

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du thème :

Détection de la formation de biofilm sur le matériel de traite de lait

Présenté par : Mr **GHOZAL Mohamed Fouad**

Mr **SEKRANE Abderrahmane**

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : **Mme** Dr Bousmaha-Marroki Leila (M.C.A/ UDL/SBA)

Examineur : **Mme** Dr Zemri Khalida (M.C.A/ UDL/SBA)

Promoteur : **Mr** Dr Marroki Ahmed (M.C.A/ UDL/SBA)

Année universitaire 2020 - 2021

Session : « Juin »

Remerciement

Avant toute chose, nous tenons à remercier **ALLAH** le tout puissant, pour nous avoir donné la santé, la patience, le courage et la volonté de continuer nos études, et effectuer ce modeste travail.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à **Dr.Marroki** en tant qu'encadreur de ce mémoire, il nous a guidé dans la conduite de ce travail et nous a aidé à trouver des solutions pour avancer, nous tenons à le remercier également pour sa patience et sa disponibilité tout au long de ce mémoire.

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation durant cette année d'étude. Leurs conseils riches d'enseignements et leurs encouragements, nous leur adresse nos sentiments respectueusement reconnaissant pour tout le savoir qu'ils nous ont prodigués.

Vifs remerciement

Nous remercions à **Mr.Mustafa Selouani** qui nous a aidés dans la partie expérimentale

Nous remercions nos amis et camarades de notre promotion 2021 pour cette année passée ensemble.

Merci à ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

Dédicace (1)

Avec l'aide de **Dieu** le tout puissant clément et miséricordieux, j'ai pu accomplir ce travail que je dédie :

A mes très chers, respectueux et magnifiques parents qui m'ont protégés et soutenus depuis mon premier cri de vie et m'aider pour réaliser mon rêve.

La plus chère à mon cœur à **ma mère**, pour tous les sacrifices qu'elle me contente, toute la confiance qu'elle m'accorde et tout l'amour dont elle m'entoure, que Dieu la protège et la garde en bon santé

A mon **cher père**, pour son soutien immense qu'il n'a cessé de m'apporter ainsi que les conseils qu'il m'a prodigué sans lesquels j'avoue je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui, je souhaite qu'il est fier de moi et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie, que Dieu le garde.

Je tiens à les remercier profondément pour leur amour et leurs sacrifices.

A ma petite, ma seule et unique sœur « **Ikhlas** » qui toujours près de moi, et que je la souhaite tout le bonheur et la réussite dans sa vie.

Ames chers frères « **Younes, Mouataez Billeh** »

Ames collègues du travail et spécialement « **Dr.Nabil et Dr.Mounia** »

A mon binôme et mon ami que je considère comme frère « **Fouad** »

A mon jolie amie proche « **Houda** » je te souhaite une belle vie plein de joie.

A mes amis et mes collègues de l'étude «**Amine, Oussama, Ramy, Hmaza**»

A toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé durant le long dèmes d'étude.

Abderrahmane.✍

Sommaire

Page

Remerciements

Dédicaces

Résumé en français

Résumé en anglais

Résumé en arabe

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction1

Etude bibliographique :

Chapitre I : Développement de Biofilms sur les Matériaux de Traite3

I.1. Introduction3

I.2. Définition d'un biofilm3

I.3. Les étapes de développement de biofilm4

3.1. Conditionnement et transport4

3.2. Adhésion5

3.3. Croissance5

3.4. Maturation5

3.5. Détachement / dispersion de cellules6

I.4. Facteurs influençant la formation de biofilm6

4.1. Facteurs liés aux microorganismes6

4.2. Facteurs liés à la surface8

4.3. Facteurs environnementaux8

I.5. Méthodes d'étude de biofilm10

5.1. Méthode du rouge Congo agar (RCA)10

5.2. Etude de la formation du biofilm par la méthode *in vitro* de coloration au cristal violet sur microplaques (TCP)10

5.3. Méthode en tube (TM)10

I.6. Biofilm dans les matériaux des traites11

Chapitre II : traite de lait ; matériels et risques	13
II.1. Introduction	13
II.2. Les méthodes de traites	13
2.1. Traite manuelle	13
2.2. Traite mécanique	13
II.3. Sources d'agents pathogènes	15
3.1. Milieu ou environnement	15
3.2. Les personnes de traits	15
II.4. Les détergents et méthodes de nettoyage	16
4.1. Les facteurs de nettoyage	16
4.2. L'eau	16
4.3. Exemple d'autre produit de nettoyage	17
II.5. Les mammites : généralités et pathologie	17
5.1. Définition	17
5.2. Différents types de mammites	17
5.3. Anatomie des glandes mamelles	21
5.4. Les mécanismes des défenses des glandes mamelles	24
5.5. Pathogénie	25
5.6. Diagnostic et traitement des mammites chez les bovins	27
II.6. Relation entre matériaux de traites, biofilm et mammite	29
6.1. Les facteurs d'apparitions des germes de biofilm	29
6.2. Les germes existants dans la machine à traire	29
<u>Etude expérimentale :</u>	
I. Matériels et méthodes.....	30
I.1. Origine et provenance des échantillons	30
I.2. Préparation des prélèvements	31
I.3. Préparation et Enrichissement des échantillons	31
I.4. L'ensemencement et isolement en milieux solides	32
I.5. Identification phénotypique des isolats	33
5.1. Etude de l'aspect macroscopique des isolats	33
5.2. Etude de l'aspect microscopique des isolats	33
5.3. Test catalase	35

I.6. Détection de la formatrice des biofilms par souches	36
6.1. Détection de biofilm par la Méthode Gélose Rouge Congo (RCA)	36
6.2. Détection de biofilm par la technique de coloration au Cristal violet	37
II. Résultats et discussion	42
II.1. Caractérisation de l'aspect macroscopique des colonies	42
II.2. Identification des souches isolées	44
2.1. Aspect macroscopique et microscopique des isolats	45
II.3. Résultats Galeries API	49
II.4. Résultats des souches formatrices des biofilms	51
4.1. La Méthode de culture sur Gélose Rouge Congo (RCA)	51
4.2. La technique de coloration au Cristal violet	52
II.5. Répartition des souches formatrices de biofilm par échantillons	57
5.1. Interprétations des résultats	58
5.2. Etude Comparatif	60
Conclusion	62
Références bibliographiques	
Les annexes	

Listes des figures

	Page
Figure 1 : Biofilm sur matériel à traite	3
Figure 2 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien	4
Figure 3 : Machine à traire semi-automatique	11
Figure 4 : Schéma d'un faisceau trayeur d'une machine à traire	11
Figure 5 : traite manuelle	13
Figure 6 : La machine à traire ou trayeuse	14
Figure 7 : salle de traite	14
Figure 8 : Robot de traite	15
Figure 9 : mammite gangreneuse : la modification de couleur peut évoluer rapidement. Elle n'a pas de valeur pronostic	19
Figure 10 : Mammite d'été ou mammite purulente : les quatre quartiers sont atteints, ce qui n'est pas fréquent. Cette mammite atteint les génisses et les vaches taries	19
Figure 11 : mammite à <i>Nocardia</i> astéroïdes ou chronique	20
Figure 12 : Mammite colibacillaire : le quartier est très enflé. À ce stade, la perte du quartier est inéluctable	20
Figure 13 : Les différents tissus qui soutiennent la mamelle	22
Figure 14 : les différentes structures internes de la mamelle	22
Figure 15 : Les différentes structures du canal du trayon	23
Figure 16 : Coupe d'un trayon : le canal du trayon est étroit et court ; il occupe uniquement l'extrémité du trayon, ce qui le rend très fragile	24
Figure 17 : transfert des bactéries responsables des mammites, les unes sont d'origine mammaire, les autres viennent de l'environnement	25
Figure 18 : traitement local des mammites	28
Figure 19 : Echantillon 1 (E1YB)	30
Figure 20 : Échantillon 2 (E2HB1)	30
Figure 21 : Échantillon 3 (E2HB2)	30
Figure 22 : Échantillon 4(E3ZZ)	31
Figure 23 : Echantillon 5 (E4FB)	31
Figure 24 : Echantillons dans un endroit stérile	31

Figure 25 : Préparation d'échantillon 3 E3ZZ	32
Figure 26 : Préparation des milieux de culture utilisée pour l'isolement des microorganismes	32
Figure 27 : ensemencement en stries par épuisement sur trois secteurs ou cadrans	33
Figure 28 : Les étapes de la coloration de Gram	35
Figure 29 : Répartition et ensemencement de la gélose Rouge Congo	37
Figure 30 : Préparation des cultures, coloration au Cristal violet pour et mesure de la DO ..	38
Figure 31 : 03 microplaques à 96 puits (Bacil G+, Bacil G- et Cocci G-) avant l'incubation ...	39
Figure 32 : 03 microplaques à 96 puits (Bacil G+, Bacil G- et Cocci G-) après incubation	39
Figure 33 : 03 microplaques à 96 puits (Bacil G+, Bacil G- et Cocci G-) après coloration	40
Figure 34 : microplaques à 96 puits après lavage	40
Figure 35 : puits remplis avec l'acide acétique	40
Figure 36 : mesure de la DO de chaque souche	41
Figure 37 : Préparation des API (API20 strep) de la souche EHB1 C1 BN	41
Figure 38 : Préparation des API (API20 strep) de la souche EY B1	41
Figure 39 : Préparation des API (API20E) de la souche EZZ3 RN2	41
Figure 40 : Cultures bactériennes et enrichissement sur milieux liquides	42
Figure 41 : Aspect des colonies sur différents milieux de culture	42
Figure 42 : Bacille Gram Négatif.....	46
Figure 43 : Bacille Gram Positif.....	46
Figure 44 : Cocci Gram Positif.....	46
Figure 45 : Distribution des souches étudiées par échantillon.....	47
Figure 46 : Distribution des Cocci G+ souches étudiées par échantillon.....	48
Figure 47 : Distribution des bacillus G + étudiées par échantillon.....	48
Figure 48 : Distribution des bacillus G - étudiées par échantillon.....	48
Figure 49 : Lecture de résultat d'API (API20 strep) de la souche E2HB1C1N et E1YBB1.....	50
Figure 50 : Lecture de résultat d'API (API20 E) de la souche E3ZZ RN2.....	50
Figure 51 : formation de biofilm sur milieu RCA.....	51
Figure 52 : biofilm formé dans les tubes à essai (les résultats de 3 catégories étudiées).....	52
Figure 53 : Résultat de formation de film par des bacilles à Gram négatif.....	53
Figure 54 : Résultat de formation de biofilm par les bacilles Gram positif.....	54
Figure 55 : Résultat de formation de biofilm par des coques à Gram positif.....	54

Figure 56 : biofilm formé dans les microplaques à 96 puits.....	55
Figure 57 : Résultat de formation de film par des bacilles à Gram négatif.....	55
Figure 58 : Résultat de formation de biofilm par les bacilles Gram positif.....	56
Figure 59 : Résultat de formation de biofilm par des cocci à Gram positif.....	56
Figure 60 : Répartition des souches bacille Gram négatif formatrice par échantillons.....	57
Figure 61 : Répartition des souches bacille Gram positif formatrice par échantillons.....	57
Figure 62 : Répartition des souches cocci Gram positif formatrice par échantillons.....	58
Figure 63 : classification des souches formatrices de biofilm (la méthode des tubes).....	59
Figure 64 : classification des souches formatrices de biofilm (la méthode de microplaque)...	60

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm	9
Tableau 2 : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP.....	10
Tableau 3 : Les principaux réservoirs d'agents pathogènes pour la mamelle	27
Tableau 4 : Répartition (en %) des différents types cellulaires dans le lait de vache en l'absence et en présence d'infection mammaire	27
Tableau 5 : Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E1YB	43
Tableau 6 : Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E2HB1	43
Tableau 7 : Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E2HB2.....	43
Tableau 8 : Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E3ZZ.....	44
Tableau 9 : Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E4FB.....	44
Tableau 10 : répartition des souches étudiées par échantillon selon leur aspect macroscopique et microscopiques.....	45
Tableau 11 : Résultats récapitulatif de la répartition des 30 souches testées pour la formation de biofilm durant cette étude	47
Tableau 12 : Lectures des API	50
Tableau 13 : résultat de DO des souches bacille Gram négatif testées	53
Tableau 14 : Résultat obtenu de la DO des bacilles à Gram positif	53
Tableau 15 : DO des souches cocci Gram positif	54
Tableau 16 : DO des souches bacille Gram négatif	55
Tableau 17 : DO des souches bacille Gram positif	56
Tableau 18 : DO des souches cocci Gram positif.....	56
Tableau 19 : Pourcentage des souches bacille Gram négatif formatrice par échantillons	57
Tableau 20 : Pourcentage des souches bacille Gram positif formatrice par échantillons	57
Tableau 21 : Pourcentage des souches cocci Gram positif formatrice par échantillons	58
Tableau 22 : La Moyenne des DO des 03 catégories	58
Tableau 23 : classification des souches formatrices de biofilm (la méthode des tubes)	59
Tableau 24 : classification des souches formatrices de biofilm (La méthode de microplaque).59	59

Liste des abréviations

EPS : Extra Polymeric Substance.

MATS : Microbial adhesion to solvent.

RCA : Rouge Congo Agar.

TCP : technique coloration au cristal violet sur microplaques.

TM : Méthode en tube.

PBS : Phosphate Buffer Saline.

MAT : machine à traire.

CMT : California Mastitis Test.

Kg : kilogramme.

ML : millilitre.

Cm : centimètre.

PCR : Polymérase Chaine Réaction.

BN : bouillon nutritif.

BHIB : Cœur Cervelle

MRS : bouillon Man, Rogosa, Sharpe.

N : Gélose nutritif.

C : Gélose Chapman.

K : Gélose Mac Conkey.

RN : MRS (pH=6,5).

RA : MRS (pH = 5,5).

BG- : Bacille Gram négatif.

BG+ : Bacille Gram positif.

CG+ : Cocci Gram positif.

CV : cristal violet.

DO : densité optique.

P : puits.

Nm : Nanomètre.

SCN : staphylocoques coagulase négative.

Résumé

De multiples facteurs peuvent entraîner l'apparition de mammites dans les élevages (on parle de maladies multifactorielles), c'est pourquoi il est parfois difficile d'en identifier les causes. Dans certaines conditions, la traite mécanique est en effet responsable de la contamination active du pis. La machine à traire joue alors un rôle infectant très important.

Notre projet d'étude a pour objectif de mettre en évidence et identifier les germes responsables dans la formation de biofilm dans la machine à traire dans les fermes choisies pour la réalisation de cette étude, et aussi de savoir, si elles sont également impliquées dans l'apparition de l'infection de la mammite.

Dans le présent travail, 05 échantillons ont été prélevés sur des machines à triaires au niveau de (04 fermes) situées à la Daira de Ben Badis wilaya de Sidi bel bbès. Au total cinquante et une (51) souches ont été isolées dont trente (30) souches ont été sélectionnées pour la réalisation de cette étude. Le criblage de la formation de biofilms par les souches a été réalisé par la mise en application de deux techniques : la Méthode Gélose Rouge Congo (RCA) et la détection de biofilm par la technique de coloration au Cristal violet sur tubes à essai en verre et microplaque en le polystyrène.

Le résultat de l'identification macro et microscopique de 30 souches étudiées sont classées comme des bacilles à Gram négatif dix (10) souches, dix (10) isolats comme bacilles à Gram positif et enfin dix (10) souches sont classées comme des coques à Gram positif. Le résultat de la détection de la formation de biofilm a montré que 92.59 % sont fortement formatrices de biofilms sur le verre et également sur le polystyrène (microplaque).

Les résultats de l'étude ont montré également que plusieurs espèces et genres bactériens, qui peuvent coloniser ou contaminer une machine à traire mal entretenue, sont capables de former des biofilms sur des surfaces abiotiques et contaminent l'extrémité du trayon, en adhérant à sa peau ou à la couche de kératine du canal, d'ailleurs c'est leur mode de vie préférable. Les germes sont injectés activement par une force physique.

Pour irradier ou lutter contre ce problème au niveau des fermes au niveau local et national, un programme de sensibilisation et formation de nos éleveurs en matières de l'effet et l'impact de ce problème sur la santé des bovins et le citoyen, et sur le rendement laitier ainsi que sur l'économie national. Aussi, une formation contenue doit être tracée par l'autorité publique à savoir le ministère de l'agriculture en matière d'hygiène et sécurité sanitaire vis-à-vis des éleveurs.

Mots clés : biofilm, matériel de traite, lait, mammite.

Abstract

Many factors can lead to the appearance of mastitis in farms (we speak of multifactorial diseases), which is why it is sometimes difficult to identify the causes. Under certain conditions, mechanical milking is indeed responsible for the active contamination of the udder. The milking machine then plays a very important infectious role.

Our study project aims to highlight and identify the germs responsible in the formation of biofilm in the milking machine in the farms chosen for the realization of this study, and also to know, if they are also involved in the onset of mastitis infection.

In the present work, 05 samples were taken on sorting machines at the level of (04 farms) located at the Daïra of Ben Badis wilaya of Sidi bel bbès. A total of fifty-one (51) strains were isolated, of which thirty (30) strains were selected for this study. The screening of the formation of biofilms by the strains was carried out by the application of two techniques: the Congo Red Agar Method (RCA) and the detection of biofilm by the crystal violet staining technique on glass test tubes and polystyrene microplate.

The result of the macro and microscopic identification of 30 strains studied are classified as Gram-negative bacilli ten (10) strains, ten (10) isolates as Gram-positive bacilli and finally ten (10) strains are classified as cockles with Gram positive. The result of the detection of biofilm formation showed that 92.59% are highly biofilm-forming on glass and also on polystyrene (microplate).

The results of the study also showed that several bacterial species and genera, which can colonize or contaminate a poorly maintained milking machine, are able to form biofilms on abiotic surfaces and contaminate the end of the teat, adhering to its skin or the keratin layer of the channel, moreover it is their preferable way of life. Germs are actively injected by physical force.

To irradiate or fight against this problem at the farm level at the local and national level, an awareness and training program for our breeders in terms of the effect and impact of this problem on the health of cattle and the citizen, and on milk yield as well as the national economy. Also, a contained training must be traced by the public authority, namely the Ministry of Agriculture in matters of hygiene and health safety vis-à-vis breeders.

Keywords : biofilm, milking equipment, milk, mastitis.

ملخص

يمكن أن تؤدي العديد من العوامل إلى ظهور التهاب الضرع في المزارع (نتحدث عن أمراض متعددة العوامل) ، ولهذا يصعب أحياناً تحديد الأسباب. في ظل ظروف معينة ، يكون الحلب الميكانيكي مسؤولاً بالفعل عن التلوث النشط للضرع. إذا تلعب آلة الحلب دوراً معدياً مهماً جداً.

يهدف مشروع دراستنا إلى تسليط الضوء على الجراثيم المسؤولة عن تكوين الأغشية الحيوية في آلة الحلب في المزارع المختارة لتحقيق هذه الدراسة والتعرف عليها ، وكذلك معرفة ما إذا كانت تشارك أيضاً في ظهور عدوى التهاب الضرع.

في هذا العمل تم أخذ 05 عينات على مكائن الحلب على مستوى (04 مزارع) بدائرة بن باديس بولاية سيدي بلعباس. تم عزل ما مجموعه واحد وخمسون (51) سلالة ، تم اختيار ثلاثين (30) منها لهذه الدراسة. تم إجراء فحص تكوين الأغشية الحيوية بواسطة السلالات من خلال تطبيق تقنيتين : طريقة كونغو ريد أجار واكتشاف الأغشية الحيوية بتقنية تلوين الكريستال البنفسجي على أنابيب اختبار الزجاج وشفافة البوليسترين الدقيقة.

تم تصنيف نتيجة التحديد الكلي والمجهري لـ 30 سلالة تمت دراستها على أنها عصيات سالبة الجرام عشر (10) سلالات ، وعشر (10) عزلات على أنها عصيات موجبة الجرام ، وأخيراً تم تصنيف عشر (10) سلالات على أنها مكورات موجبة الجرام. أظهرت نتيجة الكشف عن تكوين الأغشية الحيوية أن 92.59٪ من الأغشية الحيوية عالية التكوين على الزجاج وكذلك على البوليسترين (شفافة ميكروسكوبية).

أظهرت نتائج الدراسة أيضاً أن العديد من الأنواع والأجناس البكتيرية ، التي يمكن أن تستعمر أو تلوث آلة الحلب سيئة الصيانة ، قادرة على تكوين أغشية حيوية على الأسطح اللاحيائية وتلوث نهاية الحلمة ، والالتصاق بجلدها أو طبقة الكيراتين من القناة ، علاوة على ذلك ، هي طريقة حياتهم المفضلة. يتم حقن الجراثيم بنشاط بالقوة الجسدية.

لإشعاع أو محاربة هذه المشكلة على مستوى المزرعة على المستوى المحلي والوطني ، برنامج توعية وتدريب لمربينا من حيث تأثير وتأثير هذه المشكلة على صحة الماشية والمواطن ، وعلى إنتاجية الحليب. وكذلك الاقتصاد الوطني. أيضاً ، يجب تتبع التدريب المحتوي من قبل السلطة العامة وهي وزارة الزراعة في مسائل النظافة والسلامة الصحية تجاه المربين.

الكلمات المفتاحية : الأغشية الحيوية ، معدات الحلب ، الحليب ، التهاب الضرع.

Introduction générale

Le métier des éleveurs et producteurs laitiers, c'est d'abord de produire des aliments. Ils cherchent à assurer la sécurité sanitaire et la qualité du lait pour que cette matière première satisfasse les attentes de l'industrie alimentaire et des consommateurs. Les pratiques en élevage laitier devraient assurer la production de lait par des animaux en bonne santé, dans des bonnes conditions d'élevage et dans le respect de l'environnement immédiat. Il faut que l'éleveur laitier s'assure les bonnes pratiques agricoles ainsi que de bonnes pratiques d'hygiène et d'élevage sont mises en œuvre sur sa ferme. L'objectif devrait être de prévenir les éventuels problèmes liés aux maladies infectieuses plutôt que d'avoir à les résoudre (**Morgan, 2004**). Les maladies infectieuses le plus fréquent chez les éleveurs de vaches laitières sont les mammites, dues aux traites mécaniques, sources de pertes économiques dues essentiellement au coût du traitement, aux réformes de vaches incurables et aux pertes de production laitière (**Bouaziz et al., 2002**).

Suite à l'envahissement des quartiers par les micro-organismes, l'infection se traduit parfois par des signes cliniques locaux et parfois aussi par des signes généraux. Ces mammites sont dites mammites cliniques, mais le plus souvent l'infection passe inaperçue et les mammites sont dites subcliniques ; elles sont détectées lors du contrôle laitier par le comptage cellulaire (**Fetrow, 1988**). Plusieurs facteurs influencent la contamination bactérienne, lesquelles la formation de biofilms à la surface de l'équipement de traite, cet attachement est une stratégie de survie qui permet aux microorganismes de s'installer et de coloniser une grande surface sur l'équipement de traite, cette contamination peut conduire l'apparition des maladies infectieuses comme les mammites de diverses types.

Les animaux producteurs de lait doivent être en bonne santé, et un programme efficace de soins vétérinaires devrait être en place. La traite est à elle seule l'activité la plus importante sur la ferme laitière. Les consommateurs exigent des normes rigoureuses pour la qualité du lait. L'utilisation des bonnes méthodes de traite vise à réduire au minimum la contamination microbienne y compris la couverture tous les aspects du processus d'obtention de lait de vache, de façon rapide et efficace, tout en assurant la santé des vaches et la qualité du lait.

Dans le cas où ces conditions d'hygiène ne sont pas appliquées, certains problèmes de santé apparentent, soit chez l'homme par la consommation des produits contaminés peut transmettre des maladies d'origine microbienne et développe la toxi-infection alimentaires, soit chez l'animal notamment les mammites.

L'objectif de notre étude est d'identifier les microorganismes responsables de la formation de biofilm sur les matériaux de traite du lait chez les éleveurs de bovins au niveau de la wilaya de Sidi Bel Abbès. L'éventuel relation entre la formation de biofilm et le développement de mammite chez les vaches et évaluer dans cette étudié.

I.1.Introduction

Le matériel de traite, c'est l'idéal pour les microorganismes : il leur offre un support, mais aussi de la nourriture. Et une fois le biofilm installé, il relègue ponctuellement des germes dans le lait, ce qui peut induire à des problèmes de qualité, ainsi que des problèmes pour la santé chez l'animal.

Les biofilms se forment souvent sur les surfaces du matériel de production, causant des dommages aux équipements et posant un risque de contamination pour les aliments, et infection pour les animaux (**Wang, B et al., 2019**). A la production, le lait obtenu contient toujours des microorganismes dont le nombre et le type d'espèces sont très variables. La présence inévitable de ces germes est liée à la propriété du trayeur et de l'animal notamment de la peau de la mamelle, à l'état du milieu ambiant (poussières, insectes, etc.) et en grand pourcentage à la propreté du matériel de traite et de récolte du lait qui présente des biofilms sur sa surface (**Weber, F. 1985**).

I.2. Définition d'un biofilm

Un biofilm est un ensemble de microorganismes d'une même ou de plusieurs espèces qui sont attachées à une surface vivante ou inerte pour s'y développer (**figure 1**), on parle alors de communautés microbiennes sessiles (**Goetzi et al., 2016**). Ces microorganismes établissent une forte relation d'adhésion par la synthèse de substances polymériques extracellulaires en formant une matrice (**Costerton et al., 1978**). Les polymères extracellulaires ou EPS (Extra Polymeric Substance) sécrétés renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et des acides nucléiques.

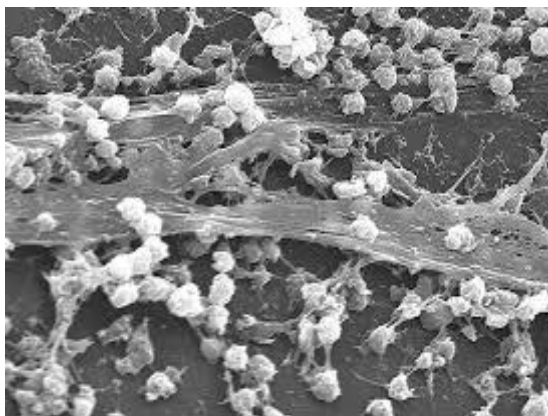


Figure 1. Biofilm sur matériel à traite

(<https://pixnio.com/fr/science-fr/microscopie-images/staphylococcus-aureus-fr/biofilm-formation-lumen-inhabitation-matériel-à-traite-secretees-staphylococcus-aureus-les-bacteries>)

Les biofilms sont présents dans toutes les niches écologiques et colonisent des surfaces très diverses, biotiques ou/et abiotiques, telles que les muqueuses, les sols, les sédiments, les minéraux, les métaux, etc., (Roux et Ghigo, 2006), ils sont fréquemment identifiés comme étant une source de lourds problèmes industriels, ainsi la contamination des surfaces, des installations et des dispositifs, par ces biofilms dans les secteurs agroalimentaires et hospitaliers constitue un véritable enjeu de santé publique (Bridier et al., 2011).

I.3. Les étapes de développement de biofilm

On distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms comme il est présenté sur la (figure 02).

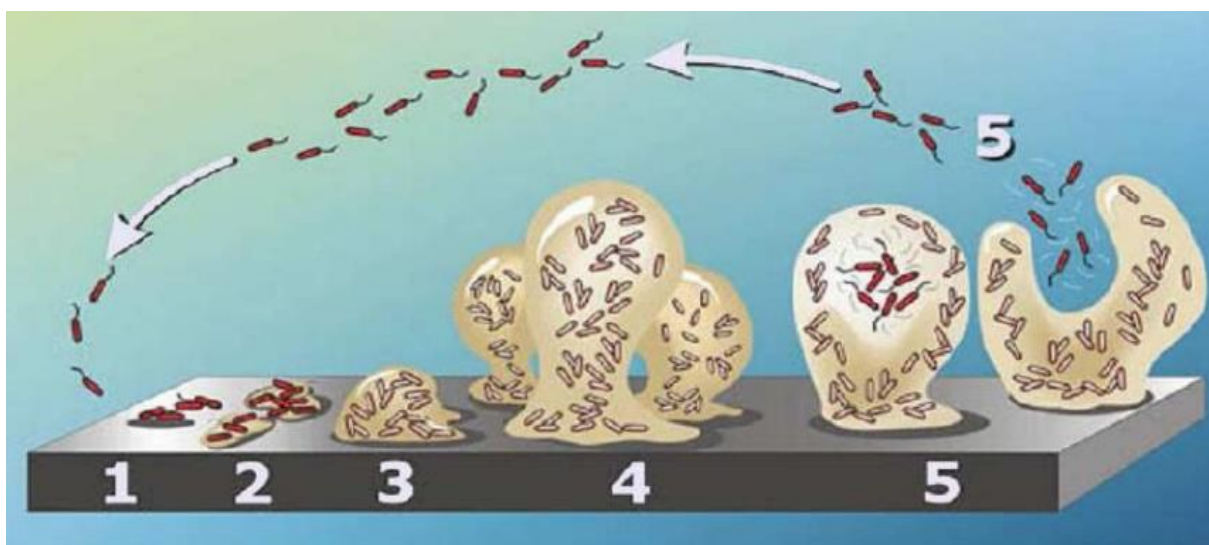


Figure 2. Etapes de formation d'un biofilm bactérien (Stoodley et al., 2002)

(1). Conditionnement et transport

La 1^{ère} étape est l'établissement d'un film primaire conditionnant la surface et facilitant l'attachement des bactéries. C'est un phénomène rapide n'excédant pas quelques heures. Durant cette première phase, les molécules organiques et inorganiques présentes dans le milieu se déposent sur la surface. Cette accumulation de molécules à l'interface liquide/solide définit le film de conditionnement et apporte une plus grande concentration en nutriments sur la surface par rapport au milieu liquide. L'adsorption de ces molécules joue un rôle important dans l'attachement des bactéries à une surface par l'altération des propriétés physicochimiques de la surface (Klein et al., 2011). Les interactions entre les bactéries et le support nécessitent un rapprochement d'environ 50 nm tel que exprimé dans les théories de l'adhésion (Malek, 2013). Les microorganismes peuvent se déplacer vers le support par un mouvement brownien, menant à une sédimentation due à la force de gravité s'exerçant sur tous les corps (Kumar et Anand, 1998), par des mouvements de convection du milieu

amenant physiquement les bactéries vers une surface (**Klein et al., 2011**) et/ou par le déplacement des bactéries grâce à des appareils locomoteurs (pili, flagelles) vers des substances nutritives (chimiotactisme) (**Davies, 2000**).

(2). Adhésion

Cette étape est subdivisée en deux parties :

- **Réversible** : c'est l'adsorption réversible et non-spécifique des bactéries à une surface. L'attachement primaire à une surface est sous l'influence de nombreux acteurs : pH, osmolarité du milieu, température, l'hydrodynamique de fluide, etc., (**Beloin et al., 2008**). Il fait intervenir principalement des processus physiques de type van der Waals, électrostatique, interactions hydrophobes et acide-base de Lewis, dépendant de la nature du support et de son conditionnement (**Labadie, 2001**).

- **Irréversible** : c'est la fixation active et spécifique des microorganismes sur une surface. Les structures d'adhésion varient selon les types de microorganismes concernés. Pour les bactéries à Gram négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries à Gram positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. Ces exopolymères permettent de maintenir le biofilm assemblé tout en le protégeant contre les biocides et certaines conditions de vie défavorables (hautes températures, séchage). En plus, il agit comme un système d'échange d'ions afin de concentrer les nutriments pour la multiplication des cellules (**Dreeszen, 2003**). Dans cette étape, les interactions mises en jeu sont de types ioniques, hydrogènes, covalentes et hydrophobes (**Kumar et Anand, 1998**).

(3). Croissance

Cette étape est caractérisée par le début de la croissance microbienne et l'évolution de la formation du biofilm avec le développement des micro-colonies primaires composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation (**Simain-Sato et al., 2010 ; Lebeaux et Ghigo, 2012**)

(4). Maturation

Elle correspond au développement des micro-colonies et à la structuration du biofilm, les micro-colonies se développent en piliers d'épaisseur variable au sein desquels les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces séparant les micro-colonies deviennent des canaux du biofilm permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke**

et al., 2006). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présents dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments (**Jacobsen et al., 2008**). À ce stade, l'incorporation des bactéries d'espèces différentes ou d'autres microorganismes mène à la formation de biofilms polymicrobiens ou mixtes. Le biofilm mature représente une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différents (**Simain-Sato et al., 2010 ; Lebeaux et Ghigo, 2012**)

(5). Détachement / dispersion de cellules

Le biofilm mature peut connaître une phase de dispersion, libérant des bactéries isolées ou des fragments de biofilms qui pourront, à leur tour, enclencher la formation d'un biofilm sur une autre surface (**Tremblay et al., 2014**). Le détachement des cellules peut être initié par différents facteurs : des perturbations mécaniques (force de cisaillement, abrasion, etc.), la dégradation enzymatique de la matrice polymérique, la dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est fixé, l'induction de la motilité, la production d'agents tensioactifs et le relâchement de l'exopolysaccharide (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

I.4. Facteurs influençant la formation de biofilm

Le conditionnement de la surface, le type du milieu de croissance, la température, le pH, les interactions électrostatiques et physiques entre les cellules bactériennes et la surface, la communication cellule-cellule et la signalisation, sont autant de facteurs qui peuvent influencer l'adhérence bactérienne et le développement ultérieur du biofilm (**Davies et al., 1998 ; Doyle, 2000 ; Gilbert et al., 2002 ; Palmer et al., 2007**). La morphologie des cellules bactériennes joue également un rôle (**Van Loosdrecht et al., 1989 ; Wirtanen et Salo, 2005**)

4.1. Facteurs liés aux microorganismes

L'adhérence des cellules bactériennes à des surfaces est une stratégie essentielle pour leur survie. Quand les biofilms sont formés dans un système aqueux, chaque membre du biofilm a été naturellement choisi par ses propriétés de surface de cellule comprenant la présence des capsules, des fimbriae, et de l'hydrophobicité de la cellule (**Frank, 2001**). L'hydrophobicité de la cellule est due à des composés liés à la membrane externe comprenant des lipopolysaccharides, des lipoprotéines, des acides lipotéichoïques et des lipomannanes. L'orientation de ces composés sur la membrane externe détermine l'hydrophobicité de la cellule (**Neu, 1996**). La plupart des bactéries à Gram négatif ont de longues chaînes de polysaccharides de leur lipopolysaccharides orientées vers l'extérieur de la cellule, donnant

une surface hydrophile tandis que les bactéries à Gram positif ont la partie lipide des acides lipotéichoïques qui se prolonge à l'extérieur de la cellule donnant une surface hydrophobe (**Frank, 2001**).

Quelques bactéries peuvent excréter les substances comprenant les EPS, avant ou après l'attachement, ces EPS affectent l'hydrophobicité de la surface de la cellule. L'excrétion d'un slime de polysaccharide avant l'attachement peut augmenter ou empêcher le procédé d'attachement selon l'hydrophobicité de la surface de cellules après l'excrétion (**Rosenberg et al., 1983**). L'hydrophobicité de la surface des cellules microbiennes peut être évaluée par la chromatographie d'interaction hydrophobe (**Stenstrom, 1989**), l'adhésion microbienne aux hydrocarbures (**Rosenberg et al., 1980**) et la mesure d'angle de contact (**Absolom et al., 1983 ; Busscher et al., 1984**). L'hydrophobicité varie également avec la température et le stade de croissance (**Chavant et al., 2002**). En 1998 **Smoot et Pierson** ont montré que l'hydrophobicité augmentait quand la température de croissance diminuait. L'hydrophobicité dépend également du mode de croissance de la bactérie (**Gilbert et al., 1991**) et des conditions de culture (**Spenceley et al., 1992**). Selon **Allion (2004)**. Les résultats du test MATS (Microbial adhesion to solvant) montrent également un impact non négligeable de l'état physique (solide ou liquide) du milieu de culture utilisé sur les propriétés physico-chimiques de surface des souches à Gram positif testées. En accord avec **Ljungh et al. (1985)**, elle a pu noter qu'une croissance en bouillon augmentait significativement le caractère hydrophile des micro-organismes (en comparaison avec les données obtenues après culture sur gélose). La composition chimique des milieux de culture étant proche, les différences de propriétés physico-chimiques de surface observées pourraient donc être attribuées au seul mode de culture utilisé. gélose ou bouillon nutritif. L'hydrophobicité peut également être modifiée par des traitements mécaniques ou enzymatiques (**Rosenberg et Kjelleberg, 1986**).

Plusieurs études ont montré l'importance de la présence des appendices, les interactions impliquées dans la communication de cellule-cellule et la production d'EPS pour la formation et le développement de biofilm (**Davies et al., 1998 ; Sauer et Camper, 2001; Donlan, 2002; Allison, 2003 ; Parsek et Greenberg, 2005**). Il est possible que le flagelle de certaines bactéries puisse former un lien adhésif avec la surface d'adhérence (**Harbron et Kent, 1988**). Les flagelles jouent la fonction primaire dans la formation de biofilm et dans les interactions initiales cellule-surface (**Sauer et Campeur, 2001**). Les bactéries avec pili peuvent adhérer fortement à d'autres cellules bactériennes et à des particules inorganiques (**Harbron et Kent, 1988**), mais n'ont pas impliquées dans le procédé d'attachement

(Characklis et Cooksey, 1983). Selon Sauer et Camper (2001), il est avéré que le pili est important pour l'adhérence et la colonisation des surfaces.

4.2. Facteurs liés à la surface

Les avis varient sur l'effet des caractéristiques des surfaces sur l'adhérence bactériennes. Des travaux ont rapporté une corrélation positive entre l'adhérence et l'augmentation de la rugosité de la surface (Hoffman, 1983; Pedersen, 1990; Leclercq Perlat et Lalande, 1994; Wirtanen et al., 1995). Généralement l'augmentation de la rugosité de la surface affecte la rétention des micro-organismes sur cette surface (Whithead et Verran, 2006)

4.3. Facteurs environnementaux

L'attachement des bactéries à une surface est affecté par la disponibilité et la concentration des nutriments, le pH et la température du milieu (Lappin-Scott et al., 1992). Les micronutriments peuvent fortement influencer le développement du biofilm. Pour des espèces de *Pseudomonas*, le phosphore, l'azote, et le fer peuvent exercer un effet crucial sur la structure de biofilm (Singh et al., 2002 ; Banin et al., 2005 ; Thompson et al., 2005 ; Monds et al., 2007). Une augmentation de vitesse d'écoulement ou de concentration en éléments nutritifs peut augmenter l'attachement, si ces facteurs ne dépassent pas les niveaux critiques (Vieira et al., 1993 ; Stoodley et al., 1999 ; Simões et al., 2007). Le pH et la température du milieu ont également une influence sur le degré d'adhérence des micro-organismes. *P. fragi* a montré une adhérence maximale sur des surfaces d'acier inoxydable à la gamme de pH optimale pour son métabolisme c'est-à-dire des pH de 7 à 8, (Stanley, 1983).

Tableau 01 : Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm
(Donlan, 2002).

Propriétés	Facteurs influençant
Propriétés du substrat (support)	<ul style="list-style-type: none"> • Texture et rugosité : plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante. • Hydrophobicité • Présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface : ceci influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms
Propriétés du milieu aqueux environnant	<ul style="list-style-type: none"> • Vitesse, présence d'un flux laminaire ou non : selon la turbulence, la zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires est appelée zone de fixation, c'est dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer car ils sont peu soumis aux forces exercées par le fluide. • pH : il modifie la charge de surface des microorganismes et celle des supports solides ce qui réduit ou augmente des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion. • Température : lorsqu'elle est importante, elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries et la mobilité cellulaire. • Cations (Ca²⁺, Na²⁺, Fe³⁺...) [Fer], [nutriments]. • Sources de carbone et d'oxygène. • Présence d'agents antimicrobiens.
Propriétés des cellules	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrophobicité de la surface des cellules : l'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. • Présence de fimbriae. • Présence de flagelles. • Rôle des structures Polymériques extracellulaires d'exopolysaccharides.

I.5. Méthodes d'étude de biofilm

Les principales méthodes utilisées » pour mettre en évidence la formation et la production de biofilms sont :

5.1. Méthode du rouge Congo agar (RCA)

La caractérisation phénotypique de la production de biofilm par production de slime a été réalisée par culture des isolats divers souches sur le milieu RCA. Cette technique proposée par **Freeman et al., (1989)**, requiert l'utilisation d'un milieu solide préparé et additionné de 5% de saccharose et de rouge Congo. Le milieu au rouge Congo est ensemencé avec la suspension de la souche bactérienne étudiée et incubé à 37° pendant 24 h à 48h.

5.2. Etude de la formation du biofilm par la méthode *in vitro* de coloration au cristal violet sur microplaques (TCP)

Les microplaques utilisées étaient en polystyrène comportant 96 puits sur lesquelles les bactéries vont adhérer et former un biofilm. La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits a été réalisée selon les recommandations de **Christensen et al. (1985)** avec une durée d'incubation prolongée à 48h.

Tableau 02 : Classification de l'adhérence bactérienne par la technique TCP selon **Mathur et al., (2006)**.

Valeurs DO	Adhérence	Formation de biofilm
< 0,120	non adhérente	Non formatrice
0,120 – 0,240	faiblement adhérente	Faiblement formatrice
> 0.240	fortement adhère	Fortement formatrice

5.3. Méthode en tube (TM)

C'est une technique décrite en 1982 par **Christensen et al.**, qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm. A partir d'une culture jeune de 24h, une colonie est ensemencée dans 10 mL de bouillon supplémenté de 2% de saccharose. Après incubation à 37°C pendant 24h les tubes sont lavés avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH 7,3) puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré avec du cristal violet (0,1%) pendant 15 minutes. Une fois le colorant supprimé, les tubes sont lavés PBS (pH 7.3) et laissés sécher. La formation du biofilm est considérée positive quand un film visible double la paroi et le fond du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm (**Mathur et al., 2006**)

I.6. Biofilm dans les matériaux des traites

L'accumulation de matières organiques dans les machines à traire peuvent créer des conditions appropriées pour la croissance bactérienne et pourraient également aider à la fixation des bactéries en créant un film de conditionnement (**Latorre, et al., 2010**). La machine à traire (MAT) (**figure 3**) est considérée comme vecteur passif de transfert des micro-organismes sur les trayons.



Figure 3. Machine à traire semi-automatique.

De même que les mains du trayeur ou les lavettes collectives, les manchons sont des vecteurs de transmission des germes d'une vache à une autre. Or la décontamination des manchons entre deux vaches s'avère très difficile à réaliser, voire le schéma d'un faisceau trayeur d'une machine à traire (**figure 04**)

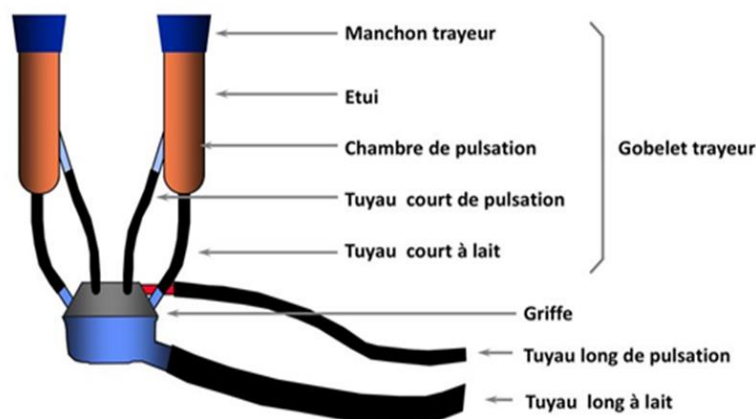


Figure 4. Schéma d'un faisceau trayeur d'une machine à traire (**Poulet, J.L ; 2013**).

II.1. Introduction

Comme tous les mammifères femelles, les vaches produisent du lait. Mais pour ce faire, elles doivent d'abord donner naissance à un veau (on appelle « génisses » les jeunes vaches qui n'ont pas encore vêlé). C'est ce qui déclenche la production de lait dans le pis (ou mamelle) qui est constitué de 4 « quartiers » terminés par 4 « trayons ».

La traite a lieu 2 fois par jour, c'est un moment que les vaches apprécient, car cela soulage leur mamelle remplie de lait. Cependant, il existe plusieurs méthodes de traite de lait.

II.2. Les méthodes de traites

2.1. Traite manuelle :

Elle permet d'extraire le lait de la mamelle des vaches et de quelques autres femelles laitières manuellement, en exerçant une pression sur les trayons du pis.



Figure 05. traite manuelle

(<https://www.crushpixel.com/fr/stock-photo/detail-hands-man-who-milking-597688.html>).

2.2. Traite mécanique

2.2.1. La machine à traire ou trayeuse

Le système est mécanisé et le plus répandu dans la région utilisée dans les petites fermes, mais c'est lui qui va aux vaches et non l'inverse. La machine à traire permet de traire les vaches d'une manière hygiénique, efficace et indolore. Elle peut être utilisée de différentes manières : depuis le début du XIXe siècle, les éleveurs recherchaient un moyen de mécaniser la traite des vaches. Inventée en **1860 par F.C. Colvin**, une machine reproduisant le geste de succion exercée par un veau, réalisant mécaniquement ou électriquement la traite au moyen de gobelets trayeurs s'ajustant sur les trayons et de pots collecteurs recueillant le lait ou de tuyaux dirigeant directement celui-ci dans des bidons (lactoducs).



Figure 06. La machine à traire ou trayeuse
(https://fr.freepik.com/photos-premium/trayeuse-ferme-par-machine-traire_2676602.htm).

2.2.2. Salle de traite

Elles sont moins répandues en Algérie vu le coût d'acquisition. Les machines sont installées dans une salle exclusivement dédiée à cet usage, appelée salle de traite. Les vaches s'y rendent, accompagnées des éleveurs, pour « donner leur lait ». Elle est conçue de manière à optimiser le bien-être des animaux et le confort des éleveurs. Elle permet aussi d'assurer une hygiène optimale de la traite ; c'est fondamental pour assurer la qualité du lait qui est un produit fragile. La machine à traire est parfois installée dans l'étable.



Figure 07. salle de traite
(<https://www.web-agri.fr/traite/article/137021/conseils-pour-bien-concevoir-son-installation-de-traite>)

2.2.3. Robot de traite

Le processus de la traite y est entièrement automatisé. Chaque vache, qui décide d'entrer dans la loge du robot à son rythme (entre 2 et 3 fois par 24 h), est reconnue grâce à un collier électronique et traite selon ses besoins. L'éleveur observe régulièrement ses vaches et analyse attentivement les données fournies par le robot, afin de le régler en fonction des spécificités de chaque animal.

La traite constitue le moment privilégié de contact entre l'éleveur et ses animaux. C'est aussi le moment qui permet à l'éleveur de maîtriser la qualité du lait qu'il produit. Les bonnes pratiques à la traite permettent de limiter la contamination des mamelles des vaches saines par des bactéries pathogènes, d'optimiser l'éjection du lait, de repérer les animaux infectés mais également d'optimiser le temps passé en salle de traite.



Figure 08. Robot de traite

(<https://www.agriexpo.online/fr/prod/lely/product-169577-1285.html>)

II.3. Sources d'agents pathogènes

3.1. Milieu ou environnement

Les auteurs anciens (**Eckles, 1913**), insistaient sur le fait que l'exposition au froid intense, aux courants d'air, à une humidité excessive ou à une chaleur extrême prédisposait à la mammite. L'influence de l'environnement peut être indirecte. Ainsi, la présence de boues après une période de fortes pluies contribue à la multiplication des germes. De même, les fortes chaleurs d'été favorisent la multiplication d'insectes piqueurs.

3.2. Les personnes de traits

Les mains du trayeur seront propres et régulièrement désinfectées pendant la traite. L'emploi de gants en latex a été recommandé. La surface des mains est habituellement rugueuse et le plus souvent contaminée, cette contamination augmentant en cours de traite. A l'inverse la surface lisse des gants est beaucoup plus aisée à désinfecter. L'utilisation de gants est particulièrement indiquée en cas d'infections par les staphylocoques, streptocoques et mycoplasmes. L'emploi des gants ne dispense pas le trayeur de les désinfecter régulièrement en cours de traite (**Ch. Hanzen, 2015-2016**).

II.4. Les détergents et méthodes de nettoyage

Le nettoyage est une étape essentielle dans l'entretien de la MAT et pour l'obtention d'une bonne qualité bactériologique du lait. Il permet d'éliminer les souillures qui se sont déposées pendant la traite. Cette étape doit être réalisées immédiatement après la traite car lorsque les souillures sèchent, elles adhèrent plus fortement aux parois et sont donc plus difficiles à éliminer (**Laithier et Dartailh, 2014**). Il est important de choisir les bonnes méthodes de nettoyage et de désinfection. Dans plusieurs cas, il est préférable d'utiliser deux méthodes ou plus pour le nettoyage des surfaces de processus parce que les micro-organismes doivent s'adapter à toutes les techniques pour survivre (**Mattila et Wirtanen, 1992**).

Si le nettoyage et la désinfection sont insuffisants, les cellules microbiennes sur la surface d'équipement pourraient survivre et se développer en biofilm et causer la contamination transversale qui mène à la diminution de la durée de conservation, à la détérioration de l'aliment et à la transmission de la maladie (**Allison et Gilbert, 1992; Carpentier et Cerf, 1993; Sharma et Anand, 2002; Stepanovic et al., 2003**).

4.1. Les facteurs de nettoyage

Le nettoyage a pour objectif d'éliminer toutes traces de salissure sur toutes les parties du matériel en contact avec l'aliment, si possible sans démontage ni nettoyage manuel. L'efficacité du nettoyage est conditionnée par quatre facteurs principaux : (1) l'action chimique, (2) l'action mécanique, (3) la température, et (4) le temps de contact, qui forment ensemble le cercle de Sinner (**Wirtanen et Salo, 2003**). Le cercle de Sinner a décrit un processus économiquement idéal de nettoyage utilisant les interactions optimales entre ces facteurs de base. La réduction de l'un des facteurs doit être compensée en renforçant les autres facteurs.

4.2. L'eau

L'eau utilisée pour le nettoyage, la désinfection et le rinçage du matériel en contact avec le lait doit être potable : elle ne doit pas contenir de micro-organismes, ni de substances nocives en quantité susceptible d'avoir une incidence directe ou indirecte sur la qualité sanitaire du lait (**Règlements (CE) 852/2004 et 853/2004**).

La présence de bactéries telles que *Pseudomonas*, *Listeria* ou encore *Salmonella* peut entraîner une contamination du lait et dans un second temps une contamination du produit fini. C'est la raison pour laquelle il est fortement recommandé de faire analyser l'eau si celle-ci est issue d'un captage privé, cette mesure n'est pas obligatoire mais permet d'assurer de la

qualité de l'eau. Dans le cas d'un problème de qualité, différentes solutions existent pour remédier aux problèmes d'origine bactériologique (chloration, utilisation d'UV,...) et chimiques (dénitrificateur, adoucisseur, déferiseur,...) (**Laithier et Dartiailh, 2014**).

4.3. Exemple d'autre produit de nettoyage

L'eau de Javel est une solution aqueuse renfermant un mélange de chlorure, d'hypochlorite de sodium, de soude caustique et de carbonate de sodium. Diluée, l'eau de Javel perd rapidement ses propriétés antiseptiques. Le trempage prolongé des manchons de caoutchouc en entraîne la détérioration superficielle et en augmente la rugosité. Les iodophores peuvent être irritants pour la peau surtout si la température extérieure est inférieure à 10°C. Ils sont par ailleurs inactivés à des températures supérieures à 40°C. Leur activité bactéricide est réduite dans des eaux polluées (**Ch. Hanzen 2015-2016**).

II.5. Les mammites : généralités et pathologie

5.1. Définition

Une mammite est une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle due généralement à une infection bactérienne (**Hanzen, 2008 ; Crapletet al., 1973**). Elle peut être aussi due à des désordres physiologiques ou à des traumatismes locaux. Les infections mammaires peuvent être ou non associées à des signes cliniques, ce qui signifie la présence des mammites cliniques et des mammites sub-cliniques (**Poutrel, 1985 et Seegerset al.,1997 Gedilaghine, 2005**).

5.2. Différents types de mammites

On peut classer les mammites selon les modifications de la mamelle « chaleur, douleur, rougeur, gonflement », la composition du lait « grumeaux, couleur » (**Blood et al., 1976**).

5.2.1. Les mammites cliniques

Un examen attentif des caractéristiques macroscopiques de la sécrétion mammaire, une inspection et une palpation de la mamelle et des nœuds lymphatiques rétro-mammaires permettent de diagnostiquer et de caractériser les différentes formes de mammites cliniques. (**Béatrice, 2007**).

La mammite Cliniques est une inflammation de la mamelle dont l'origine la plus fréquente est la filtration de bactéries dans un quartier par le canal de trayon. Chez la vache, la mammite se manifeste par :

- une modification non clinique de la sécrétion lactée (diminution de production et augmentation du nombre de cellules somatiques sans aucun signe clinique);
- une modification de la sécrétion suivie de signes cliniques fonctionnels (grumeaux, sang ou caillots sanguins, pus dans le lait), de signes cliniques locaux (gonflement, chaleur, douleur, rougeur) et de signes cliniques généraux (température plus ou moins élevée, avec ou sans appétit et, quelquefois, en décubitus, un état de choc) (**Abdoulkarim , 2012**).

Cette maladie est associée à des symptômes visibles comme l'inflammation de la mamelle (dure, enflée, chaude, douloureuse), la modification de l'aspect du lait (présence de grumeaux, variations de couleur, d'odeur et d'aspect). Dans les cas suraigus, l'état général de la vache peut être atteint : forte chute de production, perte d'un quartier et dans des cas exceptionnels, mort de l'animal.

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

Ces mammites entraînent toujours d'importantes chutes de production. Quelquefois, la perte d'un quartier ou plusieurs quartiers qui conduisent à la réforme et exceptionnellement à la mort de l'animal. La sévérité et l'évolution de l'infection dépendent à la fois du pouvoir pathogène du microorganisme en cause et de l'efficacité des défenses immunitaires de l'hôte. On distingue quatre types de mammites cliniques :

- **La mammite gangreneuse**

C'est une infection mammaire due le plus souvent à des souches de *S. aureus* productrices de l'hémolysine α . Cette toxine provoque de la vasoconstriction locale prolongée qui empêche l'irrigation sanguine de la partie distale du quartier infecté, entraînant la nécrose des tissus. Cette forme de mammite est plus fréquente chez les jeunes vaches que chez les vaches âgées qui disposent plus souvent d'anticorps contre l'hémolysine. Des signes de gangrène ont également été observés dans le cas de mammites à colibacillaire (**Plommet et al., 1968**).



Figure 09. mammite gangreneuse (REMY D, 2010).

- **La mammite d'été**

Elle est causée par *Arcanobactérium pyogènes*, ce forme de mammite est particulièrement fréquente entre juin et septembre. Elle atteint plus particulièrement les génisses et les vaches laitières tarées. Elle se traduit par la formation d'abcès dans le quartier, qui devient enflé douloureux, et par la production abondante d'un pus nauséabond (Dahou, et al., 1991).



Figure 10. Mammite d'été ou mammite purulente (REMY D, 2010).

- **La mammite à nocardia astéroïdes**

Elle atteint généralement les vaches en troisième et quatrième lactation dans le mois qui suit le vêlage. Elle se manifeste par des quartiers enflés et très durs avec des abcès. La sécrétion est souvent dénaturée, formant un dépôt jaunâtre et un surnageant incolore. La vache présente une température élevée et persistante, elle ne s'alimente plus et maigrit rapidement. Il peut s'établir une fistule permettant l'écoulement d'un pus abondant, hors du quartier (Plommet et al., 1968).

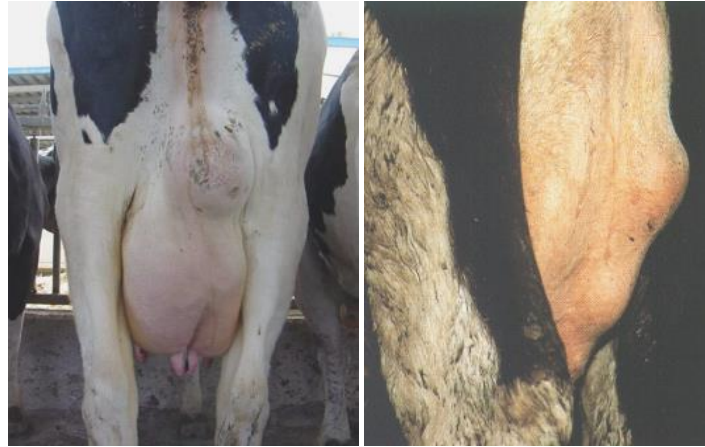


Figure 11. mammite à nocardia astéroïdes ou chronique (REMY D, 2010)

- **La mammite colibacillaire**

Elle évolue sous forme subaiguë. Elle dépend principalement de l'efficacité de la réaction immunitaire : précoce, intensité, efficacité bactéricide. Si cette réaction est trop tardive ou insuffisante, les colibacilles se multiplient activement dans le lait et leurs endotoxines provoquent chez l'animal un état de choc. La vache en position couchée est prostrée, présence de la diarrhée, déshydratation et hyperthermie. La sécrétion des quartiers atteints est souvent réduite et le lait prend un aspect aqueux et jaunâtre (Plommet et al., 1968).



Figure 12. Mammite colibacillaire (REMY D, 2010).

- **Les mammites sub-cliniques**

Les mammites subcliniques sont caractérisées par une absence de signes cliniques. L'inflammation due à l'infection s'accompagne essentiellement d'un afflux de cellules somatiques dans le lait du quartier infecté, particulièrement les polynucléaires neutrophiles, et par une modification de la composition chimique du lait (baisse des taux de caséine et de

lactose, augmentation des taux d'électrolytes). Le diagnostic des mammites subcliniques repose sur la numération des cellules somatiques du lait, la mise en évidence des modifications chimiques et la recherche de la bactérie en cause. L'augmentation des cellules somatiques peut être révélée par des méthodes de comptage, comme le California Mastitis Test (CMT), le Fossomatic, le Coulter Conter, la conductivité électrique. Lors de mammites subcliniques, les bactéries peuvent persister dans le pis et l'infection devenir chronique suite à l'expression de certaines propriétés. Par exemple, la formation d'un biofilm, la survie à l'intérieur des cellules épithéliales mammaires et/ou l'absence de synthèse d'une capsule sont considérées comme trois propriétés impliquées dans la chronicité d'une infection à *S. aureus* (Bardiau et al., 2014).

L'inflammation est modérée sans signe visible au niveau de la vache, de la mamelle ou du lait. Elle s'accompagne d'un afflux de globules blancs aussi appelés cellules. Le diagnostic de ces mammites se fait par :

- des analyses directes de la concentration cellulaire du lait effectuées en routine dans le cadre du Contrôle laitier ;
- des tests indirects comme le CMT (Abdelkrim, 2009).
- Il n'y a pas d'inflammation macroscopique évidente, mais l'examen du lait révèle l'existence d'une infection, une augmentation du comptage cellulaire et également une altération des propriétés chimiques du lait (Poutrelet al., 1988)

- **Autres types de mammites :**

Il existe d'autres mammites graves qui, sont beaucoup moins fréquentes, mais dont il est bon de connaître l'existence :

- Mammites à *Klebsiella* ou à *Serratia*.
- Mammites à *Pseudomonas aeruginosa*.
- Mammites à levures.
- Mammites à mycoplasmes.

5.3. Anatomie des glandes mamelles

5.3.1. Mamelles anatomie :

La mamelle de la vache est un très gros organe, pesant environ 50 kg. Étant donné le fait qu'elle peut atteindre parfois un poids de 100 kg, il est capital que la mamelle soit très bien attachée au squelette et aux muscles. Les ligaments médians sont composés de tissus fibreux élastiques, alors que les ligaments latéraux sont formés de tissus conjonctifs moins élastiques (Figure 13). Si les ligaments s'affaiblissent, la mamelle ne sera plus apte à la traite

mécanique puisque les trayons s'écartent vers l'extérieur. Les quartiers sont couverts de poils plus ou moins long (REMY D, 2010).

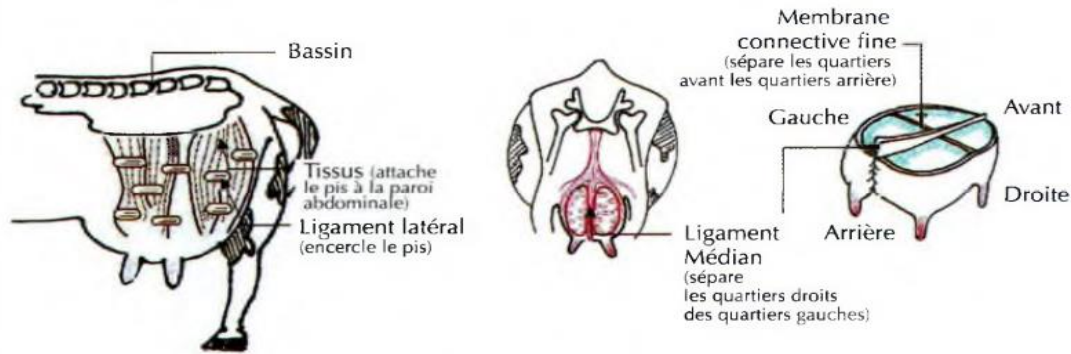


Figure 13. Les différents tissus qui soutiennent la mamelle (REMY D, 2010).

La mamelle de la vache laitière est constituée de quatre quartiers séparés qui comportent chacun un trayon. Ils contiennent des alvéoles glandulaires ou acini mammaires qui, formés de lactocytes, synthétisent le lait. Ces alvéoles sont entourées par un tissu parenchymateux et sont reliées à la citerne de la glande d'un volume moyen de 400 mL via les tubules et les canaux galactophores. Le lait sécrété dans une des glandes ne peut pas passer par une autre glande. Les quatre quartiers sont séparés physiquement par différentes structures dont les ligaments médians. Lorsqu'un germe pénètre par le canal du trayon, il n'infecte qu'un quartier. Cette citerne de la glande est séparée de la citerne du trayon par un repli annulaire (figure 14), (REMY D, 2010).

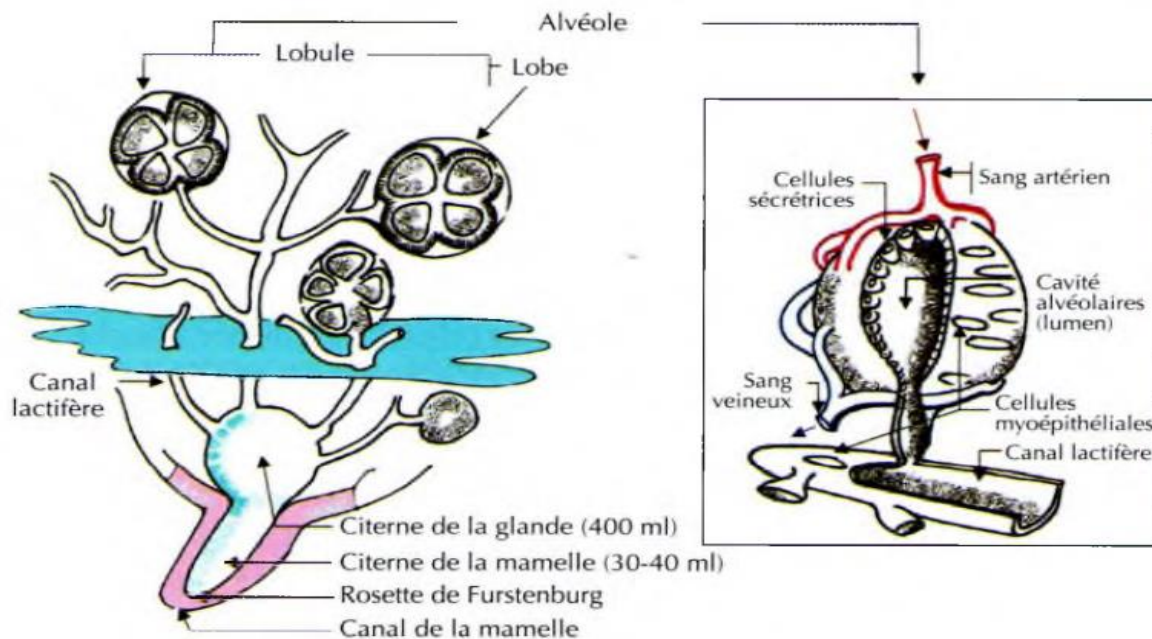


Figure 14. les différentes structures internes de la mamelle (REMY D, 2010).

La mamelle est irriguée par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Cet organe possède aussi un système lymphatique qui transporte les déchets à l'extérieur de la glande. Quelquefois, au moment d'un premier vêlage, les génisses peuvent souffrir d'œdème dû, en partie, à la présence de lait dans la mamelle qui comprime les différents vaisseaux et bloque la lymphe dans l'organe (REMY D, 2010).

5.3.2. Anatomie du trayon

Le trayon est une structure creuse, longue de 5 à 7 cm. Il contient une citerne généralement remplie de lait. Sa paroi est constituée d'une épaisse couche fibro-élastique mêlée de faisceaux de fibres musculaires lisses. Sa souplesse lui permet de s'adapter et de se modifier en fonction des pressions exercées par le vide dans le manchon trayeur. Il est entouré d'une peau fine et glabre, ce qui facilite son nettoyage mais la rend relativement fragile. La peau est un élément important du trayon. Cette zone glabre constitue sa première défense. Pour que la peau soit protégée des contaminations lors des déplacements en zone souillée, le trayon doit être situé à une distance relativement éloignée du sol (REMY D, 2010).

L'étanchéité du canal du trayon est assurée par différentes structures décrites dans la (figure 15). Ces structures, ainsi que la kératine, sont à l'origine des défenses du trayon

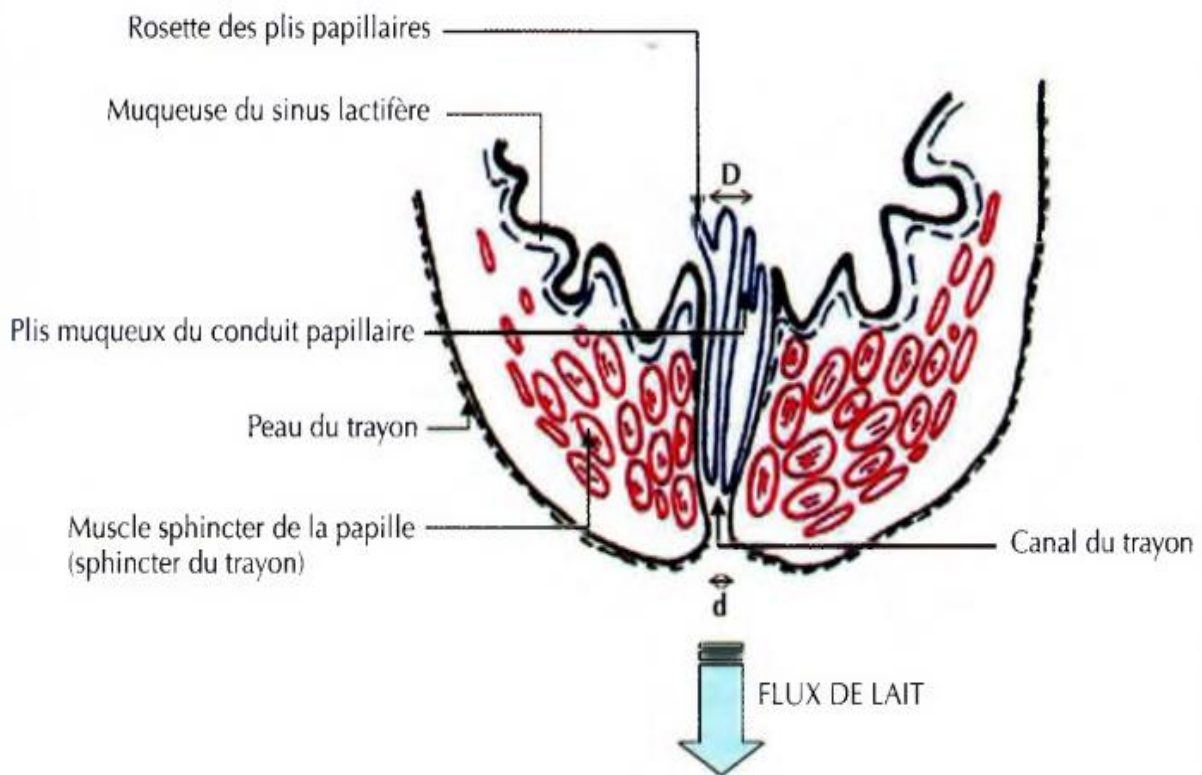


Figure 15. Les différentes structures du canal du trayon (D'après Baronne, 2010).



Figure 16. Coupe d'un trayon (REMY D, 2010).

5.4. Les mécanismes des défenses des glandes mamelles

5.4.1. Les défenses du trayon ou défenses basses de la mamelle

La peau saine du trayon constitue un environnement hostile aux bactéries grâce à ses couches de cellules mortes kératinisées et au film lipidique bactériostatique. Cette protection est compromise par les lésions cutanées (blessures, gerçure, verrue) et les produits d'hygiène de prétraite. L'application de produit émoullient en post-traite a pour objectif de protéger cette barrière cutanée (Angoujard 2015). La forme conique du canal et la contraction du sphincter permettent l'absence de lait résiduel dans celui-ci. La fermeture du sphincter empêche la pénétration des agents pathogènes (Angoujard, 2015). L'épithélium stratifié du canal du trayon produit de la kératine qui emprisonne les bactéries et permet leur élimination. En effet, lors de l'éjection des premiers jets de lait une partie de la couche de kératine est évacuée. Elle est renouvelée par dégénérescence cornée. L'accumulation de kératine forme également un bouchon durant le tarissement de manière non systématique surtout chez les vaches hautes productrices.

Ces défenses diminuent la réceptivité de la mamelle aux infections (Remy, 2010 ; Blowey et Edmondson, 2010).

5.4.2. Les défenses hautes de la mamelle

Le lait d'une mamelle saine comprend principalement des cellules épithéliales, des macrophages et des lymphocytes. La pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle entraîne une réponse immunitaire cellulaire et biochimique où les polynucléaires neutrophiles représentent le type cellulaire dominant suivi des macrophages puis des lymphocytes (**Risco et Melendez, 2011**).

5.5. Pathogénie

En cas des mammites, il est envisagé la présence d'un réservoir d'agents pathogènes, le transfert de ce réservoir à la peau du trayon, suivi par sa pénétration dans le trayon et de la réponse de l'organisme hôte.

5.5.1. Pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle

La pénétration d'agents pathogènes dans la mamelle se fait principalement par voie galactogène par le biais de canal du trayon à l'exception de quelques bactéries pouvant pénétrer par voie hématogène (les mycoplasmes, les salmonelles, *L.monocytogenes* et *M. paratuberculosis*) (**Remy, 2010**). La contamination de la mamelle se fait préférentiellement lorsque le sphincter est ouvert, au cours de et après la traite, au tarissement et à l'approche du vêlage. On cite l'exemple de *S. aureus* colonise la base du trayon et se multiplie avant de remonter le canal pour atteindre le sinus lactifère. La pénétration peut également résulter de la propulsion de bactéries dans le trayon *via* le lait contaminé au cours de la traite ce qui permet la transmission de bactéries environnementales comme *E. coli*. La contamination peut être iatrogène en raison de défauts d'hygiène lors d'injections intra-mammaires ou de cathétérisme du canal du trayon (**Remy, 2010 ; Blowey et Edmondson, 2010**).

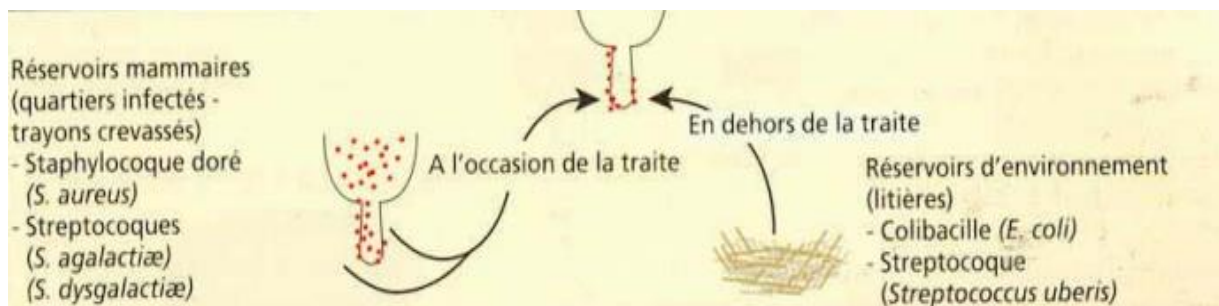


Figure 17. transfert des bactéries responsables des mammites, les unes sont d'origine mammaire, les autres viennent de l'environnement (**BERNARD Airieau, 2000**)

5.5.2. les principales bactéries responsables des mammites

Les majorité des mammites sont d'origine bactérienne. Il est décrit plus de 200 espèces bactériennes différentes provoquant des mammites chez les bovins dans la littérature scientifique (Blowey et Edmondson, 2010). Les bactéries sont classées dans les catégories poly- ou mono-clonale suivant le nombre de souches d'une même espèce présente dans l'élevage (Angoujard *et al* 2015).

5.5.2.1. Bactéries majeures

Les bactéries majeures sont celles le plus souvent isolées lors d'examen bactériologique en cas de mammites, la prévalence des bactéries les plus rencontrées en Algérie et aux autres pays était, selon une enquête réalisé en Algérie, ont montré que les staphylocoques ont été retrouvé dans 4 cas sur 10 des mammites subcliniques tandis que *Pseudomonas*, *E. coli* et les entérobactéries ont été les germes les moins isolés (Saidi *et al.*, 2012). Bidaud *et al*, 2010 amontré que les cas de mammites cliniques ou sub-clinique rencontrés étaient causées par : *Str. uberis*, suivi par *E. coli* puis *Staphylococcus spp.* à coagulase négative et *S. aureus*. *S. aureus* est la première espèce bactérienne fréquemment isolée lors de mammites cliniques avec une fréquence élevée de en Algérie par (Koutchoukali, 1980).

5.5.2.2. Bactéries mineures

Les bactéries mineures responsables de mammites sont moins fréquemment rencontrées lors de mammites cliniques et sont plutôt retrouvées lors de mammites sub-cliniques. Parmi ces nombreuses bactéries, les plus fréquentes en France sont les streptocoques autres que *S. uberis*, *S.dysgalactiae*, les entérobactéries - autres que *E. coli* *Klebsiellas sp*, et *C. bovis* (Tableau 03) (Bidaudet *al.*,2010).

Tableau 03 : Les principaux réservoirs d'agents pathogènes pour la mamelle
(POUTREL ,1978).

Pathogènes	Réservoirs			
	Vache			Environnement
	Mamelle infectée	Lésion du trayon	Autres sites	
<i>S.aureus</i>	+++	+++	+	–
<i>Streptococcus.agalactiae</i>	+++	+++	+	–
<i>Streptococcus.dysgalactiae</i>	++	+++	++	–
<i>Streptococcus.uberis</i>	++	+	+++	+++
<i>E.coli</i>	+	–	+++	+++

5.6. Diagnostic et traitement des mammites chez les bovins

5.6.1. Diagnostic des mammites

Les numérations cellulaires sur le lait permettent d'identifier précisément les vaches du troupeau atteintes d'infections mammaires en vue notamment de limiter la contagion aux autres vaches et d'établir certaines priorités dans les mesures de lutte à appliquer (Serieys, 1985). **Numération des cellules somatiques**

Comme tout liquide biologique, le lait, même normal, contient des cellules somatiques hétérogènes. Elles sont, en effet, essentiellement constituées de globules blancs (macrophages, polynucléaires neutrophyles et lymphocytes) de la circulation sanguine et de cellules épithéliales provenant de la desquamation des épithéliums des canaux galactophores, des acini et lors de l'érosion du tissu glandulaire (Tableau 04) (Barkema et al., 1997).

Tableau 04 : Répartition (en %) des différents types cellulaires dans le lait de vache en l'absence et en présence d'infection mammaire (Gabli, 2005).

Type cellulaire	Mamelle saine	Mamelle infectée
Polynucléaires	0 – 11	50 – 90
macrophages	66 - 88	0,2 - 2
lymphocytes	10 - 27	2,8 - 5,1

Lors d'infection, il y a un appel leucocytaire important qui se caractérise par une augmentation de comptage cellulaire et des modifications considérables dans la répartition des populations dans le lait. Si bien que les Polynucléaires neutrophiles deviennent très nombreux et majoritaires (Barkema et al., 1997).

5.6.2 Méthodes de dépistages de Mammites

- **Test de CMT (Californian Mastitis Test)**

Si les méthodes de mesure directe permettent d'avoir des résultats précis, Ses résultats sont obtenus immédiatement et concernent la production de chaque quartier alors que les mesures directes sont réalisées sur des mélanges de lait des quartiers ou sur le lait de tank (**Barkema et al., 1997**).

- **Diagnostic bactériologique rapide**

- **LIMAST test** : test réalisable au pis de la vache pour le diagnostic des coliformes. (**Waage et al., 1994**).
- **HYMAST test** : permet d'identifier les staphylocoques, les streptocoques et les coliformes. (**Janson et al., 1999**).
- **Le test Sensi-vet Mam Color** : permet l'identification de streptocoques, staphylocoques, E.coli, entérobactéries, Listéria, mycoplasmes et d'évaluer la sensibilité des germes présents dans le lait vis-à-vis d'un certain nombre d'antibiotiques (**Manner et al., 1999**).

- Il y'a aussi Plusieurs méthodes permettent de déterminer le type d'agent pathogène qui cause les mammites. Ce sont : la culture bactériologique standard du lait, la PCR (Polymérase Chaîne Réaction), les plaques Pétrifilm™ ainsi que les Biplates et Triplates (**Jodi, 2007**).

5.6.3. Traitement des mammites

Le traitement de mammites est essentiellement réalisé par injection intra mammaire d'antibiotiques.



Figure 18. traitement local des mammites (**HANZEN C., 2010**).

En cas d'infections intra-mammaires, les traitements vétérinaires reposent essentiellement sur l'utilisation d'antibiotiques (**Hanzen, 2010**).

II.6. Relation entre matériaux de traites, biofilm et mammite

6.1. Les facteurs d'apparitions des germes de biofilm

Les germes apportés par l'installation de traite varient selon divers conditions. Lesquelles : le type de détergent utilisé, le degré de température et la durée de nettoyage suivie, et l'état de surface des composants (caoutchouc, verre, acier inoxydable, etc). (**Benard et al., 1981**), Des études montrent que les surfaces en caoutchouc sont des lieux particulièrement propices au développement bactérien qui cause la formation de biofilms. La diversité des flores est selon la période ; certaines flores apparaissent subitement à une période donnée et à niveaux très importants puis disparaissent et selon la matière de manchons ; les manchons en silicone sont moins contaminés car c'est un matériau moins poreux que le caoutchouc ce qui explique le niveau inférieur de l'adhésion de biofilms sur sa surface (**Laithier et al., 2005**). Aussi, si les températures de nettoyage de la machine à traire sont faibles, le nettoyage est moins efficace, cela favorise donc l'adhésion et l'installation des entérocoques en particulier sur cet équipement.

6.2. Les germes existants dans la machine à traire

Le matériel de traite est considéré un réservoir potentiel en lactobacilles hétéro fermentaires facultatifs qui trouvent leurs origines en amont (alimentation, laitiers, ...) (**Bouton et al. 2007**). Certaines études ont montré que *L. monocytogenes* sont présentes sur le manchon (**Latorre et al, 2010**). Selon **Michel (2005)** et **Laithier (2011)**, les bactéries lactiques du genre *Enterococcus* représentent la flore majoritaire dans cet équipement (manchons) suivie de la flore acidifiante mésophile et du *Leuconostoc*. Les bactéries lactiques adhérentes à la surface de la machine à traire contribuent très fortement à l'enrichissement du lait en flores d'intérêt technologique. **Kagkli et al., (2007)** ont montré que la source majeure des entérocoques dans le lait était la machine à traire. Parmi la flore non désirable présente sur la surface de la MAT, les staphylocoques à coagulase positive (**Laithier et al, 2005**). Lors de la traite, le passage du lait dans la MAT entraîne un détachement de ces biofilms qui peuvent créer une contamination du lait (**Laithier et Dartailh, 2014**). La présence des biofilms contenant *S.aureus* dans les équipements de traite pourraient également servir comme véhicule ou réservoir pour sa transmission et son envahissement des glandes mammaires de la vache (**Latorre et al, 2019 ; Pacha et al, 2020**).

I. Matériel et méthodes

I.1. Origine et provenance des échantillons

Les prélèvements ont été effectués à partir des machines à traire chez des éleveurs dans quatre fermes différentes situées dans les environs de Ben Badis. Au total 5 prélèvements ont été réalisés à partir de divers sites et codés de la manière suivante :

- Échantillon (E1YB) ; Eleveur YB; endroit : griffe d'MAT.
- Échantillon (E2HB1); Eleveur HB; endroit : gobelet trayeur d'MAT.
- Échantillon (E2HB2); Eleveur HB; endroit : griffe d'MAT.
- Échantillon (E3ZZ) ; Eleveur ZZ; endroit : gobelet trayeur d'MAT.
- Échantillon (E4FB) ; Eleveur FB; endroit : gobelet trayeur d'MAT.



Figure 19. Échantillon 1 (E1YB) (Au niveau de griffe d'MAT).



Figure 20. Échantillon 2 (E2HB1) (Au niveau de gobelet trayeur d'MAT).



Figure 21. Échantillon 3 (E2HB2) (Au niveau de griffe d'MAT).



Figure 22. Échantillon 4 (E3ZZ)
(Au niveau de gobelet trayeur MAT).



Figure 23. Echantillon 5 (E4FB)
(Au niveau de gobelet trayeur d'MAT).

I.2. Préparation des prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage et par grattage. Un premier écouvillon est introduit à l'intérieur du gobelet trayeur pour éliminer la couche supérieure, ensuite un deuxième écouvillon est utilisé pour récupérer la couche adhérente à la surface. Pour les échantillons solides, une lame bistouri stérile est utilisée afin de gratter et racler les impuretés qui sont sellés est mis dans des boîtes stériles.

Les prélèvements sont conservés à 4°C et transportés dans une glacière jusqu'au laboratoire pour être traiter.



Figure 24. Echantillons dans un endroit stérile

I.3. Préparation et Enrichissement des échantillons

Enrichissement et incubation

Les échantillons sont préparés dans des tubes à essai stériles pour une analyse. Pour chaque échantillon une première étape d'enrichissement a été effectuée de la manière suivante :

- Le 1^{er} tube : utilisé pour l'isolement et la culture des bactéries à Gram négatif, rempli avec 10 ml de bouillon nutritif (BN). Les prélèvements sont incubés dans l'étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

- Le 2^{ème} tube : rempli avec 10 ml de bouillon BHI pour l'enrichissement et la culture des germes à Gram positif (Staphylocoques, Streptocoques et enterocoques). Les prélèvements sont incubés dans l'étuve à 37°C durant 24 à 48 heures.
- 4^{ème} tube : contenant 10 ml de bouillon MRS (pH= 6,5) pour l'enrichissement des germes bacilles à gram positif (*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, etc). Les prélèvements sont incubés dans l'étuve à 37°C durant 24 à 48 heures.
- Le 3^{ème} tube 3 : contenant 10 ml de bouillon MRS (pH= 5,5) pour l'enrichissement des *Lactobacillus*. Pour avoir des conditions anaérobiques les tubes sont couverts avec une couche de l'huile de paraffine. Les prélèvements sont incubés dans une étuve à 30°C durant 48 heures.

Avant chaque analyse, une homogénéisation des échantillons a été effectuée avec le vortex ou manuellement.

Les milieux de culture utilisés sont stérilisés dans l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

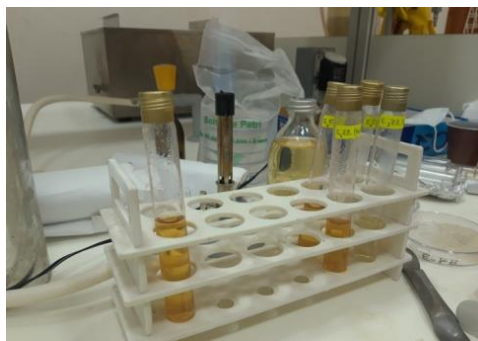


Figure 25. Préparation d'échantillon 3 E₃ZZ

I.4. L'ensemencement et isolement en milieux solides

L'ensemencement sur différents milieux solides est effectué par la technique des stries sur trois secteurs ou cadrans. Les milieux utilisés durant notre étude sont le milieu Gélose Nutritif, BHI Agar, MRS à pH 6.5 et 5.5, MRS, Mac-conkey et Chapman.

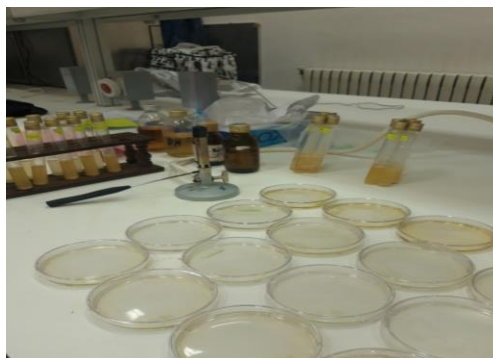


Figure 26. Préparation des milieux de culture utilisés pour l'isolement des microorganismes.

Méthode d'ensemencement

- Plongez l'anse de platine stérile dans la suspension bactérienne de manière à avoir une inoculum de la boucle de l'anse de platine, cette gouttelette servira à ensemencer sur notre milieu.
- Ouvrir la boîte de Pétri, et diviser en 3 secteurs égales.
- Dans la première section, effectuer des stries condensées dans un mouvement de va-et-vient, pour les deux autres parties, les stries sont moins denses pour avoir des colonies bien isolées.
- Déposer l'inoculum au centre et en surface du milieu gélosé (Figure n°27).

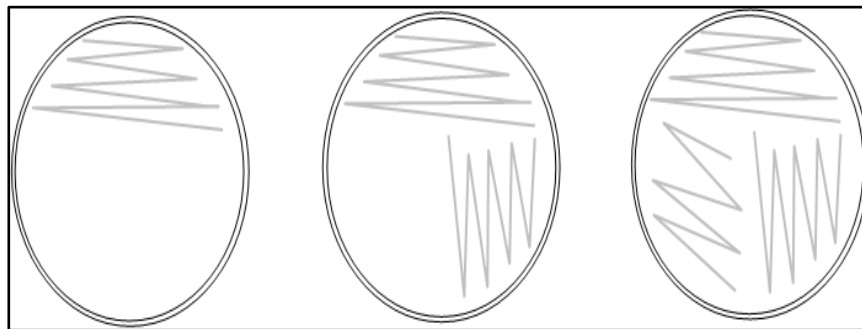


Figure 27. ensemencement en stries par épuisement sur trois secteurs ou cadrans (Perry K. et al, 2004).

I.5. Identification phénotypique des isolats

Durant cette étude les méthodes phénotypiques ont été utilisées pour l'identification souches isolées à partir des différents échantillons prélevés. Deux tests ont été réalisés

1. Etude de l'aspect macroscopique des isolats

Pour déterminer l'aspect macroscopique des isolats; la forme, la taille, couleur, relief, et la pigmentation des colonies obtenus sur des boîtes de Pétri sur les différents milieux de culture utilisés incubés à 30 ou 37°C pendant 24 à 48h.

2. Etude de l'aspect microscopique des isolats

L'examen consiste à vérifier la forme cellulaire, mode d'association et arrangement cellulaire par l'utilisation de la coloration de Gram sur des cultures jeunes.

Méthode de la coloration de Gram

La coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification. En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides,

laisse passer l'alcool qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

- **Réactifs**

- Violet de gentiane phénique
- Lugol (iodo-iodure de potassium)
- Alcool à 95%
- Safranine ou Fuchsine phéniquée de ziehl

- **Matériel**

- Microscope optique
- Lames
- Bec bunsen
- Colonies bactériennes
- Anse de platine
- Colorant: Violet de Gentiane et Fuchsine
- lugol
- Ethanol
- Pince en bois

Protocole de la réalisation de la coloration de Gram

1. Réaliser un frottis et le fixer à la flamme
2. Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
3. Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 min
4. Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau
5. Recouvrir la préparation de Fuchsine, laisser agir environ 1 min. lavé abondamment.
6. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.
7. Procéder à l'observation au microscope optique (grossissement x100)

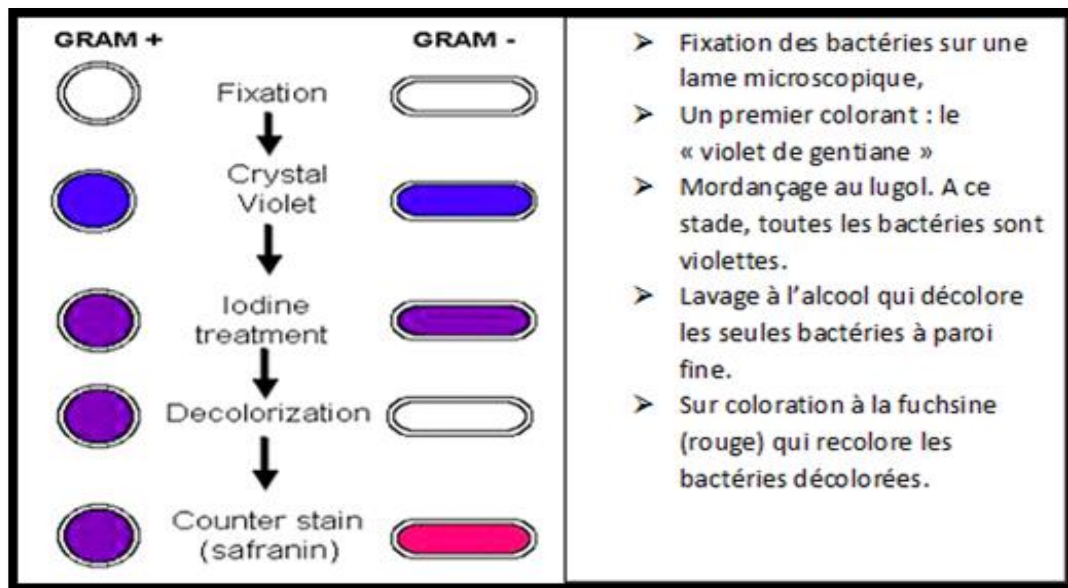


Figure 28. Les étapes de la coloration de Gram.

3. Test catalase

Certaines bactéries produisent l'enzyme Catalase qui facilite la désintoxication cellulaire pour s'échapper aux dommages oxydatifs du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La détection de la présence de la catalase chez les bactéries est essentielle pour différencier les *Staphylococcaceae* et *Micrococcaceae*, catalase-positives des *Streptococcaceae* et catalase-négative. Le test de catalase est également utile pour différencier entre les bactéries aérobies et anaérobies obligatoires et entre les souches aérotolérantes de *Clostridium*, qui sont catalase négative, de *Bacillus*, qui catalase positive.

Réactifs du test catalase

Le peroxyde d'hydrogène à 10 v

Protocole du test catalase

La méthode utilisée est la méthode de la catalase sur lame ou en goutte, car elle nécessite une petite quantité de culture et repose sur une technique relativement peu compliquée.

- Placer une lame de microscope
- À l'aide d'une pipette Pasteur, déposez 1 goutte de H_2O_2 à 10 v
- À l'aide d'une anse stérile, prélevez une colonie bien isolée d'une culture pure et placez-la sur la goutte de H_2O_2 .

Identification des souches à l'aide de API système.

La galerie API 20 E et 20 Strp comporte des microtubes contenant des substrats déshydratés destinés à l'étude du profil fermentaire des bactéries étudiées, et qui sont inoculés avec une suspension bactérienne ajustée. Chaque souche testée est inoculée dans

dans la galerie et incubée à 37°C pendant 24 à 48h. Les réactions enzymatiques produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages de l'indicateur de pH qui donne une coloration différentes dans les cupules. La lecture de la galerie API 20 E et 20 Strp est réalisée en se référant au tableau de lecture et l'identification est obtenue à partir du profil numérique, elle est réalisée à partir de la base de données à l'aide du catalogue analytique (**Annexe**) ou à l'aide d'un logiciel d'identification en ligne.

Conservation des souches

Les souches sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés à une température de 4°C.

I.6. Détection de la formatrice des biofilms par souches

Afin de mettre en évidence la capacité de formation d'un biofilm par les souches isolées, , deux méthodes ont été employées à savoir ; la méthode de culture sur gélose au Rouge Congo (RCA) et la méthode standard de coloration au Cristal Violet (CV) sur un support de verre ou polystyrène.

1. Détection de biofilm par la Méthode Gélose Rouge Congo (RCA)

La mise en évidence de la détection de la formation des biofilm des isolats a été réalisé selon la méthode du Rouge Congo décrite par **Freeman et al. (1989)**. C'est une méthode qualitative, préconisée par culture des souches sur le milieu Rouge Congo à base de milieu BHI ou Colombia contenant 50 g/L de saccharose et 0,8 g/L de colorant de rouge Congo, incubé pendant 24 heures à 37°C. La formation de biofilms par les souches testées est révélée par la présence des colonies noires avec un cristallin de consistance sèche.

Ensemencement sur Gélose Rouge Congo (RCA)

- A l'aide une anse de platine, à partir des cultures de 24 heures ont été utilisées pour mettre en évidence la formation de biofilm. Après homogénéisation manuelle ou à l'aide d'un vortex
- Le milieu RCA préparé, ensuite estensemencé à partir d'une suspension des souches testées (culture jeune), en prélevant un inoculum avec une anse de platine, puis effectuer des stries sur une boîte de Pétri

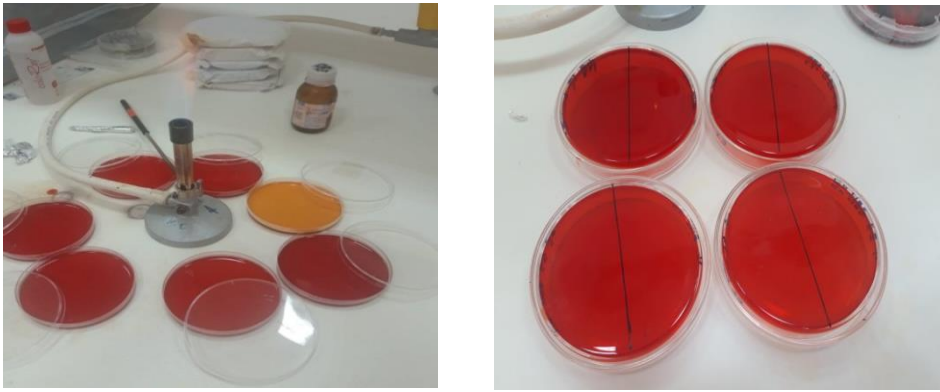


Figure 29. Répartition et ensemencement de la gélose Rouge Congo.

- Les boîtes ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 24h à 72h.

Lecture et interprétation de résultat

La formation de biofilms se traduit par la formation des colonies noires sur milieu gélose rouge congo. Les colonies de couleur noire et bordeaux sont considérées comme productrices de biofilm ou slim (résultat positif), tandis que, les colonies de couleur rouge indique que ces isolats et non productrice de biofilm (test négatif).

2. Détection de biofilm par la technique de coloration au Cristal violet

La méthode de coloration au Cristal violet est une technique de quantification parmi d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (verre ou polystyrène). La coloration au Cristal violet adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci.

2.1. Méthode des tubes à essai en verre

Cette méthode est décrite par **Christensen et al. (1985)**, il s'agit d'un test d'évaluation qualitative de la formation de biofilms

- La suspension bactérienne préparée à partir des colonies prélevées sur milieu Rouge congo est répartie dans des tubes en verre à raison de 5 ml de milieu BHIB par tube à 2 % saccharose afin de favoriser la formation de biofilm. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 h. Après une nuit d'incubation et pour chaque tube, l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Après que les tubes sont vidés et décantés en tapotant doucement pour éliminer toutes les bactéries planctoniques et garder les bactéries sessiles incrustées dans les puits et paroi des tubes. Les tubes sont rincés trois (3) fois avec PBS (Phosphate Buffer Saline à pH 7.3) en vue d'éliminer les cellules planctoniques non adhérentes, sécher en position inverse. À l'aide d'une micropipette remplir les tubes avec le colorant de Cristal violet à 2%

(m/v) et laisser agir pendant 15 à 30 min, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'eau distillée. Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre. Après séchage, ajouter 2ml d'Acide acétique (pure) dans chaque tube à essai contenant les souches. Laisser agir pendant 15 mn. Procéder au vortexage pour détacher les cellules adhérentes à la surface. Après 1 heure du temps, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 600 nm de chaque tube par rapport au blanc (Acide acétique pure) à l'aide d'un spectrophotomètre.



Figure 30. Préparation des cultures, coloration au Cristal violet pour et mesure de la DO

2.2. Méthode de quantification des microplaques (96 puits)

La méthode quantitative des microplaques pour mettre en évidence et la détection de biofilm a été décrite par **Stepanovic et al. (2007)**. Cette technique le support utilisé comme surface d'adhésion est un polystyrène pour l'étude de la formation de biofilm en utilisant de microplaque à 96 puits. Une suspension bactérienne est préparée à partir des colonies cultivée sur milieu rouge congo dans des tubes en verre à raison de 5 ml de milieu BHIB par tube à 2 % saccharose afin de favoriser la formation de biofilm . On dépose 100 μ L d'une culture de nuit (trois puits pour chaque souche à étudiée) auparavant diluée 1 dans 100. Des puits non inoculés sont utilisés comme témoin négatif (contrôle de stérilité). Les microplaques tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 h. Après une nuit d'incubation, on retire ensuite très délicatement la phase planctonique, les puits sont lavés trois fois avec 50 μ L de tampon phosphate salin (TPS pH 7.3) afin d'éliminer les bactéries planctonique. Les cellules adhérentes au support de polystyrène dans chacun des puits sont colorées avec 200 μ L de solution du Crystal violet. a 2%. Les microplaques sont ensuite lavées avec de l'eau distillée stérile et séchées pendant 15 minutes à une température ambiante. Les cellules des souches adhérentes qui forment des biofilms sur les puits, ont été uniformément colorées par le Crystal violet.

- **Mesure de la densité optique à 600 nm.**

Remplir chaque puits avec l'acide acétique pur et laissez pendant 15 min. déparasser de la solution des puits de chaque souche et rajouter 200 μ L d'acide acétique. L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 600 nm de chaque tube par rapport au blanc (Acide acétique pure).à l'aide d'un spectrophotomètre.

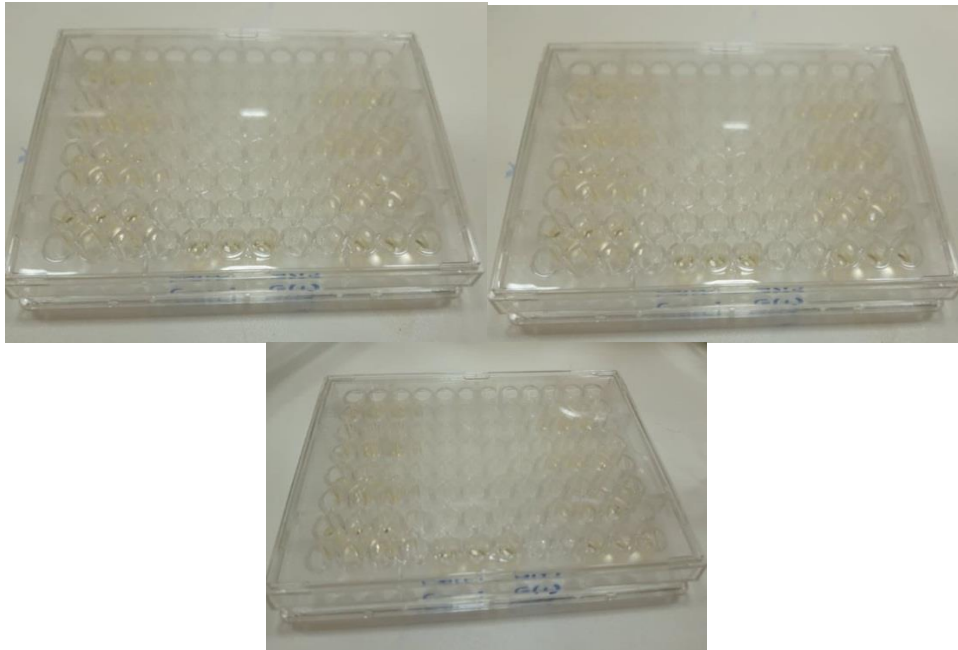


Figure 31. 03 microplaques à 96 puits (Bacil G+, Bacil G- et Cocci G-) avant l'incubation

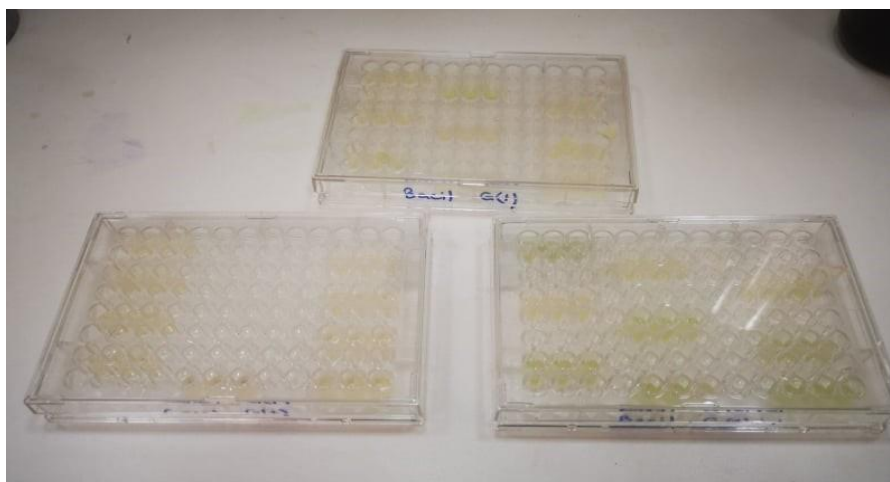


Figure 32. 03 microplaques à 96 puits (Bacil G+, Bacil G- et Cocci G-) après incubation

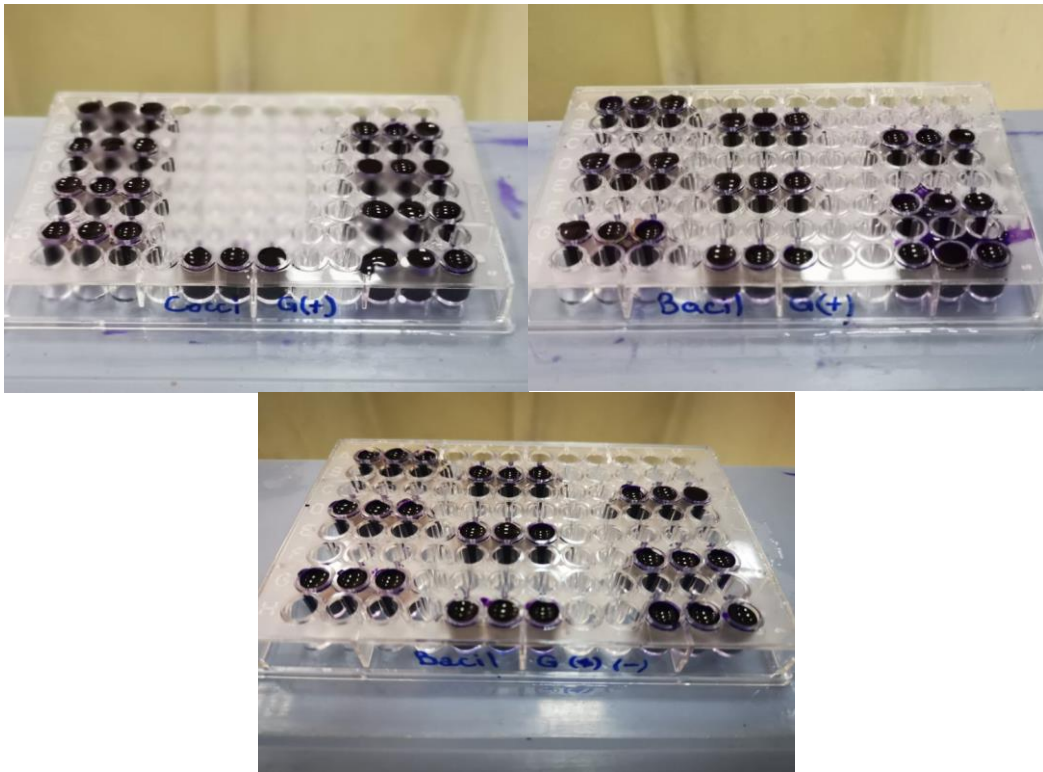


Figure 33. 03 microplaques à 96 puits (Bacil G+, Bacil G- et Cocci G-) après coloration

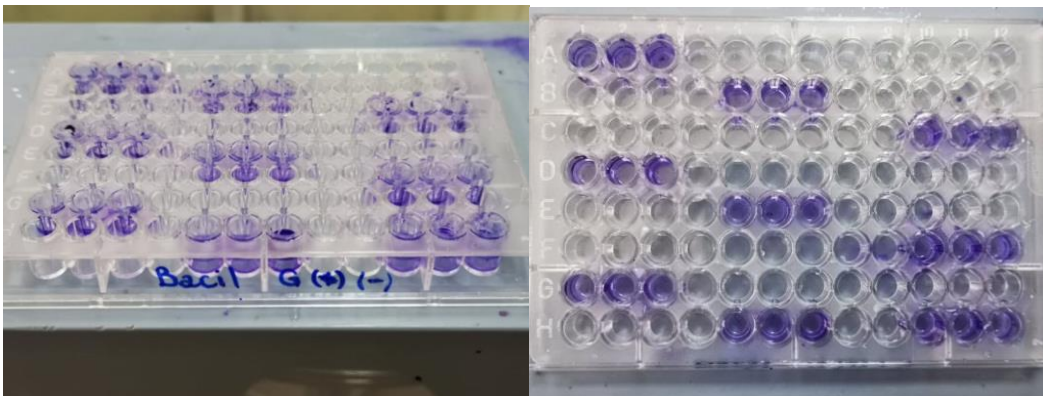


Figure 34. microplaques à 96 puits après lavage

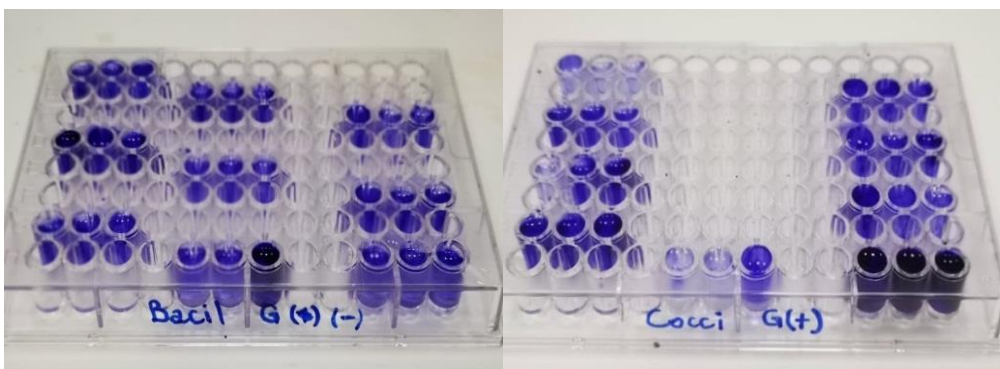


Figure 35. puits remplis avec l'acide acétique

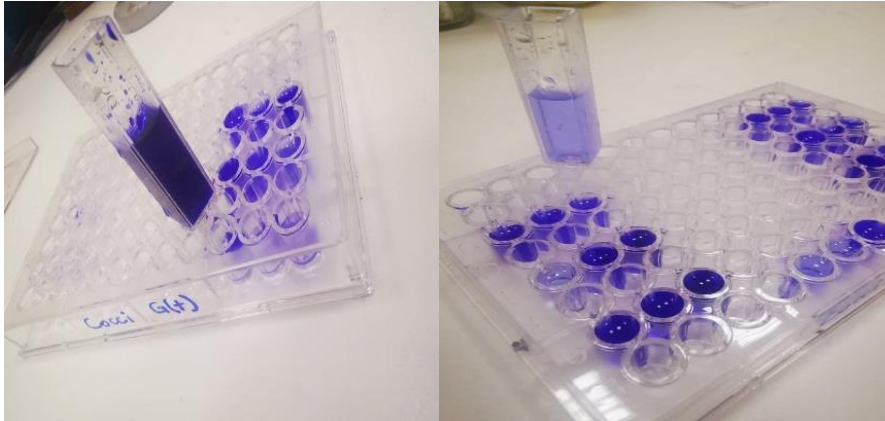


Figure 36. mesure de la DO de chaque souche



Figure 37. Préparation des API (API20 strep) de la souche EHB1 C1 BN.



Figure 38. Préparation des API (API20 strep) de la souche EY B1.



Figure 39. Préparation des API (API20E) de la souche EZ RN2.

II. Résultats et discussion

Après une nuit d'incubation, dans différents milieux liquide, nous avons constaté un trouble microbien visible du à la présence des germes dans les différents échantillons analysés, (**Figure 40**).



Figure 40. Cultures bactériennes et enrichissement sur milieux liquides (**BN, BHIB et MRS**)

Afin de déterminer les microorganismes présents dans les bouillons de culture, un isolement a été réalisé sur des milieux solides. Les résultats obtenus ont révélé des colonies bactériennes. La description de l'aspect macroscopique et microscopique a été enregistrée et décrite.

II.1. Caractérisation de l'aspect macroscopiques des colonies

L'étude de l'aspect microscopique de différentes souches isolées sur milieu des cinq échantillons analysés nous a montré une diversité microbienne (colonies) sur les différents milieux de culture. Les aspects des colonies observées sont différents et selon le type de milieux de culture utilisés, la souche ou l'espèce présente dans l'échantillon prélevé. Les différents aspects macroscopiques observés durant notre étude sont décrit dans les tableaux **5,6,7, 8, et 9** et (**figure 41**).

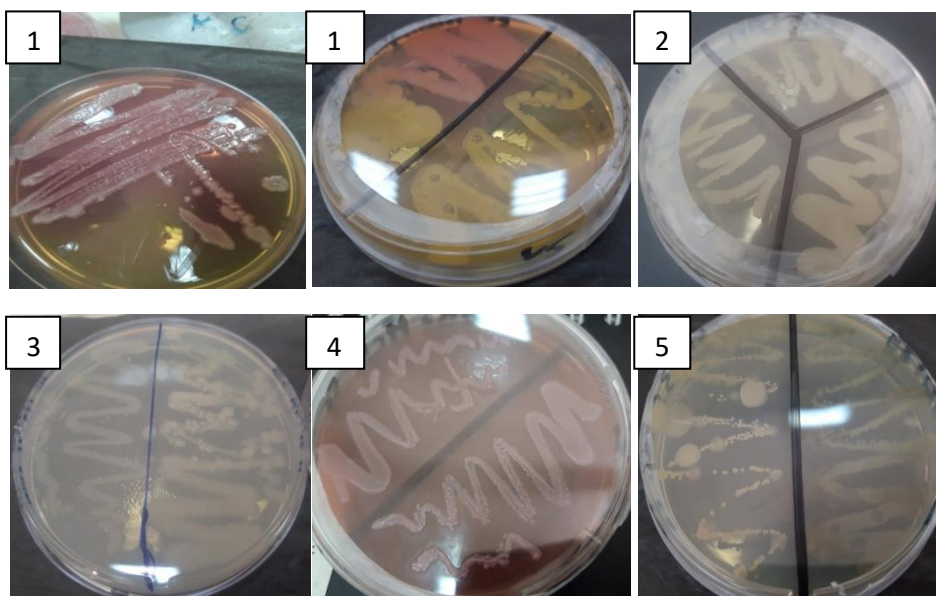


Figure 41. Aspect des colonies sur différents milieux de culture
1 : Milieu Chapman, 2 : gélose nutritif ; 3 : Mac Conkey ; 4 :Cœur Cerveille ; 5 : MRS

Tableau 5. Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E1YB.

Code Echantillon	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E1YB	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
		Forme	Couleur
Codes isolats	11 isolats		
N1, N2	Gélose nutritif	Grand colonies, arrondis, plates	Beige/Jaunâtre
C1, C2	Chapman	Arrondis/Punctiforme	Rose/Jaune
K1	Mac Conkey	Convexes et arrondies	Rose/Rouge
B1, B2	Gélose Cœur-cerveille	Arrondies/lisses	Beiges
RN1, RN2	MRS (pH=6,5)	Arrondies/Bombées	Beige/jaune
RA1, RA2	MRS (pH = 5,5)	Arrondies/Lisses	Beiges/Blanchâtre

Tableau 6. Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E2HB1

Code Echantillon	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E2HB1	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
		Forme	Couleur
Codes isolats	14 isolats		
N1, N2, N3	Gélose nutritif	Grand colonies ronde Punctiforme plates	Beige claire/ Blanche
C1, C2	Chapman	Arrondis/Punctiforme	Beige/Rose
K1, K2	Mac Conkey	Punctiforme/Irréguliere	Rose/Rouge
B1, B2, B3	Gélose Cœur-cerveille	Ronde/lisses	Blanche/Jaune
RN1, RN2	MRS (pH=6,5)	Ronde/Irréguliere	Blanchâtre/Jaune
RA1, RA2	MRS (pH = 5,5)	Ronde	Jaune/Blanche

Tableau 7. Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E2HB2

Code Echantillon	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E2HB2	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
		Forme	Couleur
Code isolats	9 souches		
N1, N2	Gélose nutritif	Punctiforme	Beige/Jaune
C1	Chapman	Arrondis/Punctiforme	Rose
K1	Mac Conkey	Ronde	Rose
B1	Gélose Cœur-cerveille	Ronde	Beige
RN1,RN2, RN3	MRS (pH=6,5)	Ronde/Punctiforme	Beige/Jaune
RA2	MRS (pH = 5,5)	Ronde/Punctiforme	Beige/Blanche

Tableau 8. Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E3ZZ

Code Echantillon	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E3ZZ	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
		Forme	Couleur
Codes isolats	9 isolats		
N1, N2	Gélose nutritif	Punctiforme/Ronde	Beige/Jaune
C1	Chapman	Punctiforme	Rose
K1	Mac Conkey	Ronde	Rose/Beige
B1, B2	Gélose Cœur-cervelle	Ronde/lisses/Punctiforme	Jaune/Beige
RN1, RN2	MRS (pH=6,5)	Ronde/ Punctiforme	Blanchâtre/Beige
RA1	MRS (pH = 5,5)	Ronde/ Punctiforme	Blanche/beige

Tableau 9. Aspect macroscopiques des isolats de l'échantillon E4FB

Code Echantillon	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E4FB	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
		Forme	Couleur
Codes isolats	8 isolats		
N1, N2	Gélose nutritif	Ronde/Punctiforme	Beige
C1, C2	Chapman	Punctiforme	Jaune/Rose
K1	Mac Conkey	Ronde	Rose
B1	Gélose Cœur-cervelle	lisses/Punctiforme	Beige
RN1	MRS (pH=6,5)	Ronde/ Punctiforme	Blanchâtre/Beige
RA1	MRS (pH = 5,5)	Ronde/ Punctiforme	Blanche/Beige

II.2. Identification des souches isolées

Au totale, 30 souches ont été sélectionnées à partir des différents échantillons analysés. Après identification des souches bien isolées sur toutes les boîtes, soit 30 souches au total (**Tableau 10**). Les souches déterminées sont classées dans le tableau descriptif ci-dessous en précisant l'origine et le type de bactérie.

II.2.1. Aspect macroscopiques et microscopique des isolats

Tableau 10. répartition des souches étudiées par échantillon selon leur aspect macroscopique et microscopiques

Code Echantillon	Forme	Gram	Catalase	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E1YB 4 souches	Forme	Gram	Catalase	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
					Forme	Couleur
N2	B	-	+	Gélose nutritif	Arrondis/Punctiforme	Beiges
C2	C	+	-	Chapman	Arrondis/Punctiforme	Beiges
K1	B	-	+	Mac Conkey	Arrondis/Punctiforme	Rose/Rouge
B1	C	+	-	Gélose Cœur-cervelle	Arrondis/Punctiforme	Beiges
Code Echantillon	Forme	Gram	Catalase	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E2HB1 10 souches	Forme	Gram	Catalase	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
					Forme	Couleur
N2 B	B	+	+	Gélose nutritif	Irrégulier	Beige claire
N2 N	B	-	+			
C1	B	+	+	Chapman	Irrégulier Rond/Punctiforme	Beige claire Jaune
C1 N	C	+	-			
K1	B	-	-	Mac Conkey	Rond/Punctiforme	Rose
B1	B	+	+	Gélose Cœur-cervelle	Rond/Punctiforme	Beige claire
B2	B	+	+			
B1 R	B	+	+			
RN1	B	-	+	MRS (pH=6,5)	Rond/Punctiforme	Vert
RN2	C	+	+		Rond/Punctiforme	Beige claire
Code Echantillon	Forme	Gram	Catalase	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E2HB2 4 souches	Forme	Gram	Catalase	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
					Forme	Couleur
C1	B	+	+	Chapman	Irrégulier	Beige claire
K2	B	-	-	Mac Conkey	Rond/Punctiforme	Rose
B1N	B	-	+	Gélose Cœur-cervelle	Rond/Punctiforme	Beige claire
B1	C	+	-			
Code Echantillon	Forme	Gram	Catalase	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
E3ZZ 5 souches	Forme	Gram	Catalase	Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
					Forme	Couleur
C1	B	+	+	Chapman	Irrégulier	Beige claire
B2	B	+	+	Gélose Cœur-cervelle	Rond/Punctiforme	Beige claire
RN1	C	+	-	MRS (pH=6,5)	Rond/Punctiforme	Beige claire
RN2	B	-	+			
RA1	C	+	+	MRS (pH = 5,5)	Rond/Punctiforme	Vert foncé

Code Echantillon	Forme	Gram	Catalase	Aspect macroscopiques des isolats sur différents milieux de culture		
				Milieu de culture utilisé	Aspect de colonies	
					Forme	Couleur
E4FB 7 souches						
N1	B	-	+	Gélose nutritif	Irrégulier	Beige claire
C1	B	+	+	Chapman	Irrégulier	Beige claire
C2	B	+	+			
C1 B	C	+	-		Rond/Punctiforme	Beige claire
K1	B	-	+	Mac Conkey	Rond/Punctiforme	Rose
RN1	C	+	+	MRS (pH=6,5)	Ronde/ Punctiforme	Beige claire
RA1	C	+	+	MRS (pH = 5,5)	Ronde/ Punctiforme	Jaune

Les figures 42, 43 et 44 représentent les résultats de l'examen microscopique des souches isolées à partir des différents échantillons prélevés et analysés. La distribution et la fréquences de chaque groupe a été également présenté dans le tableau 11. et la figure 45, 46, 47 et 48.

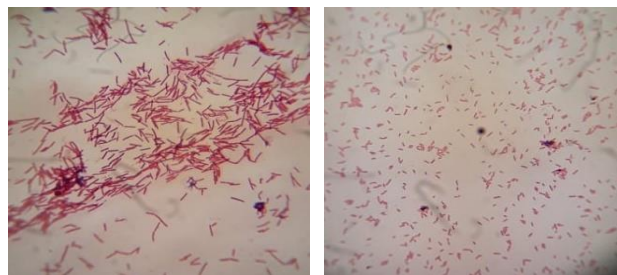


Figure 42. Bacille Gram Négatif

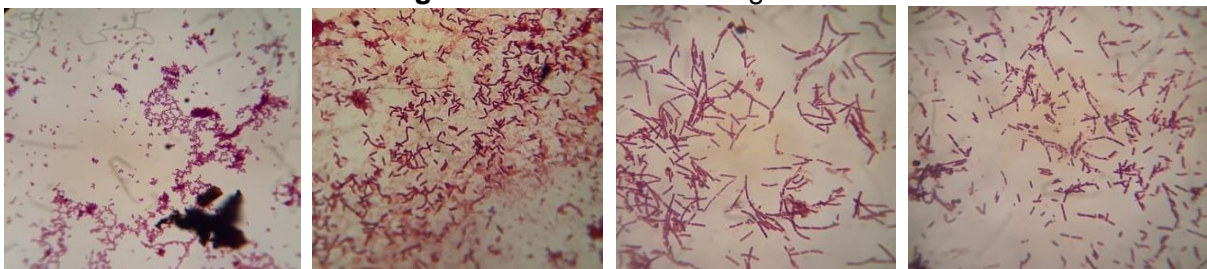


Figure 43. Bacille Gram Positif



Figure 44. Cocci Gram Positif

Tableau 11. Résultats récapitulatif de la répartition des 30 souches testées pour la formation de biofilm durant cette étude.

Échantillon	Aspect microscopique			Test catalase					
	Coloration de Gram			+			-		
	+	-		Bacille G +	Cocci G+	Bacille G -	Bacille G +	Cocci G+	Bacille G -
E1YB (4 souches)	2 C ₂ ;B ₁	0	2 N ₂ ; K ₁	0	0	2 N ₂ ; K ₁	0	2 C ₂ ;B ₁	0
E2HB1 (10souches)	2 C ₁ N; RN ₂	5 N ₂ B; C ₁ ; B ₁ B ₂ ; B ₁ R	3 N ₂ N K ₁ ;RN ₁	5 N ₂ B; C ₁ ; B ₁ B ₂ ; B ₁ R	1 RN ₂	2 N ₂ N; RN ₁	0	1 C ₁ N	1 K ₁
E2HB2 (4 souches)	1 B ₁	1 C ₁	2 K ₂ B ₁ N	1 C ₁	0	1 B ₁ N	0	1 B ₁	1 K ₂
E3ZZ (5 souches)	2 RN ₁ RA ₁	2 C ₁ ; B ₂	1 RN ₂	2 C ₁ ; B ₂	1 RA ₁	1 RN ₂	0	1 RN ₁	0
E4FB (7 souches)	3 C ₁ B RN ₁ RA ₁	2 C ₁ ; C ₂	2 N ₁ ; K ₁	2 C ₁ ; C ₂	2 RN ₁ ; RA ₁	2 N ₁ ; K ₁	0	1 C ₁ B	0

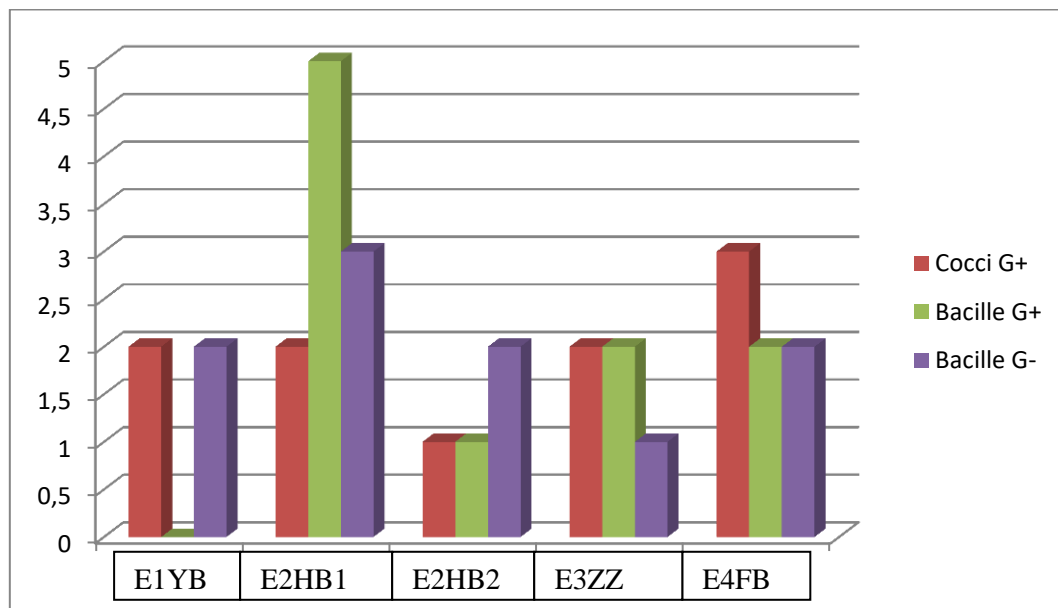


Figure 45. Distribution des souches étudiées par échantillon

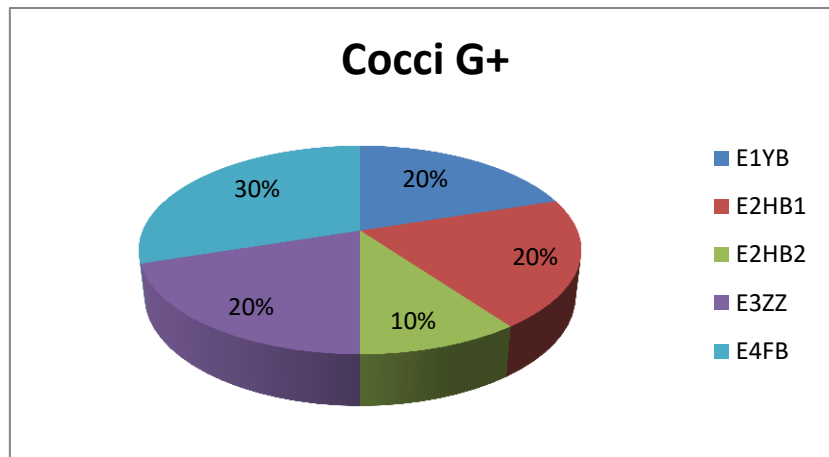


Figure 46. Distribution des Cocci G+ souches étudiées par échantillon

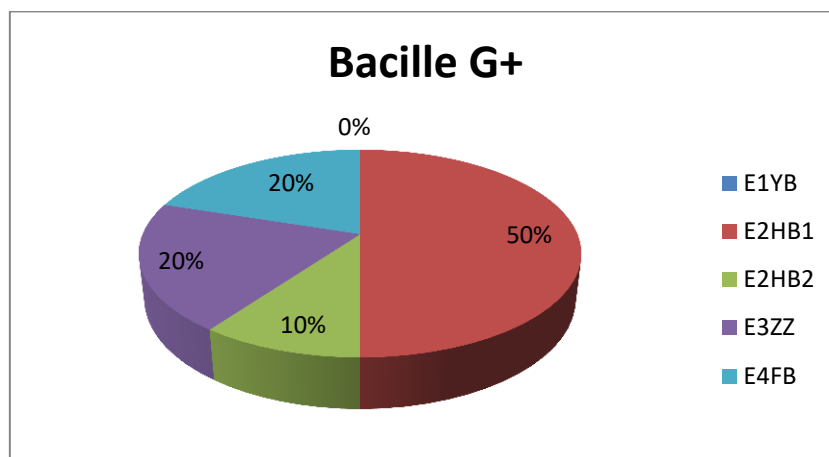


Figure 47. Distribution des bacillus G + étudiées par échantillon

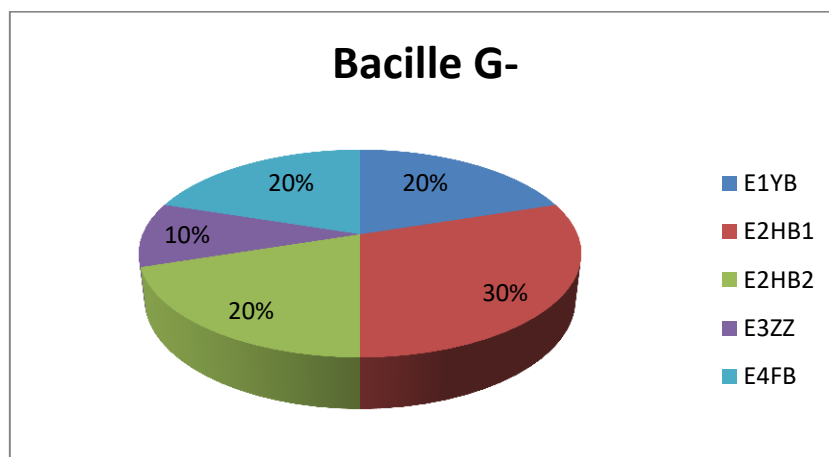


Figure 48. Distribution des bacillus G - étudiées par échantillon

II.3. Résultats Galeries API

- Les résultats de l'identification des trois souches sélectionnées par l'utilisation de la galerie API 20 Strep et 20 E, via la Base des données le site web <http://lab.upbm.org/identifieur> employé pour l'identification des souches après incubation à 37°C pendant 4h et 24h sont décrites dans le tableau 12 et figure 49 et 50.

II.3.1. Identification de la Souche E3ZZ

Caractérisation de la souche RN₂ isolée à partir de l'échantillon E3ZZ .

La souche est une bacille, Gram – et catalase (+)

- TDA : (-) ➡
- VP : (+) ➡
- URE : (-) ➡
- GEL : (+) ➡ *Serratia*

La souche identifiée est : *Serratia liquefacien*. (ID% : 100 %) (voir annexe 3)

II.3.2. Identification de souche E1YB et E2HB1

Caractérisation de la souche B1 et C1N isolées à partir de l'échantillon E1YB et E2HB1

Les deux souches sont des Cocci, Gram (+), catalase (-)

- PAL : (-) ➡
- LAP : (-) ➡
- Pyr : (-) ➡
- Sor : (+) ➡
- RAF (+) ➡
- B Gal : (-) ➡ *Aerococcus*

2.2 Identification via la Base des données <http://lab.upbm.org/identifieur/>

- Les souches sont identifiées comme *Aerococcus viridans* 1. (ID% : 99.7 %) (voir annexe 2)

Tableau 12. Lectures des API

API 20 E			API 20 strep				
Test	E3ZZ RN2.		Test	E1YB B1.		E2HB1 C1 N.	
	Lecture	Résultat		Lecture	Résultat	Lecture	Résultat
ONPG	Jaune	Positif	VP	Rouge	Positif	Rouge	Positif
ADH	Rouge	Positif	HIP	Incolore	Négatif	Incolore	Négatif
LDC	Orange	Positif	ESC	Noir	Positif	Noir	Positif
ODC	Orange	Positif	PYRA	Incolore	Négatif	Incolore	Négatif
CIT	Bleu	Positif	αGAL	Incolore	Négatif	Incolore	Négatif
H2S	Beige	Négatif	βGUR	Incolore	Négatif	Incolore	Négatif
URE	Jaune	Négatif	βGAL	Incolore	Négatif	Incolore	Négatif
TDA	Jaune	Négatif	PAL	Incolore	Négatif	Incolore	Négatif
IND	Jaune	Négatif	LAP	Incolore	Négatif	Incolore	Négatif
VP	Jaune	négatif	ADH	Rouge	Positif	Rose	Positif
GEL	Noir	Positif	RIB	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
GLU	Vert	Positif	ARA	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
MAN	Jau/vert	Positif	MAN	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
INO	Vert	Postif	SOR	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
SOR	Jaune	Positif	LAC	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
RHA	Orange	Positif	TRE	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
SAC	Jau/vert	Positif	INU	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
MEL	Jaune	Positif	RAF	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
AMY	Jaune	Positif	AMD	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif
ARA	Orange	Positif	GLYG	Org/jaune	Positif	Org/jaune	Positif



Figure 49. Lecture de résultat d'API (API20 strep) de la souche E2HB1C1N et E1YBB1.



Figure 50. Lecture de résultat d'API (API20 E) de la souche E3ZZ RN2.

II.4. Résultats des souches formatrices des biofilms

Le biofilm est important dans la pathogénie de certains microorganismes car il lui permet de persister des matériaux de collecte ou dans les installations et équipements médicaux. Dans l'industrie agro-alimentaire ce problème peut causer des dégâts et perte économiques importantes.

Dans notre étude, la détection de la formation de biofilm des souches isolées à partir des matériaux de traite a été mise en évidence par deux techniques, couramment décrites dans ce contexte à savoir ; la méthode de culture sur rouge congo agar (RCA) et la technique de coloration du biofilms formés au cristal violet (CV).

II.4.1. La Méthode de culture sur Gélose Rouge Congo (RCA)

La gélose Rouge Congo est un milieu très approprié pour la détection de la formation de biofilm (slim) par les souches bactériennes. Sur ce milieu, les souches donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches non productrices de biofilm ou négatifs.

Les 30 souches isolées et sélectionnées ont été testées pour mettre en évidence de la production de biofilm sur milieu rouge Congo (RCA). Après 24 heures d'incubation, la production de biofilm a été enregistrée sur l'ensemble des souches testées, ces dernières donnent des colonies soit de couleur noire.

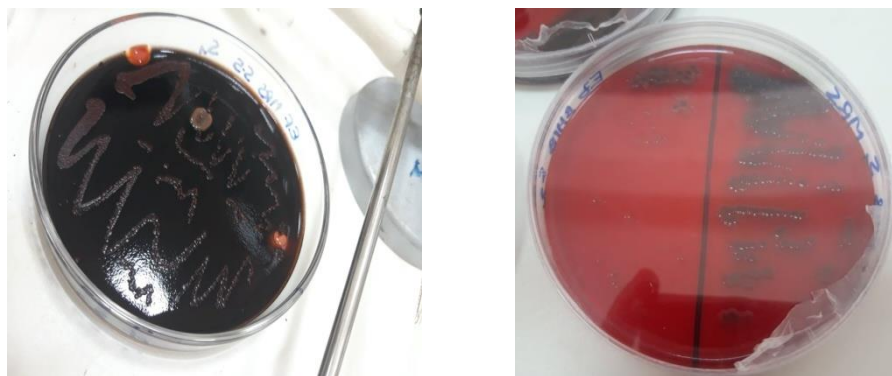


Figure 51. formation de biofilm sur milieu RCA.

De l'analyse des résultats obtenus, la méthode de RCA qui a permis de détecter la formation de biofilms chez toutes les souches étudiées. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par plusieurs travaux relatifs traitant le même sujet

Selon des travaux de (Ouchar et al., 2013) le Dépistage de la production de biofilms par la méthode Rouge Congo Agar montre que, 60% des souches étudiées, ont produit des biofilms Tandis que 20 souches soit 40% étaient non productrices des biofilms. Sur les 30 souches de Bacillus, 17 (56,66%) étaient productrices de biofilms et sur les 20 souches de

Staphylocoques 13 (65%) étaient aussi productrices. *Bacillus cereus* a montré des résultats positifs sur 7 souches parmi les 12 alors que chez les 13 souches de *Staphylococcus aureus* 9 montraient des résultats positifs, (Ouchar et al., *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 7, N°2, p : 187-210, 2013*).

l'étude de Hrv et al.(2016) et après comparaison de plusieurs méthodes phénotypiques, ont montré que la méthode RCA apparait comme une méthode efficace, simple, économique, sensible et spécifique qui peut être appliquée par les laboratoires de microbiologie clinique pour le screening de souches productrices de slime

La détection de la formation de biofilm par des microorganismes pathogènes ou de contamination dans l'industrie agro-alimentaire peut être considérée comme une étape essentielle pour la prévention et la gestion de risque sanitaire dans l'industrie agro-alimentaire.

II.4.2. La technique de coloration au Cristal violet

Cette technique c'est méthode indirecte d'estimation de la production de biofilm sur différents substrats (Djordjevic et al., 2002). La coloration absorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci.

II.4.2.1. Formation de biofilm par la méthode des tubes à essai en verre

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, les tubes contenant les cultures testées pour la formation de biofilm sont examinés et la formation de biofilm est constatée. Les biofilms formés à l'interface air liquide sont de couleur pourpre. La formation du biofilm est considérée comme positive puisque un film visible sur la paroi et le fond du tube. L'interface solide-liquide entre les parois des tubes et le milieu fournit un milieu favorable pour l'attachement et la formation de biofilm. Les résultats obtenus permettent d'observer la formation des biofilm par des souches à l'interface surface- liquide ; soit au fond des tubes ou sur les parois.

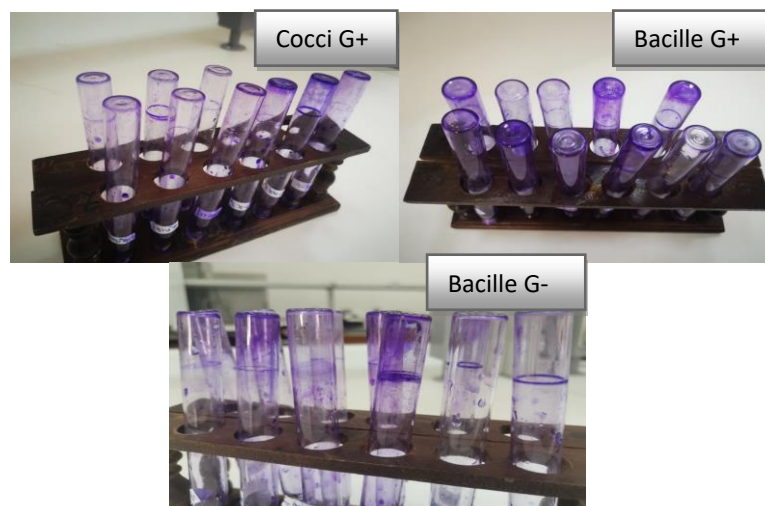


Figure 52. biofilm formé dans les tubes à essai (les résultats de 3 catégories étudiées).

La formation de biofilm par les différentes souches à Gram négatif sur le verre donne des valeurs différentes et variables. Le résultat illustré dans le tableau 13 et la figure 53 ci-après montre une bonnes formatrices de biofilms sur le verre avec des valeurs respectives de 2,5, 2,48, 2,47, 2,47 et 2,41.pour les souches E₄FB N₁; E₃ZZ RN2 ; E₂HB₁N₂ N, E₂HB₁K₁ et E₂HB₂B₁N. Toutefois, la valeur de DO la plus faible est donnée par la souche E₁YB N₂ est de 0,97.

Tableau 13. résultat de DO des souches bacille Gram négatif testées

E/S B G-	Témoin (blanc)	E ₂ HB ₁ N2 N	E ₂ HB ₁ K1	E ₄ FB N1	E ₁ YB N2	E ₄ FB K1	E ₃ ZZ RN2	E ₁ YB K1	E ₂ HB ₂ K2	E ₂ HB ₂ B1 N
DO (tubes)	0.342	2,471	2,471	2,505	0,979	2,384	2,488	1,585	2,249	2,411

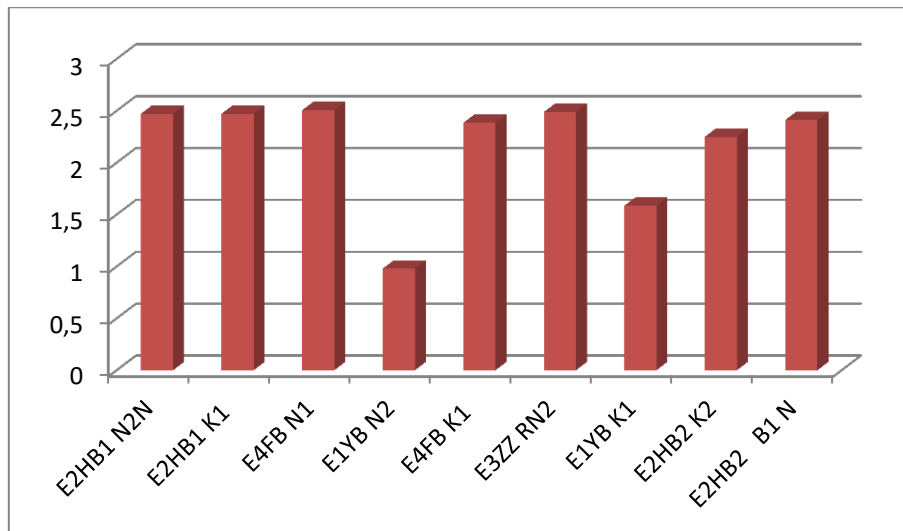


Figure 53. Résultat de formation de film par des bacilles à Gram négatif.

Le résultat pour les souches bacilles à Gram positif sont illustré dans le tableau 14 et la figure 54 ci-après. Le résultat montre une bonnes formatrices de biofilms dont les valeurs sont très importantes pour la souche E₂HB₁R avec 2,5 et la souche E₂HB₁B₁ (2,47) , et la plus faible valeur de la DO 1,9 est donnée par la souche E₃ZZC₁.

Tableau 14. Résultat obtenu de la DO des bacilles à Gram positif

E/S B G+	Témoin (blanc)	E ₄ FB C1	E ₄ FB C2	E ₃ ZZ C1	E ₂ HB ₂ C1	E ₂ HB ₁ C1	E ₂ HB ₁ N2B	E ₂ HB ₁ B2	E ₂ HB ₁ B1	E ₂ HB ₁ B1R
DO (tubes)	0.342	2,430	2,440	1,907	2,455	2,279	2,426	2,384	2,471	2,505

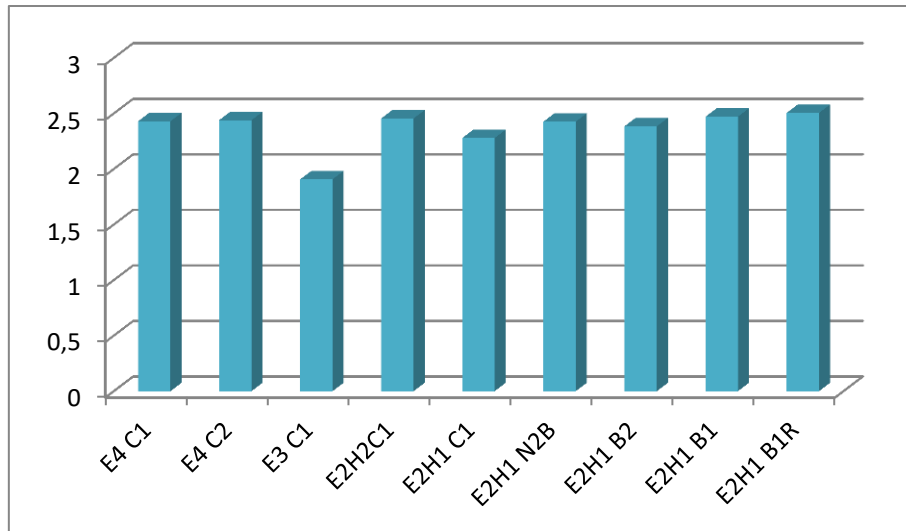


Figure 54. Résultat de formation de biofilm par les bacilles Gram positif

Pour les coques à Gram positif, le résultat obtenu est résumé dans le tableau 15 et figure 55, Les résultats montre une bonne formations de biofilm par les souches à gram positif surtout pour les souches E₃ZZRA₁ ; E₄FBRN₁ ; E₂HB₁RN₂ et E₂HB₂B₁; avec un DO 2,58 ; 2,50 et 2,47 et la faible valeur obtenu est de 1,66 pour la souche E₁YB₁.

Tableau 15. DO des souches cocci Gram positif.

E/S C G+	Témoin (blanc)	E3ZZ RA1	E4FB RN1	E4FB RA1	E4FB C1B	E2HB ₁ RN2	E2HB ₁ C ₁ N	E1YB B1	E1YB C2	E2HB2 B1
DO (tubes)	0.342	2,580	2,505	2,195	1,334	2,471	2,334	1,662	1,831	2,471

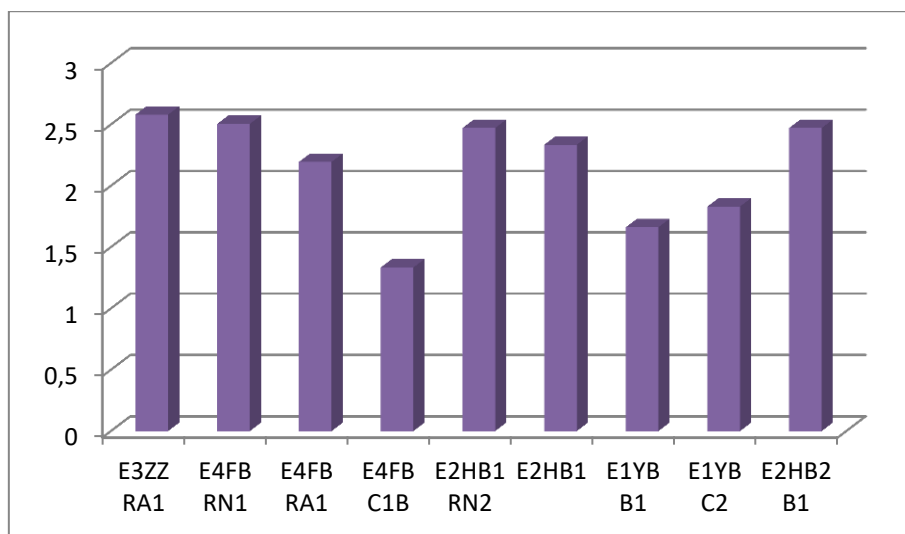


Figure 55. Résultat de formation de biofilm par des coques à Gram positif

II.4.2.2. Méthode de quantification des microplaques

Les résultats de la formation de biofilms obtenus, après 24 heures d'incubation (**Figure 56**), sont illustrés par les **figures 57, 58 et 59** et **tableaux 16, 17 et 18**. Ces résultats révèlent que les souches étudiées sont capables de former des biofilms également sur le polystyrène.

Les résultats obtenus sont décrits dans les tableaux et graphes ci-dessous :

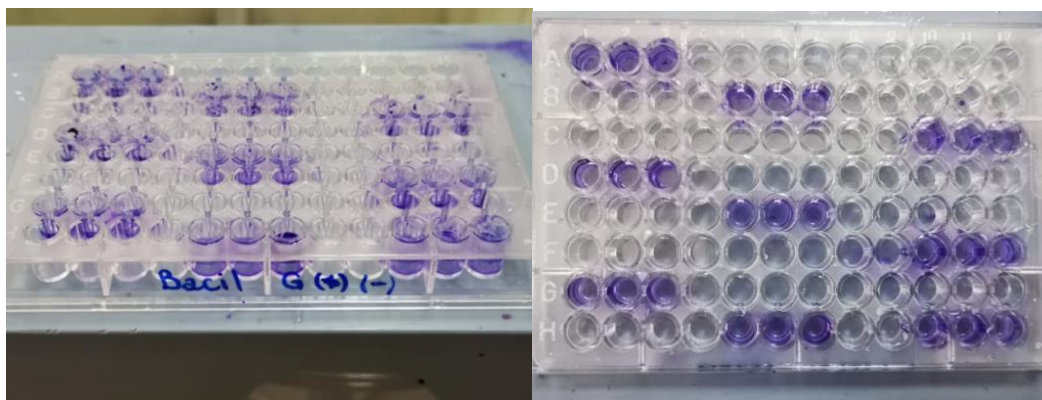


Figure 56. biofilm formé dans les microplaques à 96 puits.

Tableau 16. DO des souches bacille Gram négatif

E/S B G-	Témoin (blanc)	E ₂ HB ₁ N2 N	E ₂ HB ₁ K1	E ₄ FB N1	E ₁ YB N2	E ₄ FB K1	E ₃ ZZ RN2	E ₁ YB K1	E ₂ HB ₂ K2	E ₂ HB ₂ B1 N
DO (96 P)	0,218	2,582	0,998	2,085	1,406	1,950	2,649	1,541	1,331	1,266

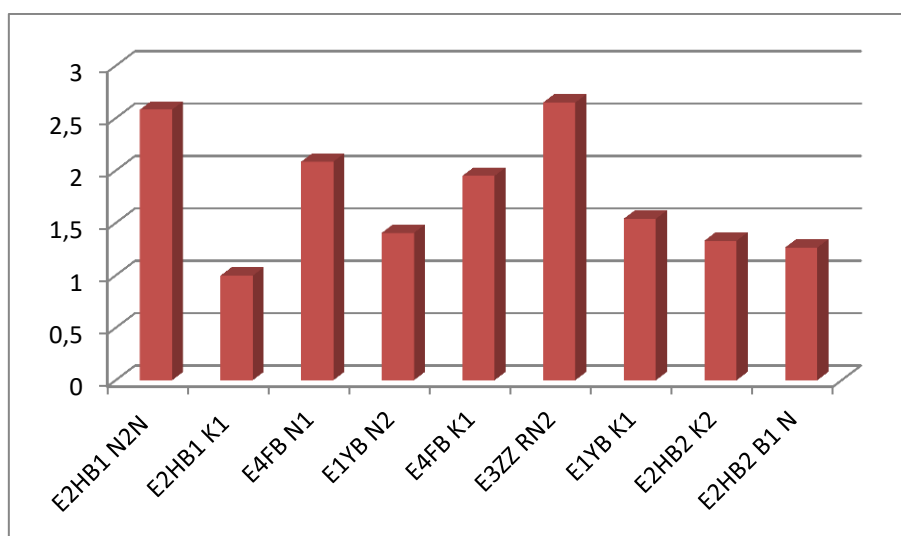


Figure 57. Résultat de formation de film pardoes bacilles à Gram négatif

Tableau 17. DO des souches bacille Gram positif

E/S B G+	Témoin (blanc)	E ₄ FB C1	E ₄ FB C2	E ₃ ZZ C1	E ₂ HB ₂ C1	E ₂ HB ₁ C1	E ₂ HB ₁ N2B	E ₂ HB ₁ B2	E ₂ HB ₁ B1	E ₂ HB ₁ B1R
DO (96 P)	0.218	2,582	2,473	2,583	2,649	2,650	2,649	2,525	2,649	2,643

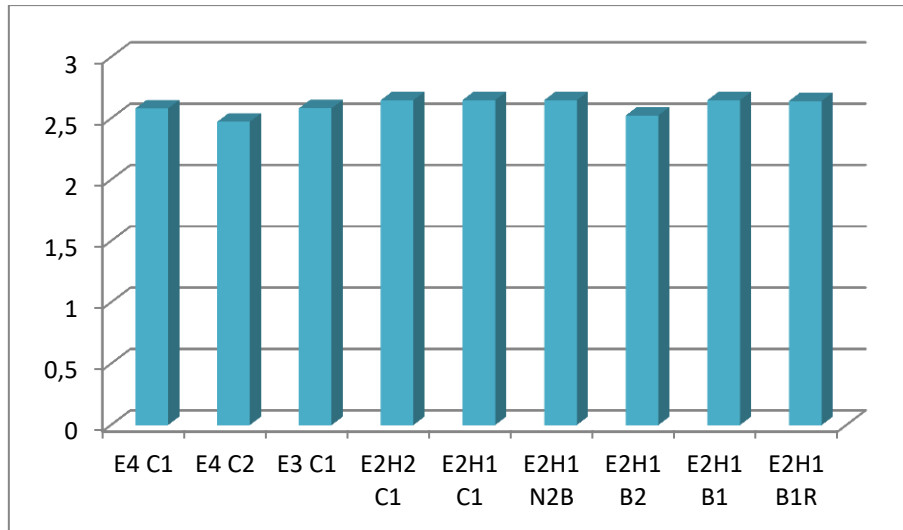


Figure 58. Résultat de formation de biofilm par les bacilles Gram positif.

Tableau 18. DO des souches cocci Gram positif

E/S C G+	Témoin (blanc)	E ₃ ZZ RA1	E ₄ FB RN1	E ₄ FB RA1	E ₄ FB C1B	E ₂ HB ₁ RN2	E ₂ HB ₁ C ₁ N	E ₁ YB B1	E ₁ YB C2	E ₂ HB ₂ B1
DO (96 P)	0.218	1,483	0,443	2,649	2,582	1,679	2,427	2,085	1,503	0,508

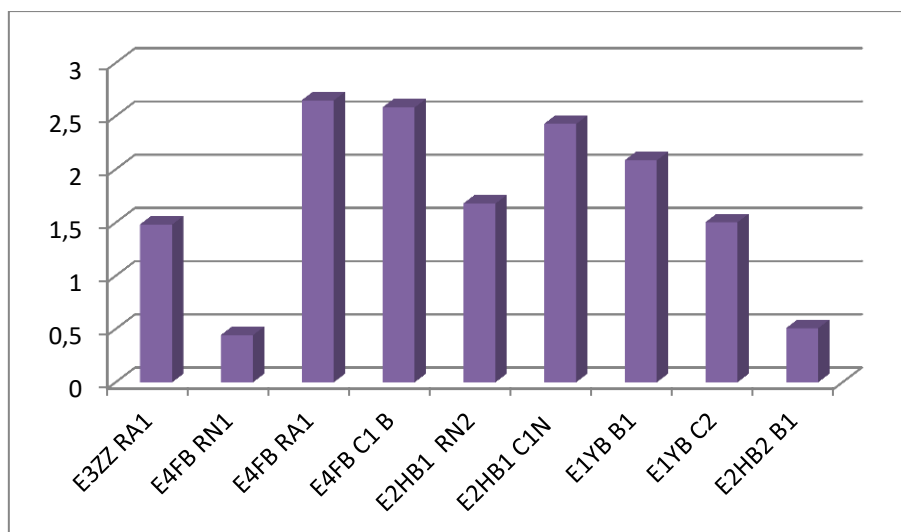


Figure 59. Résultat de formation de biofilm par des coques à Gram positif

II.5. Répartition des souches formatrices de biofilm par échantillons

Tableau 19. Pourcentage des souches bacille Gram négatif formatrice par échantillons.

Echantillon B G-	E2HB1	E4FB	E3ZZ	E1YB	E2HB2
%	22,22	22,22	11,11	22,22	22,22
Nbr	2	2	1	2	2

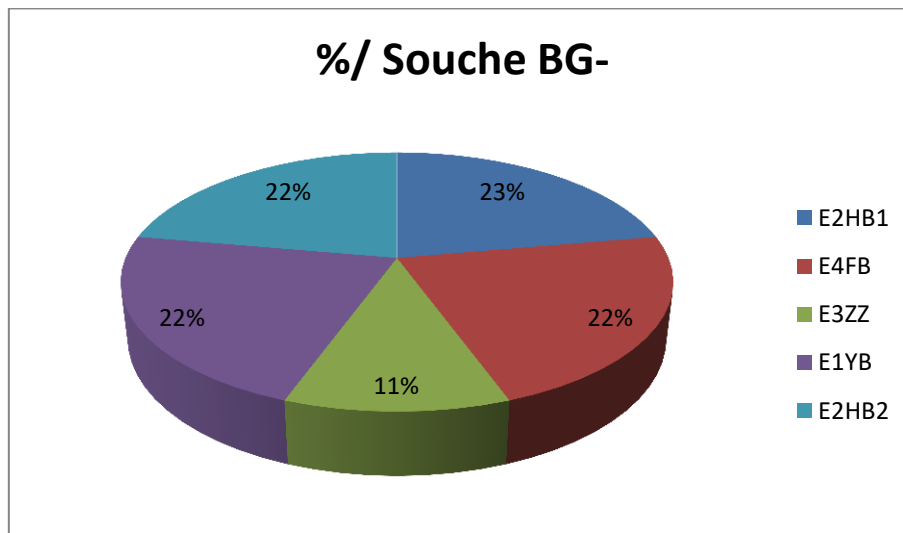


Figure 60. Répartition des souches bacille Gram négatif formatrice par échantillons.

Tableau 20. Pourcentage des souches bacille Gram positif formatrice par échantillons.

Echantillon B G+	E4FB	E3ZZ	E2HB2	E2HB1
%	22,22	11,11	11,11	55,55
Nbr	2	1	1	5

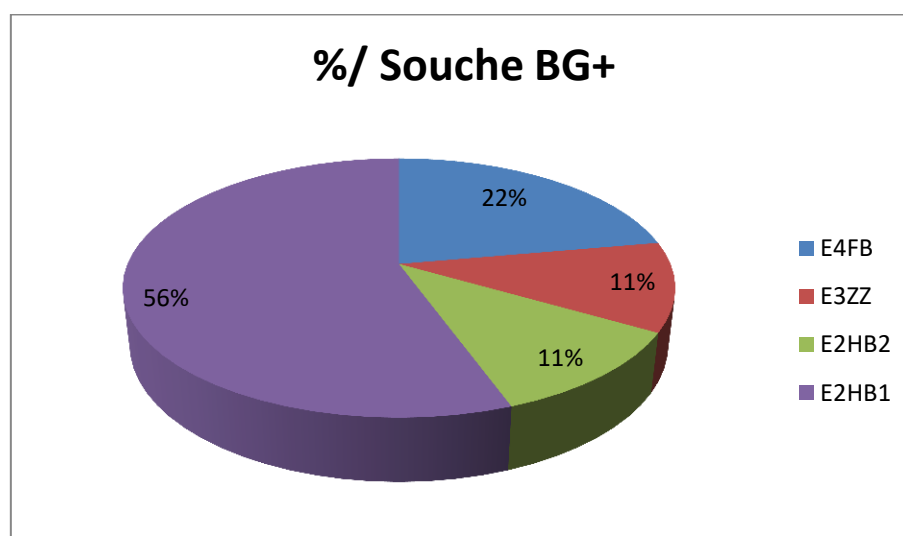


Figure 61. Répartition des souches bacille Gram positif formatrice par échantillons.

Tableau 21. Pourcentage des souches cocci Gram positif formatrice par échantillons.

Echantillon C G+	E3ZZ	E4FB	E2HB1	E1YB	E2HB2
%	11,11	33,33	22,22	22,22	11,11
Nbr	1	3	2	2	1

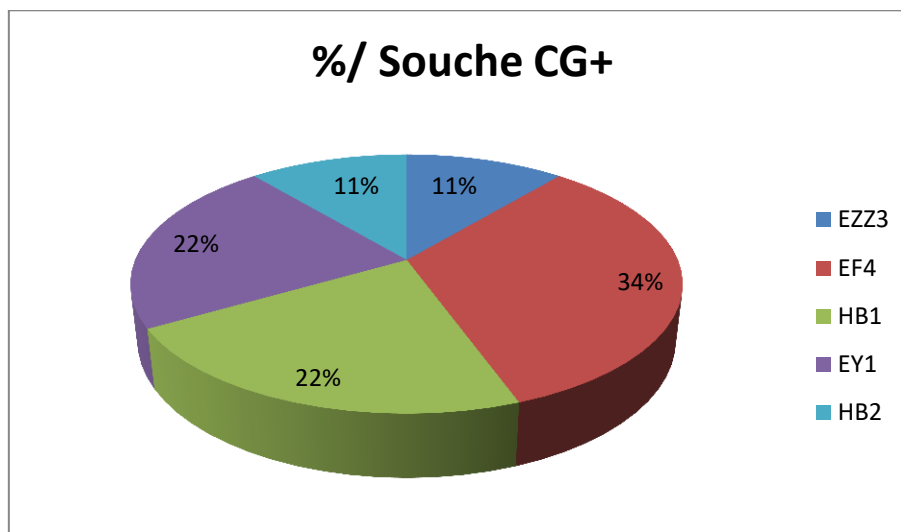


Figure 62. Répartition des souches cocci Gram positif formatrice par échantillons.

II.5.1. Interprétations des résultats

- Les résultats obtenus peuvent être résumés en calculant la moyenne des DO enregistrée selon le tableau ci-dessous :

Tableau 22. La Moyenne des DO des 03 catégories.

Souches	DO moyenne à 600 nm Tube à essais (Verre)	DO moyenne à 600 nm Microplaque (polystyrène)
Bacille Gram négatif	2.171	1.756
Bacille Gram positif	2.366	2.600
Cocci Gram positif	2.153	1.706
DO moyenne à 600 nm	2.230	2.020

- Les DO enregistrés sur la méthode des tubes à essais sont globalement supérieurs à ceux enregistrés sur les microplaques ce qui donne germes une faveur pour mieux former un biofilm sur le verre que sur le polystyrène.

- Sur le verre (la méthode des tubes), pour les 27 souches étudiées, nous constatons que 25 souches sont fortement formatrices de biofilms soit 92.59 % et 02 souches Modères formatrice de biofilm soit 7.41 % (Bacille Gram- E4 N2/ Cocci gram+ E4 C1B)

Tableau 23. classification des souches formatrices de biofilm (**la méthode des tubes**).

la méthode des tubes	
Les souches fortement	Les souches Modérées
92.59 %	7.41 %

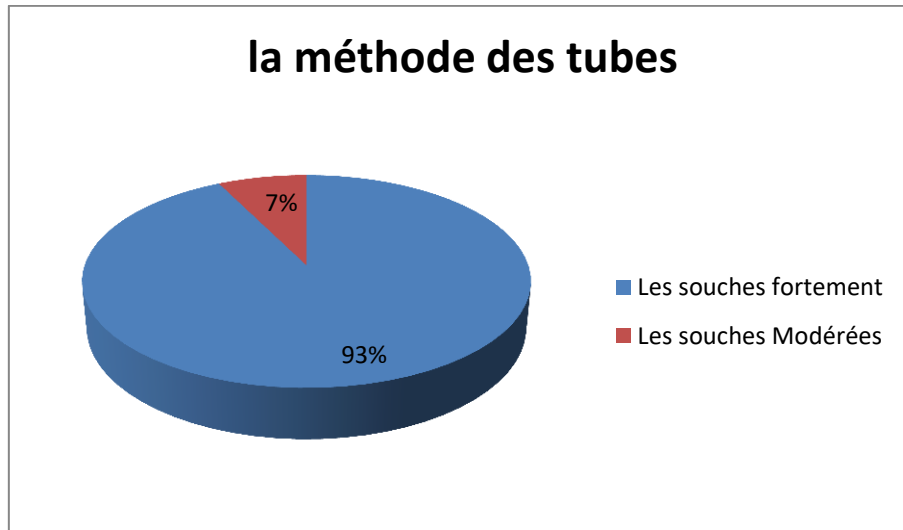


Figure 63. classification des souches formatrices de biofilm (**la méthode des tubes**).

- Sur le polystyrène (la méthode de microplaque), pour les 27 souches étudiées, nous constatons que 25 souches sont fortement formatrices de biofilms soit 92.59 % et 02 souches Modères formatrice de biofilm soit 7.41 % (Cocci Gram+ E4 RN1/ Cocci gram+ E2H2 B1).

Tableau 24. classification des souches formatrices de biofilm
(**La méthode de microplaque**).

la méthode de microplaque	
Les souches fortement	Les souches Modérées
92.59 %	7.41 %

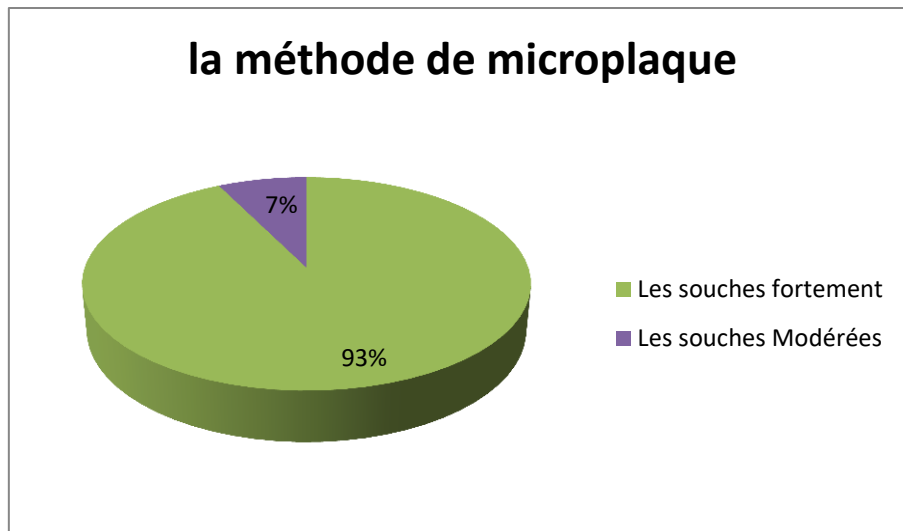


Figure 64. classification des souches formatrices de biofilm (**la méthode de microplaque**).

II.5.2. Etude Comparatif

Une étude au Canada sur staphylocoques coagulase négative (SCN), considérés comme des pathogènes mineurs pour les infections intra-mammaires dont l'objectif était d'étudier la capacité de production de biofilms par les SCN. Les auteurs ont testé les capacités de différentes espèces de SCN isolées de lait de mammites à former des biofilms. Au total, 255 isolats de SCN isolés de mammites ont ainsi été testés et les biofilms éventuellement produits. Au final, les principaux résultats furent les suivants :

- La majorité des isolats de SCN testés (85,1%) était apte à produire des biofilms.
- Les espèces de SCN dominantes isolées (85% de isolats) étaient : *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosum*, *S. haemolyticum* et *S. epidermidis*.
- Parmi ces 5 espèces, *S. xylosum* puis *S. haemolyticum* étaient celles présentant la plus grande capacité à former des biofilms alors que *S. epidermidis* avait une capacité bien moindre

- **D'autres travaux ont montré que :**

- La grande majorité des souches de *E. coli* isolées (98,5%) avait la capacité de produire du biofilm. Cette proportion est supérieure à ce que l'on retrouve dans la littérature puisque la plupart des études ont identifié environ 50% de souches capables de former du biofilm **FANTHOU Ludivine ; Thèse d'exercice ; Université de Limoges ,mai 2016**

- De même que pour E. coli (Enterobacteriaceae), **Myriam AUGER,2012** a trouvée sur 10 souches de Escherichia coli, trois souches sont fortement formatrices du biofilm, 3 modérément et 4 sont non formatrices du biofilm. **DOUDAH Hassiba,(2016) UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES)**
- Les Bacille à Gram positif, d'où dérivent les bactéries lactiques (Bacillus et lactobacillus), sont les souches les plus favorisés à former des biofilms.
- En outre les Cocci à gram positif sont faiblement formatrices de biofilm surtout en milieux polystyrène.

CONCLUSION GENERALE

L'impact des biofilms en santé animale et en santé publique est très évident. La formation d'un biofilm semble faciliter la survie des bactéries pathogènes dans l'environnement et chez leurs hôtes parce que les bactéries formant des biofilms ont des caractéristiques différentes des bactéries planctoniques. La formation d'un biofilm favorise la persistance dans la glande mammaire.

Il ressort de cette étude l'existence des biofilms multi-espèces qui amènent d'ailleurs un niveau de complexité supplémentaire à l'étude et au contrôle des biofilms. Ces bactéries ne forment que très rarement des biofilms composés d'une seule espèce bactérienne. De plus 92% des bactéries étudiées peuvent produire fortement des biofilms sur les surfaces abiotiques. Les bactéries tels que *Serratia liquefacien* et *Aerococcus viridans 1*. Provenant des échantillons prélevés (machine à traire) ont une capacité importante à former des biofilms dans les vingt-quatre (24) heures après leurs expositions, elle pourrait être considérablement stimulée dans l'absence des conditions d'hygiène. Dans ce cas, la formation de biofilms par ces bactéries peut jouer un rôle très important dans la qualité hygiénique des aliments et la santé d'animale.

Le traitement et le diagnostic de ces bactéries pathogènes sont requis. La formation d'un biofilm peut augmenter la résistance aux désinfectants. Bien que les désinfectants puissent grandement diminuer le nombre de cellules viables d'un biofilm, les cellules viables restantes représentent une source problématique de contamination.

L'efficacité des biocides/désinfectants devra être évaluée contre des bactéries d'un biofilm et non plus uniquement contre des cellules planctoniques.

En résumé, il faut développer des stratégies pour la prévention et le traitement des infections chez l'animal en tenant compte des caractéristiques du biofilm. Ainsi des procédures strictes de désinfection sont également requises permettant d'éliminer les biofilms à la ferme, sur les équipements de traire et aux installations de traire, car ces biofilms représentent des réservoirs potentiels d'agents infectieux.

Références

- Absolom D. R., Lamberti F. V., Policova Z., Zingg W., van Oss C. J., Neu A. W.** 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 90–97.
- Allion A.**2004. Mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens. Thèse de Doctorat l'ENSIA sciences alimentaires.
- Allison D. G., Gilbert P.** 1992. Bacterial biofilms. *Science Progress.* 76: 305–321.
- Banin E., Vasil M. L., Greenberg E. P.** 2005. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11076-11081.
- BARKEMA H.W., SHUKKEN Y.H ., LAM T.J.G.M. ; BEIBOER M.L . ; WILMINKII H. ; BENEDICTUSG ET BRANDA A.,**(1997). Incidence and risk factors for repeated cases of clinical. *Escheria Coli mastitis in dairy cattle.*
- BEATRICE VIOLAINE MARIE DEVERRIERE,** (2007). Reproduction expérimentale de mammites A *Staphylococcus aureus* chez la brebis : comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires, thèse d'Etat pour obtenir le grade de docteur vétérinaire , A L'école Nationale Vétérinaire De Toulouse, p32
- Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J.M. & Henry, N,** 2008, A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *Plos Biology*, 6(7), 1546- 1558.
- Benard, S., Maubois, J.L. & Tareck, A;** 1981.Ultrafiltration-thermisation du lait à la production : aspects bactériologiques. *Le lait*, 61, 435-457.
- BIDAUD O, HOUFFSCHMITT P, VIGUERIE Y.** Étiologie des mammites bovines en France entre 2005 et 2007. *Intervet*, 2010.
- BIDAUD O, HOUFFSCHMITT P, VIGUERIE Y.** Étiologie des mammites bovines en France entre 2005 et 2007. *Intervet*, 2010.
- Billon P, Sauvee O, MenardJL, Gaudinv.** 1998. Influence de la traite et de la machine à traire sur les numérations cellulaires et les infections mammaires chez la vache laitière. *Ren. Rech. Rut., Paris*, 2-3 décembre, 5 : 305-312.

BLOOD D.C, HENDERSON J.A, (1976). Médecine vétérinaire.Vigot Frères Ed., Paris 6e, p 294-331.

BLOWEY RW, EDMONDSON P. Mastitis control in dairy herds. Seconde édition. 2010. CABI, Wallingford, United Kingdom. 272 p.

BLOWEY RW, EDMONDSON P. Mastitis control in dairy herds. Seconde édition. 2010. CABI, Wallingford, United Kingdom. 272 p.

Bouaziz O, Aimeur R, Kabouia R, Brerhi E H, Smati F et Tainturier D; 2002 ; Enquête sur les mammites bovines dans la région de Constantine, 4ème Séminaire international de médecine vétérinaire, Institut National Vétérinaire Constantine, Algérie.

Bouton, Y., Guyot, P., Vacheyrou, M., Normand, A.C., Piarroux, R., Beuvier, E. 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche- Comte. Exemple des LHF. 15eme colloque du Club des Bactéries Lactiques, Rennes.

Bridier, A., Le Coq, D., Dubois-Brissonnet, F., Thomas, V., Aymerich, S., & Briandet, R. 2011. The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in Situ imaging. PLoS ONE, 6(1), e16177.

Busscher H. J., Weerkamp A. H., van der Mei H. C., van Pelt A. W. J., De Jong H. P., Arends J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. Appl. Environ. Microbiol. 48: 980–983.

Carpentier B., Cerf O. 1993. A review: Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol. 75: 499–511.

CAUTY I et PERREAU, J-M (2009), Conduite du troupeau bovin laitier production, qualité, rentabilité, édition 2P e P guide France agricole, ISBN, 987-285557-165-2. p: 66-254-258- 259.

Cécile Ferrouillet, Octobre 2004 ; médecin vétérinaire, Université du Minnesota, St Paul, Minnesota, et Jodi Wallace, médecin vétérinaire, Clinique vétérinaire Ormstown, Ormstown, Des trayons en santé ; Québec ; Le producteur de lait québécois.

Cécile LAITHIER, Flora DARTAILH, Décembre 2014;Matériel de traite et aptitude du lait cru à la transformation en technologie lactique caprine : étude des outils de diagnostic; L'importance de la qualité de l'eau, page: 11

Cécile LAITHIER, Flora DARTAILH, Décembre 2014; Matériel de traite et aptitude du lait cru à la transformation en technologie lactique caprine : étude des outils de diagnostic; Les principes du nettoyage, page: 10.

Characklis W. G., Cooksey K. E. 1983. Biofilms and microbial fouling. *Adv. Appl Microbiol.* 29: 93–138.

Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M. N., Hebraud M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Appl. Environ. Microbiol.* P: 728–737.

Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infectiology and Immunology.* 37: 318-326.

Clutterbuck, A.L., Woods, E.J., Knottenbelt, D.C., Clegg, P.D., Cochrane, C.A. & Percival, S. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 121(1-2), 1-17.

Costerton, J.W., Geesey, G.G. & Cheng K.J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-95.

Craplet, CRAPLET C, THIBIER M. (1973). *La vache laitière*. Ch 04: la lactation, pp82, 83, 101. Ch26: Mammites, pp 645, 647, 649, 650, 652-656. Paris : Vigot frères.

DAHOU, I.R ET LESLIE K.E, (1991), Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections, *preventive veterinary medicine*, 10: 225 237.

Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280: 295–298.

Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B. H., Costerton J. W., Greenberg E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280: 295–298.

Davies, G. 2000. Physiological events in biofilm formation. 37-52 p.

Dominique Remy, 2010 livre maladies des mammites ; Groupe France Agricole 10 cité Paradis 75493 Paris Cedex 10 ; page 19-21.

Dominique Remy, 2010 livre maladies des mammites ; Groupe France Agricole 10 cité Paradis 75493 Paris Cedex 10 ; page 25.

Dominique Remy, 2010 livre maladies des mammites ; Groupe France Agricole 10 cité Paradis 75493 Paris Cedex 10 ; page 23-24.

Dominique Remy, 2010 livre maladies des mammites ; Groupe France Agricole 10 cité Paradis 75493 Paris Cedex 10 ; page 57.

Donlan R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 881–890. Allison D. G. 2003. The biofilm matrix. *Biofouling*. 19: 139–150.

Donlan, R.M. & Costerton, J.W, 2002, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 15, 167- 193.

Donlan, R.M. & Costerton, J.W, 2002, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 15, 167- 193.

Donlan, R.M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.

Doyle R. J. 2000. Contribution of the hydrophobic effect to microbial adhesion. *Microbes Infect.* 2:391–400.

Dreeszen, P. H. 2003. *Biofilm: The key to understanding and controlling bacterial growth in automated drinking water systems*. 2nd ed. Edstrom industries Inc.

Eckles CH, 1913 *Dairy cattle and milk production* Mac Millan New York 342 pages; Sheldon JP 1880 *Dairy farming: being the theory, practice and methods of dairying*. Cassell and Company, Londres, 575 pages.

FABRE M. ; MORVAN H. ; LEBREUX B., HOUFFSCHMITT P ET BEATHELOT X. (1997). Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France. article2-mammites sub-cliniques. *Bulletin GTV.*, 573 (5b) :p9-1.

FAO; 1995. Food and agriculture organization. *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine*. Collection FAO alimentation et nutrition n°28. ISBN 92-5-20534-6.

Fetrow J; 1988 Culling dairy cows, Proceeding American Association of Bovine Practitioners, 20, 102 -107.

Flemming, H.C. & Wingender, J, 2010.The Biofilm Matrix, Nature Reviews Microbiology, 8, 623-633.

Frank J. F. 2001. Microbial attachment to food and food contact surfaces. Adv. Food. Nutr. Res. 43: 319-369.

Freeman DJ., Falkner FR., Keane CT. (1989). New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology .42:872-874.

GABLI Abdelhafid. (2005).Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines, thèse de doctorat en sciences vétérinaires université mentouri-Constantine p12- 13-14-25.

GEDILAGHINE, V. 2005 : La rationalisation du traitement des mammites en exploitation laitière. Conception et réalisation d'une enquête d'évaluation de la mise. POUTREL B (1984). Mammites : données épidémiologiques. Bulletin des GTV 5:25.31.

Gilbert P., Evans D. J., Brown M. R. W. 1991. Surface properties of Gram-negative bacteria in relation to growth and dispersal of biofilm (Abstr.). Biofouling. 4: 238– 238.

Gilbert P., Maira-Litran T., McBain A.J., Rickard A.H., Whyte F.W. 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. Adv Microb Physiol. 46:202–256.

Goetzi, C., Dufouri, S., Archambaulti, M., Maltouin, F. & Jacques, M. 2016.Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière. Revue de Médecine Vétérinaire, 167(7-8), 215- 229.

HANZENCH, 2010 : Pathologies de la glande mammaire : Etiopathogénie et traitements.

Harbron R. S., Kent C. A. 1988. Aspects of cell adhesion. In L. F. Melo, T. R. Bott, & C. A. Bernardo (Eds.), NATO ASI series, Vol. 145 : 125–140.

Hoffman W. 1983. CIP of straight pipes as a function of surface roughness and other factors. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Christian- Albrechts-Universität, Keil.

Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, M.L. & Shitliff, M.E. 2008. Complicated catheter associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 26-59.

JANSON JT, KELTON KF., 1999: Test characteristics of the identification specific organisms. Proceedings of the 38th. Annual Meeting of the National Mastitis Council.

JODI W., 2007 : Diagnostiquer la mammite, in : Le producteur de lait Québécois, Sept 2007.

Journal of Dairy Science, 2013, Résumé Article “Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms, (96): 234-246.

Kagkli, D.M, Vancanneyt, M., Vandamme, P., Hill, C. & Cogan, T.M.2007. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1393-1405.

Klein, G.L., Soum-Soutera, E., Guede, Z., Bazire, A., Compère, C. & Dufour A. 2011. The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling*, 27(8), 931-940.

Koutchoukali MA. 1980. Les mammites bovines dans la daïra de Constantine. Dépistage et bactériologie. Mémoire de Doctorat Vétérinaire, Université Constantine, 41 p.

Kumar, C.G. & Anand, S.K , 1998. Significance of microbial biofilms in food industry .*International Journal of Food Microbiology*, 42 (1,2), 9-27.

Labdie, J. 2001. Les biofilms microbiens dans les ateliers de transformation de la filière viande : inconvénients et intérêts potentiels. *Rencontre Recherche Ruminants*, 8, 65-69.

Labdie, J.2001. Les biofilms microbiens dans les ateliers de transformation de la filière viande : inconvénients et intérêts potentiels. *Rencontre Recherche Ruminants*, 8, 65-69.

Laithier, C. & Dartailh, F.2014. Matériel de traite et aptitude du lait cru à la transformation en technologie lactique caprine étude des outils de diagnostic, Collection Résultats Institut de l'élevage. Compte rendu n° 00 14 403 050.

Laithier, C., Chatelin, Y.M., David, V., Talon, R., Labadie, J., Barral, J., Tormo, H., Lefrileux, Y.& Morge, S. 2005. Améliorer la maîtrise de la qualité des fromages fermiers par

une meilleure caractérisation des biofilms et de leur rôle. Collection resultats. Compterendu final 150531011, 64 pages.

Lappin-Scott H. M., Costerton J. W., Marrie T.J. 1992. Biofilms and biofouling. In J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego. p:277-284.

Latorre, A.A., Pacha, P.A., Gonzalez-Rocha, G., San Martin, I., Quezada-Aguiluz, M., Aguayo-Reyes, A., Bello-Toledo, H., Oliva, R., Estay, A., Pugin, J. & Munoz, M.A. 2019. On-farm surfaces in contact with milk: The role of *Staphylococcus aureus* containing biofilms for udder health and milk quality. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(1).

Latorre, A.A., Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., Jayarao, B.M., Houser, B.A., Daugherty, C.S. & Schukken, T.H.; 2010. Biofilm dans l'équipement de traite dans une ferme laitière comme source potentielle de contamination du lait des réservoirs en vrac par *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2792-2802.

Latorre, A.A., Van Kessel, J.S., Karns, J.S., Zurakowski, M.J., Pradhan, A.K., Boor, K.J., Jayarao, B.M., Houser, B.A., Daugherty, C.S. & Schukken, T.H. 2010. Biofilm dans l'équipement de traite dans une ferme laitière comme source potentielle de contamination du lait des réservoirs en vrac par *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2792-2802.

Lebeaux, D. & Ghigo, J. M. 2012. Infections associées aux biofilms-Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale. *Médecine/Sciences*, 28(8-9), 727-739.

Leclercq-Perlat M. N., Lalande M. 1994. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *J. Food. Eng.* 23: 501±517.

LISTER J.L., HORSWILL A.R.: *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014, 4,178.

Ljungh A., Hjerten S., Wadström T. 1985. High surface hydrophobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test. *Infect. Immun.* 47: 522-526.

LOUISE ANGOUJARD P, 2013 : *Reproduction des animaux d'élevage*; 3eme Edition.

Malek, F. 2013. Le biofilm en l'industrie laitière : caractérisation, facteurs de développement et élimination. Cas du biofilm de *Bacillus creus* dans quelques laitières de la région de Tlemcen. These de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. 218 p.

Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* .24 (1):25-9.

Michel, V. 2005. Peut-on agir sur la flore microbienne du lait ? Action sur la flore. Edition GIS Alp du Nord. Pp : 1-6.

Monds R. D., Newell P. D., Gross R. H., O'Toole G. A. 2007. Phosphate dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol*. 63:656-679.

Neu T. R. 1996. Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60: 151-166.

Palmer J., Flint S., Brooks J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 577–588.

Parsek M. R., Greenberg E. P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends. Microbiol.* 13: 27–33.

Pedersen K. 1990. Biofilm development of stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water. Res.* 24: 239-243.

PLOMMET M, ROGUINSKY M., (1968). Enquête sur les germes de mammites Bull. Acad. Vet p:221-231.

Poulet, J.L ; 2013. Les bases de la traite caprine : comprendre pour bien intervenir, 4ème journée techniques caprin. 6 p.

POUTREL B. Prévention vaccinale des mammites à coliformes et staphylocoques. Supplément technique, *Dépêche Vétérinaire*. 2014, 136, 31-32.

POUTREL B., CAFFIN J-P (1988). Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulin g2 concentration in milk. *j. dairy Sci*, p: 71- 20-35-43.

Prof. Ch. Hanzen Année 2015-2016 Physioanatomie-Propédeutique et Pathologie mammaire bovine ; page : 129.

REMY D, 2010. Les mammites. Guides France Agricole.

RIOLLET C., RAINARD P., POUTREL B (26-27-28 MAI,1999). Cinétique de recrutement cellulaire et de multiplication bactérienne après infection. J. N. G T V. I N R A., Nantes, p : 67-73.

Rosenberg E., Gottlieb A., Rosenberg E. 1983. Inhibition of bacteria adherence to hydrocarbons and epithelial cells by emulsan . Infect. Immun. 39: 1024-1028.

Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E, 1980, Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett. 9: 29–33.

Rosenberg M., Kjelleberg S, 1986, Hydrophobic interactions role in bacterial adhesion. Adv. Microbiol. Ecol. 9: 353–393.

Roux, A & Ghigo, J.M. 2006. Les biofilms bactériens. Bulletin de l'Académie Vétérinaire. Tome 159. 261-268 p.

Roux, A & Ghigo, J.M. 2006. Les biofilms bactériens. Bulletin de l'Académie Vétérinaire. Tome 159. 261-268 p.

Roux, A & Ghigo, J.M. 2006. Les biofilms bactériens. Bulletin de l'Académie Vétérinaire. Tome 159. 261-268 p.

SAIDI R, KHELEF D, KAIDI R (2012). Etude de l'incidence et de l'étiologie des mammites subcliniques dans les troupeaux bovins laitiers de la région centre de l'Algérie, p142.

Sauer K., Camper A. K. 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. J. Bacteriol. 183: 6579–6589.

SERIEYS F(1985). La numération des cellulaires du lait : interprétation pour le diagnostic et le suivi des infections mammaires. Rec. Méd. Vét, p : 161-553-566.

SERIEYS, 1991 : dépistage systématique des inflammations de la mamelle, un outil de gestion sanitaire. Mammites des vaches laitières. Société Française de Buiatrie, Paris 18 et 19 décembre 1991 : 159-162.

- Sharma M., Anand S. K.** 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry – a case. *Food Control*. 13: 469–477.
- Simain-Sato, F., Rompen, E. & Heinen, E.** 2010. Biofilms bactériens et médecine dentaire. *Revue medicale de Liege*, 65, 569-573.
- Simões M., Sillankorva S., Pereira M. O., Azeredo J., Vieira M. J.** 2007. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*. 24: 249–258.
- Singh P. K., Parsek M. R., Greenberg E. P., Welsh M. J.** 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 417:552-555.
- Smoot L. M., Pierson M. D.** 1998. Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to Buna-N rubber and stainless steel. *J. Food Prot.* 61:1286–1292.
- Spenceley H., Dow C. S., Holah J. T.** 1992. Development of mixed culture biofilms on stainless steel. In: Melo, L.F., Bott T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), *Biofilms-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. pp: 395–402.
- Stanley P.M.** 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* 29:1493–1499.
- Stenström A. T.** 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 142–147.
- Stepanovic S., Circovic I., Mijac V., Švabic´-Vlahovic´ M.** 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* 20: 339–343.
- Stoodley P., Lewandowski Z., Boyle J. D., Lappin-Scott H. M.** 1999. Influence of hydrodynamic conditions and nutrients on biofilm structure. *J. Appl Microbiol.* 85: 19S–28S.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. & Costerton, J.W,** 2002, Biofilm as Complex Differentiated Communities. *Annual review of microbiology*, 56, 187-209.
- Tenke, P., Kovacs, B., Jäckel, M. & Nagy, E.** 2006. The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urologie*, 24(1), 13-20.

Terrig G. Morgan ; juin 2004 ; Guide de bonnes pratiques en élevage laitier. FÉDÉRATION INTERNATIONALE DE LAITERIE ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE ; 38 (1). Doi : ISBN 92-5-205094-9.

Thompson L. S., Webb J .S., Rice S. A., Kjelleberg S. 2005. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene rhlI in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 220:187-195.

Tremblay Y.D.M., Lamarche D., Chever P., Haine D., Messier S., Jacques M.

Tremblay, Y.D., Hathroubi, S., & Jacques, M. 2014. Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health. Canadian journal of veterinary research, 78(2), 110-116.

Tremblay, Y.D., Hathroubi, S., & Jacques, M. 2014. Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health. Canadian journal of veterinary research, 78(2), 110-116.

Van Loosdrecht M. C .M., Norde W., Zehnder A. J. B. 1990. Physical and chemical description of bacterial adhesion. J. Biomaterial Appl. 5: 91–106.

Vieira M. J., Melo L., Pinheiro M. M. 1993. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. Biofouling. 7: 67–80.

Wang, B., Tan, X., Du, R., Zhao, F., Zhang, L., Han, Y. & Zhou, Z; 2019. Bacterial composition of biofilms formed on dairy-processing equipment. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 49(5), 477-484.

Wang, B., Tan, X., Du, R., Zhao, F., Zhang, L., Han, Y. & Zhou, Z. 2019. Bacterial composition of biofilms formed on dairy-processing equipment. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 49(5), 477-484.

Weber, F ; 1985. Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports. Collection FAO Alimentation et nutrition n°47. 216 p.

Weber, F. 1985. Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports. Collection FAO Alimentation et nutrition n°47. 216 p.

Whitehead K. A., Verran J. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. Food Bioproducts Processing 84: 253–259.

Wirtanen G., Ahola H., Mattila-Sandholm T. 1995. Evaluation of cleaning procedures in elimination of biofilm from stainless steel surfaces in open process equipment. Transactions in International Chemical Engineering. 73: 1-9.

Wirtanen G., Mattila-Sandholm T. 1992. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. Lebensm.-Wiss. Technol. 25: 50–5

Wirtanen G., Salo S. 2003. Disinfection in food processing efficacy testing of disinfectants. Rev. Environ. Sci. Bio/Technol .2: 293–306.

Wirtanen G., Salo S. 2005. Improper dairy hygiene – Case studies on poor microbial ecology in the Nordic DairyNET project. In: 36th R3 – Nordic Symposium and 5th European Parenteral Conference of ESPC, 23–25, Linköping: 171–182.

Youssef M’SADAK, Leila MIGHRI, Hana BEN OMRANE, Khemais KRAIEM ; Juin 2012; Evaluation des chantiers et des équipements de traite chez des élevages bovins laitiers hors sol dans la région de Monastir (Tunisie), Nature & Technologie. n° 07. P 96 à 101, Doi : CP 4042.

ANNEXE (1)

Date :

Elevage :

1. Nom de l'éleveur :

2. Nombre de vache :

I. Exploitation et Animaux

1. Hygiène et Santé :

1.1 Présence de litière : Oui Non

1.2 Etat d'entretien de l'étable : Bon Moyen Mauvais

1.3 Etat d'entretien des animaux : Bon Moyen Mauvais

1.4 Quelle est la nature de la litière que vous l'utilisez ? Paille Autre

1.5 Fréquence de renouvellement de la litière.....

1.6 Combien de fois enlevez-vous le fumier ?

• 1 fois par jour

• 2 fois par jour

• 3 fois par jour

1.7 Visite du vétérinaire : régulière à la demande de l'éleveur

II. Mammites

1. présence des mammites dans la zone d'étude : Oui Non

*si oui, quelle est la fréquence : Peu fréquente fréquente très fréquente

2. Les mammites sont fréquentes en :

Saison : Hivernale printanière Estivale Automnale

Période : Tariessement Lactation

3. Tariessement : Existe-t-il une prévention médicale pendant le tariessement : Oui Non

Si oui,

laquelle.....

4. Le traitement est-il réalisé par : L'éleveur Le vétérinaire

5. Rencontrez-vous des échecs après traitement: Oui Non

Si oui, quelle est votre conduite :

III. La traite :

1. La traite : Manuelle mécanique

2. En cas de traite mécanique faites-vous le contrôle hygiénique régulièrement votre machine à traite?

.....
.....

3. Lavage des mains avant la traite : Oui Non

4. Désinfection de la mamelle avant la traite : Oui Non

5. Quelle est la méthode utilisée pour le nettoyage des trayons avant la traite ?

• L'eau seulement

• L'eau et le savon

• Autre

5. Elimination des premiers jets : Dans un récipient Au sol

6. Est-ce que la traite des vaches mammites se fait au même temps que les vaches seinent

Oui Non

IV. Machine à traire :

1. Etat de fonctionnement et d'entretien : Bon Moyen Mauvais

2. Nettoyage de la machine à traire : Oui Non

3. Nombre de fois de nettoyage de la machine à traire.....

ANNEXE (2)

api® 20 Strep

07625J - fr - 2009/01

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide HIPpurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β-glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique-β-naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
αGAL	6-bromo-2-naphtyl-αD-galactopyranoside	0,0376	α-GALactosidase	Incolore		Violet	
βGUR	acide naphthol-ASBI-glucuronique	0,0537	β-GIUcuRonidase	Incolore		Bleu	
βGAL	2-naphtyl-βD-galactopyranoside	0,0306	β-GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-β-naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
				4 h	24 h	4 h	24 h
RIB	D-ribose	1,4	acidification (RiBose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
ARA	L-arabinose	1,4	acidification (ARABinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
SOR	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
INU	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
RAF	D-raffinose	3,12	acidification (RAFFinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
AMD	amidon (2)	2,56	acidification (AMiDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
GLYG	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

(1) Lors d'une deuxième lecture après 24 heures d'incubation, on peut remarquer un dépôt dans les tubes où ont été ajoutés les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal et ne doit pas être pris en considération.

(2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.

(3) Une coloration rose pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION p. II

BIBLIOGRAPHIE p. III
TABLE DES SYMBOLES p. IV

bioMérieux, le logo bleu, API et **apiweb** sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.
























bioMérieux SA
au capital de 12 029 370 €
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11




Imprimé en France

ANNEXE (3) : TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ ⁻ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

ANNEXE (3) : TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISEE API 20E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' α -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ ⁻ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		