coagulase négatifs et 24% des isolats sont à coagulase positif.

Au total 8 espèces différentes de *Staphylococcus* ont été identifiées à partir de notre échantillon de lait cru. Elles sont majoritairement représentées par *Staphylococcus hominis* avec un nombre de **09** soit **36%** des espèces, suivi par *Staphylococcus aureus* avec un pourcentage de **24%**, **8%** pour *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus warneri* (**02**), *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis* avec un pourcentage de **4 %** chacun et **12%** des espèces appartiennent au genre *Micrococcus*.

Au vu des normes algériennes (JORA, 1998), la qualité hygiénique de cet échantillon de lait est mauvaise. Le lait est fortement pollué, révélant des pratiques d'hygiène douteuses, que même des conditions de réfrigération optimales du lait, ne peuvent, en aucun cas, masquer.

Sur le plan technologique, ces laits sont considérés comme fortement pollués et risquent de compromettre le bon déroulement des opérations de transformation fromagère, notamment lors de la pasteurisation, avec un risque de coagulation du lait.

Sur le plan nutritionnel, l'accroissement des activités métaboliques microbiennes conduit à un abaissement de la valeur nutritionnelle du lait et de ses dérivés, du fait de la dégradation de ses constituants.

Sur le plan sanitaire, la présence de staphylocoque coagulase positive, présente un risque d'intoxication alimentaire par l'ingestion d'entérotoxines thermostables.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que les bactéries présentent des profils inquiétants de résistance surtout aux bêtalactamines et les macrolides. Les bactéries testées montrent une résistance majoritaire pour Pénicilline et Oxacilline (**100%**)

Pour les macrolides; les espèces étudiées de *Staphylococcus* ont présenté un taux de **100%** de résistance à la l'Erytromycine, **95.65%** à la Clindamycine et la Pristinamycine. La Vancomycine est active sur la totalité des espèces. Les résultats ont aussi montré un profil fde multirésistance alarmant

Les résultats de ce travail mettent en lumière par une approche originale, premièrement le risque élevé pour les consommateurs en l'absence des mesures d'hygiène strictes et préventives visant à éviter la présence d'isolats de *Staphylococcus* dans le lait cru, soulignant la nécessité

d'une meilleure pratique hygiène au cours de la transformation de cet aliment et aussi lors de la distribution et la consommation des produits laitiers finis.

Deuxièmement, le problème récurrent d'une surconsommation d'antibiotiques dans la médecine humaine et animale d'aujourd'hui.

Notre étude devrait faciliter l'identification des antibiotiques risquant de favoriser l'émergence de souches plus résistantes et plus virulentes dans les aliments. Elles devraient aussi contribuer à une prise de conscience sur un emploi raisonnable et bien ciblé des antibiotiques en général.

Aujourd'hui plus que jamais, la maîtrise de la dissémination des SARM doit passer par l'éducation des personnels en matière d'hygiène, le respect des procédures de lavage des mains, ainsi qu'une politique cohérente d'hygiène. Une maîtrise de la diffusion des souches multirésistantes et de la pression générée par des prescriptions d'antibiotiques non justifiées semble urgente. Ainsi, le contrôle régulier et la révision de toutes les prescriptions d'antibiotiques, sont utiles et constituent un des facteurs qui va contribuer à l'amélioration de la qualité de la prise en charge des infections chez l'homme et l'animal.

L'actualisation des données locales, sur le profil épidémiologique de ce germe et leur sensibilité joue un rôle important dans la rationalisation de l'utilisation des antibiotiques et dans la détermination d'une stratégie de contrôle du développement des *Staphylococcus* multirésistants.

Ainsi, notre travail ouvre de nombreuses perspectives:

- Etudier une population plus importante, pendant une période plus longue;
- Recherche des gènes de résistance (PCR) ;
- La détection d'entérotoxines produites par *S Staphylococcus aureus* dans les aliments.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

1 - Alais, C. (1975). Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien, Benhedane née Bachtarzi Nadia, Université Mentouri Constantine février à avril 2011.

2 - Alves de Oliveira, L. (2007). Composition chimique du lait, Cours de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Alimentation des Animaux, mis à jour le 27/02/2007. In Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acide gras .voies d'amélioration par l'alimentation, doctorat veterinaire ; Florence courtet Leymarios, 2010.

3 - Ananthanarayan, P. (2006). Textbook of Microbiology. Edition Seventh, India. 665pages.

4 - Anonyme, (2006). Fiche technique, La Catalase.

5 - Arrêté Interministériel du 27 octobre 1993 (JORA) relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation. JORA N°69, 1993, Algérie.

6 - Bachtarzi, N. (2012). Qualité microbiologique de lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'Est Algérien. Mémoire de Magister en science alimentaire, université Mentouri Constantine, 83p.

7 - Ben Mahdi M-H. et Ouslimani S. (2009). Mise en évidence de résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'algérois. European Journal of Scientific Research vol.36 n°3. pp: 357-362

8 - Benallegue, H., Debbeche, S-N. (2015). Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique de 3 marques de lait U.H.T, (Candia, Obeï et Hodna). Mémoire de Master en Toxicologie et santé. Université des Frères Mentouri Constantine.

9 - Betelgeux, S-L. Formation relative à la sécurité alimentaire en fromagerie, Chapitre 3: Composition du lait et caractéristiques physiques et chimiques. OAPEE

10 - Bio-Mérieux, (2009). Catalogue Analytique API 20 E. Système d'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux (Réf. 20100/20160). Biomérieux.

11 - Blanc, B. (1982). Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. International dairy journal, 62. pp : 350-395. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien., Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011.

12 - Boukhemis, A., Boutersa, A., (2015). Mémoire de Master en microbiologie. Identification et antibiorésistance de souches d'Escherichia coli et de Klebsiella pneumoniae des infections urinaires à l'aide des moyens classiques et des moyens automatisés. Université des Frères Mentouri Constantine.

13 - Boutonnier, JL. (2008). Matière grasse laitière : Composition, organisation et propriétés. Dans Techniques de l'ingénieur, Traité Agroalimentaire (F 6320), Paris. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien., Mme. Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011.

14 - Bylund. (1995). Dairy processing handbook-Tetra pak processing systems AB S-221 86, Lund, Sweden : 18-23-381(436 pages). In Evaluation de la qualité physico-chimique et

organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien, Université Mentouri Constantine, Ghaoues Souheila, Constantine, 2011.

15 - Cau, J. (1993). Au fil du lait, ISBN 2-86621-172-3. Edition: ENESAD / CNERTA

16 - Cayot, P. et Lorient, D. (1998). Structures et Technofonctions des Protéines du Lait. Edition Tec et Doc Lavoisier. Paris. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien., Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011.

17 - CIPC Lait Commission Interprofessionnelle des Pratiques Contractuelles (2011). Avis relatif à la définition et aux méthodes d'analyse de l'acidité du lait n°2011-02

18 - 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, Alfort, 122p.

19 - Derzelle, S., Dilssai, F., Duquenne, M. et Deprrois, V., (2009). Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. Food Microbiology, 26: 896–904.

20 - Fédération des producteurs de lait du Québec. (2000). Données tirées de Fédération des producteurs de lait du Québec, 2000 ; GREPA, Université Laval Québec, 2000. Conseil canadien du contrôle laitier, 2000 ; Université Guelph, Ontario, 2001. In Etude comparative entre trois (03) types de lait de vache (Lait entier, lait demi-écrémé et le lait écrémé) pasteurisé. diplôme de Master, 2015, Bouchakour Errahmani Khadidja, Djeghlal Soumia , Khemis Meliana .

21 - Fotou, K *et al.*, (2011). Isolation of Microbiol pathogens subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epuris (Greece) and their role in its hygiene .Anaerobe 17, 315, 319.

22 - Fredot, E., (2005). Connaissance des aliments Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier:10-14 (397 pages). In Diplôme de Magister, Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien ; GHAOUES Souheila; Constantine, 2011.

23 - Ghaoues, S. (2011). Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien. Mémoire de Magister en sciences alimentaires. Université Mentouri (I.N.A.T.A.A), Constantine, 190p.

24 - Goursaud,J., (1985). Composition et propriétés physico-chimiques. Dans Laits et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits de la mamelle à la laitière. Luquet F.M.. Edition Tec et Doc Lavoisier, Paris. in Analyse bactériologique et antibiorésistance de la flore de contamination du lait collecté à partir d'une ferme de la région de Khenchela, Bouzidi Nour El Imene. ;2016).

25 - Goy, D., Häni, J-P., Wechsler, D. et Jakob, E. (2005). Valeur de la teneur en caséine du lait de fromagerie. Edition, Agroscope Liebfeld-Posieux. Groupe de discussions Gruyère N°27f. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien., Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011.

26 - Grappin, R., Pochet, S. (1999). Le lait, P 3 – 22. In étude comparative entre trois (03) types de lait de vache (Lait entier, lait demi-écrémé et le lait écrémé) pasteurisé, mémoire

pour l'obtention du diplôme de Master, 2015, Bouchakour Errahmani Khadidja, Djeghlal soumia ; Khemis Miliana.

27 - Guiraud. (2003). Méthode d'analyse en microbiologie alimentaire. In : Microbiologie alimentaire. Paris. In analyse physico-chimique et microbiologie de lait UHT demi-écrém , Akli Bourdja ;Centre de formation professionnelle El hidhab sétif Algerie-BTS en control de qualité dans les industrie agroalimentaires 2011.

28 - Haller, C., Floquet, K. (2002). Le lait de la vache à la brique. In Analyse bactériologique et antibiorésistance de la flore de contamination du lait collecté à partir d'une ferme de la région de Khenchela, Bouzidi Nour El Imene. ; 2016.

29 - Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P. et Brule, G., (2008). Les produits laitiers, 2^{ème} édition, Tec et Doc, Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages). In Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien ; Ghaoues Souheila; Constantine, 2011.

30 - Kirat, S. (2007). Les conditions d'émergence d'un système d'élevage spécialisé en engraissement et ses conséquences sur la redynamisation de l'exploitation agricole et la filière des viandes rouges bovines - Cas de la Wilaya de Jijel en Algérie. Montpellier (France): CIHEAM-IAMM.13p. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est algérien); Benhedane Née Bachtarzi Nadia ;Constantine . ; 2012 .

31 - Kouame-sina S-M., (2013). Contribution a la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre bifidobacterium isolées de la chaine de production du lait local a abidjan. République de Côte d'Ivoire. Thèse de doctorat. Université Nangui Abrogoua.

32 - Lamontagne, M., Champagne, C.P., Reizt-Ausseur, J., Moineau, S., Gardner, N., Lamoureux, M., Jean, J., Fliss, I. (2002). «Microbiologie du lait» in Science et technologie du lait - Transformation du lait. Sous la dir. de Carole L. Vignola. p. 75-151. Presses Internationales Polytechnique.

33 - Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2 : 63-76.

34 - Lebres. (2002). Manuel des travaux pratiques, cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments, unité microbiologie des laits et des produits, laitiers, institut pasteur d'Algérie, pp. 21-27

35 - Luquet, F-M. (1985). Laits et produits laitiers - Vache, brebis, chèvre. Tome 1 : Les laits De la mamelle à la laiterie. Tech. & Doc., Coll. STAA, Lavoisier, Paris. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien,. Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011.

36 - Marchin, S. (2007). Dynamique de la micelle de caséines : Caractérisation structurale. Thèse INRA/ Agrocampus Rennes. In Qualité microbiologique du lait cru destine à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est Algérien,. Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011.

37 - Mathieu, J. (1998). Initiation à la physicochimie du lait. Guides Technologiques des IAA. Edition Lavoisier Tec et Doc, Paris. In Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du

diplôme de Master, Etude comparative entre la qualité Microbiologique du lait cru de vache et le Lait de chèvre ; M^{elle} Belarbi Meryem, Tlemcen, 2015.

38 - Messadi, L., Ben Miled, L., Haddad, N. (1991). Mammites bovines en Tunisie : bactéries responsables et antibiorésistance. *Rev. Méd. Vét.*, 1991, **142**, 313-319.

39 - Mofredj, A., Bahloul, H., Chanut, C. (2007). *Lactococcus lactis* : un pathogène opportuniste ? - *Med. Malad. Infect.*, 37(4), 200-207. In Evaluation de la qualité microbiologique du lait cru dans la région du Gharb, Maroc. Najia Ouazzani Taybi1, Amine Arfaoui, and Mohamed Fadli. 2014. Innovative Space of Scientific Research Journals. <http://www.ijisr.issr-journals.org/>

40 - Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). (1998). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Collection FAO: Alimentation et nutrition, n° 28, ISBN 92-5-20534-6. In Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acide gras .voies d'amélioration par l'alimentation, doctorat veterinaire ; Florence Courtet Leymarios, 2010.

41 - Ouali, S. (2003). Qualité du fromage a pâte molle type Camembert fabriqué à la laiterie de Draa Ben Khedda : nature de la matière première et évaluation de l'activité protéolytique au cours de l'affinage et de l'entreposage réfrigéré du fromage .Mémoire De Magister en Sciences Alimentaires. Université Frères Mentouri. Constantine. Algérie. In Etude physico-chimique, biochimique et qualité microbiologique du lait camelin cru ; BENYAHIA Latifa ;MANSOURI Bakhta.

42 - Parguel, P., Corrot, G., Sauvée, O. (1994). Variations du point de congélation et principales causes du mouillage du lait de vache, Institut de l'Elevage, Paris.

43 - Picaud, J.C. (2008). Allaitement maternel et lait maternel : Quels bénéfices pour la santé de l'enfant. Nutrition clinique et métabolisme, vol. 22, n° 2, p. 71-74. In Les différents laits et leur complexité. Les protéines du lait de vache : Aspect nutritionnel et allergie alimentaire. , 20 juin 2011. , Aurélie LAFITE DUPON.

44 - Pougheon, 2001 : Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse doctorat d'état en médecine vétérinaire, université Paul Sabatier de Toulouse, France in Qualité microbiologique du lait cru destine à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est algerien., Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011 .

45 - Pyorala, S., Taponen, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci- Emerging mastitis pathogens.

46 - Ramet, J-P., (1985). La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen. Archives de documents de la FAO. In Analyse bactériologique et antibiorésistance de la flore de contamination du lait collecté à partir d'une ferme de la région de Khenchela ;, Bouzidi Nour El Imene. 2016.

47 - Rasolof, E-A. (2010). Analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Mémoire pour l'obtention du grade de Philosophie doctor (Ph.D.) de l'université Laval .Québec.Canada .in Etude physico-chimique, biochimique et qualité microbiologique du lait camelin cru ; BENYAHIA Latifa ;MANSOURI Bakhta.

48 - Remeuf, F., Le noir, J., Duby, C. (1989). Etude des relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. Lait, 69,499, 518. In Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de

Master, Etude comparative entre la qualité Microbiologique du lait cru de vache et le Lait de chèvre ; M^{elle} Belarbi Meryem, Tlemcen., 2015.

49 - Roudaut, H., Lefrancq, E. (2005). Alimentation théorique. Edition Sciences des Aliments in Qualité microbiologique du lait cru destine à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est algerien, Mme. Benhedane Née Bachtarzi Nadia., Université Mentouri – Constantine – février à avril 2011.

50 - Silait (Salon international du lait). (2008). Acte du 1^{er} salon international du lait et de ses dérivés du 27 au 29 mai 2008 Alger. <http://www.agroligne.com/contenu/silait-2008-1er-salon-international-lait>. In Qualité microbiologique du lait cru destiné à la fabrication d'un type de camembert dans une unité de l'est algérien ; Benhedane Née Bachtarzi Nadia ; Constantine ; 2012 .

51 - Site de Lactel. (2009). <http://www.lactel.fr/> In Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acide gras .voies d'amélioration par l'alimentation, doctorat vétérinaire ; Florence Courtet Leymarios, 2010 .Née le 29 mai 1985 à Rambouillet (Yvelines).

52 - Soude S.G.A.A., (2005). Bactéries isolées des hémocultures au laboratoire du centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga De Cotonou. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en pharmacie diplôme d'état. République du Mali, université de Bamako, faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie.

53 - Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. **2005.** 4^{ème} édition.

54 - Tooher. (1925). Etat colloïdal et Industrie, Paris, 1925, p. 132. Béranger, édit. In W. Kopaczewski. Etude physico-chimique du lait. Le Lait, INRA Editions, 1948,28 (273 274), pp.114-141.

55 - Veisseyre, R. (1975). Technologie du lait. Constitution, récolte, traitement et transformation du lait. P 25, Etude comparative entre trois (03) types de lait de vache (Lait entier, lait demi – écrémé et le lait écrémé) pasteurisé. Bouchakour Errahmani Khadidja ; Djeghlal Soumia. ,2015 ; Khemis Miliana.

56 - Vierlinge, E. (2003). Aliment et boisson-Filière et produit, 2^{ème} édition, doin éditeurs, centre régional de la documentation pédagogique d'Aquitaine:11(270 pages). In Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien ; Ghaoues Souheila ;Constantine, 2011 .

57 - Vignola, C-L. (2002). Science et Technologie du Lait Transformation du Lait. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. pp. 3-75. In Contamination du lait cru et de l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan (Côte d'Ivoire) par le groupe *Bacillus cereus* et analyse des risques ; Thèse unique pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Nangui Abrogoua ;Yobouet Bassa Antoine .

58 - Wattiaux, M. (1997). L'essentiel Laitier, Institut Babcock, Wisconsin University, USA, 140 p. In Etude comparative entre trois (03) types de lait de vache (Lait entier, lait demi – écrémé et le lait écrémé) pasteurisé. Bouchakour Errahmani Khadidja ; Djeghlal Soumia. ,2015; Khemis Miliana.

59 - Bouaziz, O. (2005). Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat d'Etat en

pathologie de la reproduction. Département des Sciences Vétérinaires. Université de Constantine. pp :156-188.

60 - Guerin Fauble V., Brun Y. (1999). Les résistances aux antibiotiques chez les staphylocoques d'origine animale. Revue de médecine vétérinaire., 150. pp: 299-312

Annexes

Annexe 01. Composition des milieux de culture

Bouillon Giolitti-Cantoni

Le Bouillon Giolitti-Cantoni est un milieu d'enrichissement utilisé pour la recherche de *Staphylococcus aureus* dans les aliments.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : $6,9 \pm 0,2$

Tryptone	10,00
Extrait de viande	5,00
Extrait de levure	5,00
Glycine	1,20
Mannitol	20,00
Pyruvate de sodium	3,00
Chlorure de sodium	5,00
Chlorure de lithium	5,00
Polysorbate 80	1,00

Le milieu de Chapman

Le milieu de Chapman est utilisé pour l'isolement des Staphylocoques pathogènes qui donnent des colonies jaunes par fermentation du mannitol et virage du rouge de phénol. Sa forte teneur en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des autres espèces.

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

-Peptones.	10,00 g
-Extrait de viande de bœuf	1,00 g
-D-mannitol	10,00 g
-Chlorure de sodium	75,00 g
-Rouge de phénol	0,025 g
-Agar	15,00 g

Gélose de Baird Parker

La gélose Baird-Parker est recommandée pour la recherche et la numération des staphylocoques coagulase positive. Son utilisation est recommandée par la pharmacopée européenne et américaine et pour la recherche de *Staphylococcus aureus* dans les aliments (méthode AFNOR).

Ingrédients en grammes pour 950 ml d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone pancréatique de caséine	10,00
Extrait de viande de bœuf	5,00
Extrait de levure	1,00
Chlorure de lithium	5,00
Glycine	12,00
Pyruvate de sodium	10,00
Agar	20,00

Le milieu prêt à l'emploi en boîtes de Pétri contient en plus des 950 ml du milieu de base

Solution de jaune d'œuf	50 ml
Tellurite de potassium à 10 g/l	10 ml

pH final à 25°C : $7,0 \pm 0,2$

Gélose Nutritive

La Gélose Nutritive est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée. pH final à 25°C : $6,8 \pm 0,2$

Peptone	5.00
Extrait de viande de boeuf	3.00
Agar	1,5

Le milieu en flacons et tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Le milieu en boîtes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Gélose Mueller Hinton

La gélose Mueller-Hinton est le milieu de référence pour les tests de sensibilité des germes aux antibiotiques. Sa formulation est conforme aux recommandations du de l'O.M.S. Elle peut également être additionnée de sang pour réaliser l'antibiogramme des germes fragiles, tels que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Enterococcus sp* et *Streptococcus pneumoniae*. Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Infusion de bœuf	30,00 g
Peptone de caséine	17,50 g
Amidon	1,50 g
Agar	17,00 g

Ph final à 25°C : 7,3 et 0,2

Le milieu en flacons ou boîtes se conserve entre 2 et 8°C.

Bouillon Nutritif

Le Bouillon Nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des microorganismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	5,00	pH final à 25°C : $6,8 \pm 0,2$
Extrait de viande de boeuf.....	3,00	

Le milieu en flacons ou tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

Annexe 02. Composition des colorants de gram

Cristal violet ou violet de gentiane (pour coloration de Gram)

- **Solution mère A**

Cristal Violet ou Violet de Gentiane..... 25 g

Ethanol à 96 %..... 250 ml

La solution est vigoureusement agitée à trois reprises dans la même journée. On laisse déposer. La Solution est prête à l'emploi dès le lendemain.

Conservation : Quelques années en flacon brun Hermétiquement bouché.

- **Solution mère B**

Oxalate d'Ammonium (NH₄)₂C₂O₄.H₂O.....5 g

Eau Distillée..... 500 ml

Conservation : 2 à 3 mois dans un flacon hermétiquement bouché.

Fuchsine

- **Fuchsine mère saturée**

Fuchsine Basique..... 25 g

Ethanol à 96 %..... 250 ml

Conservation : Quelques années dans un flacon brun hermétiquement bouché.

- **Solution mère aqueuse de Phénol à 5 % (v/v) :**

Phénol Cristallisé fondu50 ml

Eau distillée..... 950 ml

conservation : Quelques mois dans un flacon hermétiquement bouché.

Fuchsine (solution de travail)

Solution saturée de Fuchsine Basique, filtrée..... 100 ml

Solution aqueuse de Phénol à 5 %..... 900 ml

Conservation : Au moins 2 ans.

Fuchsine diluée (pour coloration de Gram)

Fuchsine Phéniquée 01 ml

Eau Distillée..... 09 ml

Conservation : 1 mois tout au plus, et Faire la dilution avant chaque coloration.

Lugol faible (pour coloration de Gram)

Iodure de Potassium (KI)..... 2,34 g

Iode en Cristaux ou Iode Sublimée..... 1,66 g

Eau Distillée.....500 ml

Conservation : non filtré : 3 mois. Le Lugol doit avoir une coloration brun rouge.

S'il est jaune, il ne fonctionnera plus et doit être jeté.

Alcool Éthylique Ou Éthanol

Alcool primaire, liquide incolore, d'odeur agréable, miscible à l'eau en toutes proportions, miscible à de nombreux solvants organiques, l'éthanol ou alcool éthylique, CH₃—CH₂OH.

Annexe 03 . Tableau de lecture de la galerie API Staph

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge *	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLiToI)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites		
PAL	β -naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> jaune	violet
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> incolore-rose pâle	violet-rose
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFfinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl- α D- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl- α D- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
<u>ADH</u>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

Annexe 04 . Interface du logiciel d'identification API Excel.

taxon (1).xlsx																														
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	
2	résultats															Proba	typicité	Incompa	Test sur proba	Test sur typicité	BUG : pb :									
3	1	Staphylococcus chromogenes														0.499	0.52	0	Bonne Id	TB typicité	.									
4	2	Staphylococcus aureus														0.421	0.22	0	Bonne Id	mauvaise typicité	.									
5	3	Staphylococcus hominis														0.066	0.58	0	mauvaise identif	TB typicité	.									
6	4	Staphylococcus epidermidis														0.005	0.26	0	mauvaise identif	Bonne typicité	.									
7	5	Staphylococcus lugdunensis														0.003	0.18	0	mauvaise identif	mauvaise typicité	.									
8																														
9	API 20 Staph v4.1	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR	class ement	P(taxo n/ profil)	P(tax on/ profil)	P(plus typique)	T	taxo ns			
10	profil	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	?						####				
11	Staphylococcus aureus	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0	2	3.9E+34	42.1%	2.0E+39	0.22	0	Staphylococ		
12	Staphylococcus auricularis	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0	12	5.7E+30	0.0%	1.2E+39	###	1	Staphylococ		
13	Staphylococcus epidermidis	100	80	80	73	22	7	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0	8	4.9E+31	0.1%	3.6E+38	-0.14	0	Staphylococ		
32 strept v3.0		API 20 Staph v4.1					Id 32 Staph v2.1					API NH v3.0					API Listeria v1.2					API Coryne v2.1					API C			

Annexes 05. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus spp.*

Antibiotiques testés	Charge de disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)	
		résistant	intermédiaire	sensible	résistant	Sensible
<u>β-Lactamines</u> Peniciline	10 UI	≤28	---	≥29	βLactamase	≤0,12
Oxaciline** - <i>S.aureus</i>	1µg	≤10	11 - 12	≥13	≥4	≤2
- <i>Staphylocoque coagulæ</i> Négative***		≤17	---	≥18	≥0,5	≤0,25
Cefoxitine - <i>S.aureus</i> et <i>S. lugdunensis</i>	30µg	≤19	---	≥20		
- <i>Staphylocoque</i> à coagulase négative		≤24	---	≥25		
<u>Aminosides</u> Gentamicine	10µg	≤12	13 – 14	≥15	≥8	≤4
Amikacine	30µg	≤14	15 – 16	≥17	≥32	≤16
Kanamycine	30µg	≤13	14 - 17	≥18	≥25	≤6
<u>Macrolides</u> Erythromycine	15µg	≤13	14 – 22	≥23	≥8	≤0.5
Clindamycine	2µg	≤14	15 – 20	≥21	≥4	≤0,5
<u>Glycopeptides</u> Vancomycine	30µg	---	---	≥15	---	≤2
Teicoplanine	30µg	≤10	11 - 13	≥14	≥32	≤8
<u>Quinolones</u> Ofloxacine	5µg	≤14	15 - 17	≥18	≥4	≤1
<u>Autres</u> Triméthoprime + sulfaméthazole	1.25/23.75 µg	≤10	11 - 15	≥16	≥8/152	≤2/38
Rifampicine	5µg	≤16	17 - 19	≥20	≥4	≤1
Tétracycline	30µg	≤14	15 – 18	≥19	≥16	≤4
Chloramphénicol	30µg	≤12	13 – 17	≥18	≥32	≤8

Tableau extrait du document m 100 – s16 vol. 26, n°3. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; sixteenth informational supplement .

** incubé pendant 24h.

*** autre que *s. lugdunensis*

Nom : BELAIDI Prénom : Khawla
Nom : DERNANI Prénom : Aicha

Date de soutenance : 28 /06/2015

MASTER : FILIERE : Biologie
OPTION: Microbiologie générale

Occurrence et profil d'antibiorésistance des *Staphylococcus* isolés du lait de vache cru

Résumé

Nous avons mené une étude microbiologique de lait de vache cru collecté à partir d'une ferme traditionnelle de la wilaya de Khenchela pendant le mois de Mars en utilisant des méthodes normalisées pour l'isolement et l'identification des microorganismes. L'analyse effectuée a porté principalement sur la recherche des germes pathogènes appartenant au genre *Staphylococcus*

Les résultats obtenus montrent que 76% des isolats sont des staphylocoques à coagulase négatifs et 24% des isolats sont à coagulase positif.

Au total 8 espèces différentes de *Staphylococcus* ont été identifiées à partir de notre échantillon de lait cru. Elles sont majoritairement représentées par *Staphylococcus hominis* avec un nombre de **09** soit **36%** des espèces, suivi par *Staphylococcus aureus* avec un pourcentage de **24%**, **8%** pour *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus warneri* (**02**), *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus epidermidis* avec un pourcentage de **4 %** chacun et **12%** des espèces appartiennent au genre *Micrococcus*.

Les résultats de l'antibiogramme montrent que les bactéries présentent des profils inquiétants de résistance surtout aux bêtalactamines et les macrolides. Les bactéries testées montrent une résistance majoritaire pour Pénicilline et Oxacilline (**100%**)

Pour les macrolides; les espèces étudiées de *Staphylococcus* ont présenté un taux de **100%** de résistance à la l'Erytromycine, **95.65%** à la Clindamycine et la Pristinamycine. La Vancomycine est active sur la totalité des espèces.

Les résultats ont aussi montré un profil de multirésistance alarmant

Mots clés : Lait cru, Analyse microbiologique, Staphylococcus aureus, Antibiorésistance.

Devant le jury

Président : Mr ABAIDIA A. (M.A.A)

Encadreur : M^{lle} CHORFI K. (M.A.A)

Examineur : Mr BOUSSAA A. (M.A.A)

Université Abbès Laghrour – Khenchela

Université Abbès Laghrour – Khenchela

Université Abbès Laghrour – Khenchela