REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir un diplôme de **Master**

En Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliqué

Présenté Par :

BOUDJELLAL Soumia

BOUHDJILA Imane

Thème :

Etude du profile de résistance aux antibiotique in vitro des entérobactéries isolés de lait de mammites ovine

Soutenance publiquement le : 19/06/2018

Devant le jury :

Mr. ACHEK R.	**MAB**	**Université de Médéa**	**Encadreur**
Mr. AZZI O.	**MAA**	**Université de Médéa**	**co-promoteur**
Mr SALEM S.	**MCB**	**Université de Médéa**	**Présidente**
Mme DJENAN Z.	**MAA**	**Université de Médéa**	**Examinatrice**
Mme Boumediene F.	**MAA**	**Université de Médéa**	**Examinatrice**

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant qui nous a donné autant de courage, de volonté, de santé et de patience durant nos années d'études et surtout pour réaliser ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent particulièrement à :

Notre encadreur ***Mr.ACHEK Rachid*** *qui à nous suivi et dirigé tout au long de nos recherches et n'as pas manqué de nous aider par des orientations et des renseignements scientifiques.*

Mes très spéciaux remerciements à notre co-promoteur ***Mr.AZZI Omar*** *qui nous en conseillé et veillé notre progression et entrainé notre voie vers la réussite.*

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements aux honorables membres de jury qui nous font l'honneur d'évaluer ce mémoire:

Nous sommes particulièrement très reconnaissantes à ***Mme SALEM Sabiha*** *, maître de conférences, d'avoir accepté de juger notre travail en tant que présidente ainsi nous adressons également nos remerciements aux respectueux* ***Mme DJENAN Zahia,*** *maître assistant A et* ***Mme BOUMEDIENE Farida****, maître assistante A, de bien vouloir évaluer, juger et examiner ce mémoire.*

Nous remercions également ***Mr.BOUDJABOUR*** *Abdelmadjid pour leur aide en statistique*

Nos plus sincère gratitude à notre respectable Doyen Professeur ***OUMOUNA Mustapha****, qui nous a facilité à suivre nos travaux dans les LPB, et mis à notre disposition le laboratoire pour mener bien ce travail.*

Au terme de ce travail, nous aimerions présenter nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance à tous nos enseignants du département de Biologie de l'université de MEDEA

Dédicaces

Je dédie cette thèse A,

Tous ceux qui me sont proches et chers, A mon cher grand père rabi yarahmo.

Mes parents

Papa LAMMI

Maman DHEIBA

Pour leur soutien permanent dans mes études et dans ma Vie, leur confiance en moi, leurs encouragements, et leur amour. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être toujours avec moi. Quoique je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi.

Mes très chers grand-mère ***Rokia*** *et* ***Fatma*** *et ma grand-père* ***Lhadj Aissa*** .

Mes très chers frères ***Mouhamed ,Lakhdar ,Zakaria, Omar***

Mes très chers sœurs ***Imane , Ritadje***

Mes très chères amies

En particulier: ***Sousou, Fatima zohra, Noura , Asma*** *et* ***Hala*** *je vous souhaite tous un avenir plein de succès, de bonheur et de santé.*

A toute ma famille, mes amies, à tous ceux qui me sont chers, A tous ceux que j'ai omis de citer, je dédie cette thèse.

Soumia

Je dédie cette thèse à:

Mes très chers parents

Papa Azize

Maman Samia

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi durant mes longues années d'études. Je n'aurais jamais espéré avoir de meilleurs parents. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité. Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer réellement votre juste valeur, mon profond amour que je vous porte, mon respect et ma vive gratitude. Votre confiance et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour persévérer et continuer toujours vers l'avant.

Je mets entre vos mains, le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être toujours avec moi. Quoique je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi.

Mes très chers sœurs Mayar , Lilya et Assile

Mon très cher frère Haithem

Veuillez trouvez dans ce travail un modeste témoignage de mon amour et toute ma gratitude, de mon affection la plus sincère et de mon attachement le plus profond. Je vous souhaite une belle vie.

Mes très chères amies

En particulier: Soumia, , zahra , liela, et aimad, je vous souhaite tous un avenir plein de succès, de bonheur et de santé.

A toute ma famille, mes amies, à tous ceux qui me sont chers,
A tous ceux que j'ai omis de citer, je dédie cette thèse.

Imane

Résumé

Les mammites constituent une entité pathologique très importante, car, elles entrainent des pertes économiques lourdes ainsi que des risques sur la santé humaine étand donné que le lait peut être une source d'antibiorésistance.

Cette étude a été entreprise dans le but de déterminer la fréquence et le profil de l'antibiorésistance des entérobactéries isolés de lait cru des mammites ovins , dans la wilaya de MEDEA. Durant cette période d'étude on a analysé bactériologiquement 228 prélèvements de lait de mammites ; et nous avons isolées 21 souches (9,21%) d'entérobactéries. parmi les entérobactéries isolées, *E.coli* était la plus fréquemment retrouvée avec un taux de 71,43% puis l*'enterobacter cloaceae* à 19,05%. Les résultats de l'antibiogramme montrent que les antibiotiques les plus actifs sur nos souches sont la céfotaxime , colistine; chloramphénicole ,Ofloxacine et Gentamycine et kanamycine, et montré aussi des taux de résistances variables vis-à-vis de l'Amoxiciline+acide clavulanique, ampiciline, cefalotine et Sulfaméthoxazol + trimithoprime.

Mots clés : Brebis, Mammite clinique, Entérobactérie, *E.coli* , Antibiorésistance.

Summary

.

Mastitis is a very important pathological entity because it causes heavy economic losses as well as risks to human health as milk can be a source of antimicrobial resistance.

This study was undertaken with the aim of determining the frequency and the profile of the antimicrobial resistance of Enterobacteriaceae isolated from raw milk of ovine mastitis, in the wilaya of MEDEA. During this study period, 228 samples of milk from mastitis were analyzed bacteriologically; and we isolated 21 strains (9.21%) of enterobacteria. among isolated enterobacteria, E. coli was most frequently found at 71.43% and enterobacter cloaceae at 19.05%. The results of the antibiogram show that the most active antibiotics on our strains are cefotaxime, colistin; chloramphenicol, Ofloxacin and Gentamycin and kanamycin, and also showed variable resistance rates to Amoxicillin + clavulanic acid, ampicillin, cefalotin and sulfamethoxazol + trimethoprim.

Key words : Sheep, Clinical Mastitis, Antibiotic resistance, *E.coli* , Enterobacteria

الملخص

يعتبر التهاب الضرع السريري من الأمراض الخطيرة جدا كونه سبب خسائر اقتصادية فادحة وكذلك مخاطر على صحة الإنسان حيث أن الحليب يمكن أن يكون مصدراً لمقاومة المضادات الحيوية.

أجريت هذه الدراسة بهدف تحديد مقاومة مضادات الميكروبات من بكتيريا المعوية المعزولة من الحليب الخام للاغنام مصابة بالتهاب الضرع السريري، في ولاية المدية خلال فترة الدراسة هذه ، تم تحليل 228 عينة من الحليب. وعزلنا 21 سلالة (9.21 ٪) من البكتيريا المعوية.

E.coli هي الاكثر عزلا بنسبة 71.43٪ تليها *Enterobacter cloaca* بمعدل 19.05٪. تظهر نتائج المضاد الحيوي أن المضادات الحيوية الأكثر نشاطا على سلالاتنا هي سيفوتاكسيم ، كولستين ؛ كلورامفينيكول ، أوفلوكساسين و جينتاميسين و كاناميسين ، وأظهرت أيضا معدلات مقاومة متغيرة لحمض أموكسيسيلين + كلافولانيك ، أمبيسيلين ، سيفالوتين و سلفاميثوكسازول

الكلمات المفتاحية : الاغنام ,التهاب الضرع السريري ,البكتيريا المعوية , *E.coli* , مقاومة المضادات الحيوية.

Table des Matières :

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction ……01

I. Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Mammite ovine

I .1. Définition……03

I.2. Différent type des mammites……...03

I.2.1. Les mammites cliniques……03

I.2.1.1. Mammite suraiguë……03

I.2.1.1.1. Mammites gangreneuses……04

I.2.1.1.2. mammites paraplégiques……04

I.2.1.2. Mammite subaiguë et aiguë……04

I.2.1.3. Mammite chronique……04

I.2.2. Mammite subclinique……05

I. 3. Les germes impliqués lors de mammites……05

I.3.1. Pathogènes majeurs……...05

I.3.1.1. *Staphylocoque a coagulase positive*.....05

I.3.1.2. *Streptococcus*……..06

I.3.1.3. *les entérobactérie*……....06

I.3.2. Les pathogènes mineurs……08

I. 3.2.1. *Arcanobacterium Pyogènes*……..…..08

I.3.2.2. *Staphylocoques à Coagulases Négatives (SCN*)……08

I.3.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*……..09

I.3.2.4. *Corynébactéries*…….09

I.3.2.5. *Mannheimia haemolytica*……...……09

I.3.2.6. *Mycoplasmes*…….……09

I.3.3. D'autres germes…….……10

I.3.3.1. Les agents mycosiques……..……10

I.3.3.2. Virus…….10

I.4. Pathogénie……11

I.5. Importance des mammites……11

I.5.1. Aspect économique……11

I.5.1.1. Diminution de la production laitière et de réforme…….12

I.5.1.2. Coût de traitement……12

Chapitre II.: Les Entérobactéries

II.1.Généralités sur les entérobactéries…….13

II.2. Habitat……14

II .3.Les caractères bactériologiques…….14

II .3.1.Les caractères morphologiques……..14

II .3.2.Les caractères culturaux……..14

II .3.3.Les caractères biochimiques……...….14

II.3.4.Production d'hydrogène sulfuré (SH2)……...…..15

II .3.5.Recherche de l'uréase……..……15

II.3.6.Production d'indole…….…….15

II .3.7.Recherche des décarboxylases……15

II.3.8.Recherche des désaminases oxydatives……16

II .3.9.Utilisation du citrate de Simmons(CS)……16

II.3.10.Utilisation du malonate……..16

II.3.11.Action de la phényl-alanine désaminase (Ph-al-Da)……...16

II.3.12.Milieu au citrate de christensen (CC)…….…17

II.3.13.Recherche de l'acétoïne ou réaction de voges-Proskauer (VP)……..17

II.3.14.Test à l'ONPG (Orthonitrophényl-β-D-galactopyranosidase)……....17

II.4. Etude des principaux genres……..17

II.4.1.*Escherichia coli*……17

II .*4.2.Klebsiella pneumoniae*……18
II.*4.3. Enterobacter cloacae*…….…….19
II.*4.4. Citrobacter freundii*……...……..20

Chapitre III : Les antibiotiques et mécanismes de résistance

III.1.Définition des antibiotiques ……..21
III.2. Mode d'action des antibiotiques……21
III.3.La résistance aux antibiotiques ……..23
III.3.1. L'origine génétique de la résistance et modalité de transfert génétique…….23
III.3.1.1. Résistance naturelle……..23
III.3.1.2. Résistance acquise……24
III.3.1.2.1. Mutation chromosomique (évolution verticale)……24
III.3.1.2.2. Acquisition de gène de résistance (évolution horizontal)…….24
III.3.1.3.Résistance croisée et Co-résistance ……..27
III.4. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques……...27
III.5. La sensibilité aux antibiotiques ……..30

II. Matériel et Méthodes :

II.1. Problématique et objectifs……...31
II .2.Cadre et période d'étude…….31
II.3.Fiche d'enquête……31
II.4. Matériel biologique ……32
II.4.1. Les animaux……32
II .4.2.Matériels de prélèvements de lait ……32
II.4.3. Milieux de culture et produits ……..32
II. 4.4.Milieux de culture ……32
II.4.6. Réactifs des tests biochimiques ……33
II. 4.7.Antibiotiques en disques ……..33
II.5.Matériels non biologique ……34

II.6.Méthodes d'analyse de lait ……36
II.6.1.Technique de prélèvement du lait ……..36
II.6.2.Enrichissement ……....37
II.6.3.Isolement et purification……...37
II.6.4.Identification……38
II.6.4.1.Identification morphologique……38
II.6.4.1.1.Etude macroscopique……..38
II.6.4.1.2.Etude microscopique……..38
II.6.4.2.Identification biochimique……38
II.6.5. Ensemencement d'une galerie API 20 E……..38
II.6.6.Calculer le profil numérique……..39
II.6.7. Conservation des souches bactériennes ……40
II.6.8.Etude de l'antibiorésistance des souches isolées……40
II.6.8.1.Principe ……40
II.6.8.2.Préparation de l'inoculum pour réalisé l'antibiogramme……..41
II.6.8.3.Ensemencement……..41
II.6.8.4.Application des disques d'antibiotiques et incubation ……..42
II.6.8.5.La lecture……43

III. Résultats et discussion :

III.1.Résultats de l'enquête épidémio-clinique……44
III.1.1.La brebis……...44
III.1.1.1.L'âge……..…44
III.1.1.2. Numéro de lactation……46
III.1.1.3. Stade de lactation……47
III.1.1.4. Les conditions d'élevage……..….49
III.1.2.Aspect clinique des cas de mammites ovines a entérobactérie……..….50

III.1.2.1.La zone du prélèvement…….52

III.1.2.2. la fréquence saisonnière des mammites a entérobactéries chez la brebis…….53

III.2.Analyse microbiologique……..55

III.2.1.Identification spécifique…….……57

III.2.2.Nature et prévalence des différentes espèces d'entérobactéries isolées…….58

III.3.Résultats de l'antibiogramme ……59

III.3.1.*E.coli*……..…..65

III.3.2.*Enterobacter cloacae*…….……..66

III.3.3.*Klebsiella pneumoniae*.....67

III.3.4.*Citrobacter freundii* …….……68

Conclusion……...69

Référence bibliographique

Annexe

Liste des tableaux :

Tableau N° 01 : Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.

Tableau N° 02 : Les Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.

Tableau N° 03: Proportion des mammites des ovins a entérobactérie en fonction de l'âge des brebis.

Tableau N° 04 : Répartition des mammites clinique a entérobactérie des brebis en fonction de numéro de lactation.

Tableau N° 05 : répartition des cas de mammites clinique a entérobactérie en fonction de stade de lactation.

Tableau N° 06 : Les conditions d'élevages

Tableau N° 07 : Informations cliniques sur les cas des mammites ovine a entérobactérie

Tableau N° 08 : Répartition de cas de mammites a entérobactéries en fonction de la zone du prélèvement.

Tableau N° 09 : Répartition des entérobactéries dans lait des brebis en fonction des saisons

Tableau N° 10 : Les résultats des prélèvements

Tableau N° 11 : fréquence des différentes espèces d'entérobactéries isolées

Tableau N° 12 : La sensibilité et la résistance de différentes souches d'entérobactéries isolées aux antibiotiques

Tableau N° 13: statistique sur les résultats d'antibiogramme

Tableau N° 14 : La sensibilité des souches des entérobactéries aux antibiotiques testé

Tableau N° 15 : La sensibilité et la résistance de différentes espèces isolées aux antibiotiques testées

Liste des figures :

Figure N° 01 : Cibles des principaux antibiotiques

Figure N°02 : Les trois mécanismes de transfert génétique

Figure N°03 : Représentation schématique de la méthode d'isolement et d'identification bactérienne.

Figure N°04 : Des prélèvements au lait prés a enrichis

Figure N° 05 : Enrichissement du prélèvement au lait

Figure N° 6 : Les étapes de conservation d'une souche bactérienne

Figure N°07 : Préparation de l'inoculum bactérienne utilisé dans l'antibiogramme

Figure N°08 : Ensemencement de l'inoculum bactérienne sur gélose MH

Figure N° 09 : Application des disques d'antibiotiques

Figure N°10: répartition des mammites ovines a entérobactérie en fonction de l'âge

Figure N°11: répartition des mammites ovines a entérobactérie en fonction de numéro de lactation.

Figure N°12: répartition des mammites ovines a entérobactérie en fonction de stade de lactation

Figure N°13 : La fréquence des différents signes cliniques lors des mammites à entérobactéries.

Figure N°14 : Prévalence selon état de mamelle lors des mammites à entérobactéries.

Figure N°15: Prévalence selon l'aspect du lait lors des mammites à entérobactéries.

Figure N°16 : Prévalence des mammites clinique chez les brebis dans les zones du prélèvement

Figure N°17: Fréquence saisonnière des cas de mammites a entérobactéries.

Figure N°18 : isolement des entérobactéries sur milieu Héktoen

Figure N°19 : Fréquence des entérobactéries isolée au lait des mammites clinique.

Figure N°20 : Observation microscopique d'entérobactéries

Figure N°21 : profile biochimique *d'E.coli* sur galerie API 20 E.

Figure N°22 : Profile biochimique de *klebsiella pneumonia* sur galerie API 20 E

Figure N°23 : Répartition des espèces des entérobactéries isolée par quartier

Figure N°24: Sensibilité aux ATB des isolats des entérobactéries

Figure N°25 : Profil de sensibilité et résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Figure N°26 : Pourcentage de sensibilité et de résistance des ***E.coli*** aux Antibiotiques

Figure N°27 : Pourcentage de sensibilité et de résistance des *Enterobacter cloacae* aux Antibiotiques

Liste des abréviations			
ADH	Arginin D'hydrolase	MCF	mac farland
ADN	Acide désoxyribonucléique	µg	micro-gramme
A.M.C	Acétyle méthyl carbinol	MH	Muller Hinton
API 20 E	Appareillage et Procédé D'Identification	ml	millilitre
ARN	Acide Ribonucléique	MLS	Macrolide lincosamides streptogramine
ATB	Antibiotique	MV	Maedi-visna
C°	Degré Celsius	ODC	Ornithine Décarboxylase
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie	OMS	Organisation Mondiale De La **S**anté
CC	Citrate de Christensen	ONPG	Ortho-nitrophényl-β-galactosidase
CCS	centre de coordination et de sauvetage	P%	Pourcentage
CLST	Centre local de service communautaire	p	Probabilité
CO2	Dioxyde de carbone	PH	Potentiel d'Hydrogène
CS	Citrate de simmons	Ph-al-DA	Phénylalanine désaminase
DHFR	Dihydrofolate réductase	PLP	Protéine De Liaison A La Pénicilline
DHFS	Dihydrofolate	R	Résistante
DO	Densité Optique	S	Sensible

Fe	Fer	SCN	Staphylocoques à coagulase négative
GEL	Gélatine	SNC	Système nerveux central
GN	Gélose nutritif	TDA	Tryptophane Désaminase
I	Intermédiaires	TSB	Bouillon tryptophane soja
INRA	Institut national de la recherche agronomique	URE	Urées
IPA	Institut Pasteur d'Algérie	VP	Vogue Paskaeure
ISO	International Organization for Standardization		
K.P	*Klebsiella pneumoniae*		
LDC	Lysine Décarboxylase		

Introduction

La mammite est une maladie importante chez les moutons, ayant un impact direct sur l'économie et le bien-être des animaux. Les pertes sont marquées par une diminution du rendement de lait, l'altération de sa qualité, l'augmentation du taux de réforme et le cout de traitement **(Jones & Watkins, 2000 ; Menzies & Ramanoon, 2001 ; Bergonier & Berthelot, 2003 ; Kiossis et *al*., 2007 ; Leitner et *al*., 2008).** Parmi, les incidences de cette affection, on note aussi, un retard de croissance chez les agneaux au pré-sevrage, et augmentation de leur mortalité **(Watson & Buswell, 1984 ; Fthenakis & Jones, 1990 ; Keisler et *al*., 1992 ; Clements et *al*., 2003).**

La maladie est habituellement partagée en deux aspects, cliniques où le diagnostic se fait visuellement ou par la palpation et subclinique (asymptomatique) qui est principalement diagnostiquée par l'intermédiaire de l'évaluation des cellules somatiques et/ou de la recherche des agents étiologiques **(Keisler et *al*., 1992 ; Radostits et *al*., 2000 ; Clements et *al*., 2003 ; Blagitz et *al*., 2012).**

Au cours des cinquante dernières années, les antibiotiques ont joué un rôle crucial dans la lutte contre de nombreuses maladies et infections et leur développement a révolutionné le traitement des maladies infectieuses. Leur découverte a été l'une des principales causes de l'augmentation spectaculaire de l'espérance de vie moyenne durant le XXième siècle. Leur importance est d'une grande utilité pour une meilleure prise en charge de la santé publique **(Grace Yim, 2011)**.

Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries ont appris à se défendre et à s'adapter et certaines sont devenues résistantes aux antibiotiques. La pression de sélection exercée par l'utilisation importante de l'antibiothérapie et la diffusion épidémique des souches résistantes sont les deux facteurs principaux conditionnant cette évolution **(Soussy, 2007)**.

Le lait des brebis sur le cas des mammites ovines contient une microflore variée Soit la flore originelle et ou la flore pathogène comme les *entérobactéries.*

Les *Enterbacteries* opposent une résistance naturelle à quelque type des antibiotiques et cette résistance naturelle définit de phénotype dit sensible ou sauvage.

L'objectif global de ce travail est :

• de rechercher les entérobactéries dans le lait crus des mammites ovines

• D’étudier la sensibilité des entérobactéries aux certain antibiotiques

Notre manuscrit comporte trois parties en premier, l’étude bibliographique, une deuxième concerne le matériel et méthode appliquée suivie par les résultats enregistrés et leurs interprétations avec illustrations statistiques.

Nous terminons par discussions relatant la comparaison de nos résultats aux travaux d’autre auteur. Enfin cette partie se termine par une conclusion et des perspectives.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Les mammites ovines

Chapitre I : les Mammites ovine

I .1. Définition :

La mammite est une inflammation du tissu conjonctif d'un ou plusieurs quartiers de la glande mammaire due généralement à la présence et l'action d'un ou plusieurs micro-organismes. Néanmoins, Il existe des mammites rares causées suite à des désordres physiologiques ou à des traumatismes locaux **(Bonnefont , 2011).** Les infections mammaires peuvent être ou non associées à des signes cliniques, on distingue alors les mammites cliniques des mammites subcliniques. Parfois les germes s'installent de façon durable dans la glande mammaire, on parle alors de mammites chroniques **(Gedilaghine, 2005).**

I.2. Différent type des mammites :

I.2.1. Les mammites cliniques :

D'après **(Bergonier et *al*., 2003)**, Une mammite est dite clinique lorsque l'atteinte mammaire se traduit par la présence de symptômes fonctionnels (modification du lait dans son qualité et quantité produite) reflétant une perturbation des fonctions de sécrétion et filtration. On peut observer des symptômes locaux : rougeur, tuméfaction, chaleur et douleur de la mamelle ou du quartier atteint, avec les ganglions retro mammaires peuvent être hypertrophies On parle alors de mammite aiguë. Lors de mammite chronique, le quartier s'atrophie et se sclérose. Dans certains cas, on observe des symptômes liés à une intoxication. Ils se traduisent par une altération de l'état général (abattement, anorexie, hyperthermie, déshydratation, asthénie, coma etc.…). On parle alors de mammite suraiguë. La mammite clinique aura lieu juste après le sevrage ou peu temps avant la mise bas **(Radostits et *al*., 2002 ; Timms, 2007 ; Bedolla, 2010).**

Enfin, selon la gravité et la simultanéité des symptômes, on distingue :

I.2.1.1. Mammite suraiguë :

Elle apparait brutalement et évolue rapidement vers des symptômes délétères, se caractérisent par des signes locaux très importants, modification de la sécrétion lactée (aspect séreux, aqueux, hémorragique ou purulent), en présence de fièvre l'état

général de l'animal est très affecté avec un abattement profond qui évolue vers la mort en l'absence de traitement **(Argenté et *al*., 2005).**

On distingue deux types de mammite suraiguë :

I.2.1.1.1. Mammites gangreneuses :

L'examen de la mamelle indique un gonflement marqué de la glande, suivie d'une nécrose de celle-ci avec décoloration du quartier atteint (noirâtre, bleuâtre et froid) et se prolonge souvent sur les deux-tiers avant de tomber, Il se forme un sillon disjoncteur séparant les tissus vivants des tissus morts. La sécrétion de lait est en faible quantité, d'aspect séro-hémorragique et contenant des gaz d'odeur nauséabonde (**Radostits et *al*., 2002 ; Philip Rscott, 2007).**

I.2.1.1.2. mammites paraplégiques :

Où la brebis est en décubitus, avec généralement de la fièvre, et parfois de la diarrhée, et dont la sécrétion a un aspect que l'on compare généralement à de la bière

I.2.1.2. Mammite subaiguë et aiguë :

Ce sont des inflammations violentes de la mamelle mais l'état général de l'animal est moins affecté. Elle se caractérise par des signes locaux visibles au niveau de la glande qui apparaît rouge, gonflée, douloureuse et chaude. La sécrétion laitière est modifiée (qualité et quantité) avec la présence des grumeaux qui caractérisent ce type de mammites **(Radostits et *al*., 2002; Timms , 2007 ; Spanu, 2009).** Ces mammites évoluent moins rapidement que les précédentes. Ce type de mammite passe généralement à la chronicité en absence de traitement.

I.2.1.3. Mammite chronique :

Elles sont généralement primitives (après une longue phase silencieuse) ou suite à une mammite aiguë, elle se caractérise par la persistance de l'inflammation et des symptômes locaux variables et une évolution lente vers l'atrophie du quartier infecté avec des zones de fibrose cicatricielle à la palpation. La sécrétion n'est souvent modifiée qu'en début de traite avec la présence des grumeaux est plus ou moins

régulière. L'évolution en l'absence de traitement est lente et conduit au tarissement du quartier. **(Emmanuel , 2008).**

I.2.2. Mammite subclinique :

Ce sont des infections mammaires asymptomatiques. La sécrétion lactée est macroscopiquement normale et l'état général n'est pas altéré. On observe une mamelle saine. Ces mammites sont détectées par les examens complémentaires. Les comptages cellulaires et le diagnostic bactériologique permettent de déterminer la présence ou l'absence d'infection. Ces mammites peuvent résulter d'une infection primaire ou être secondaires a une mammite aigue non totalement guérie (présence de germe bactérien). Elles sont beaucoup plus fréquentes que les infections cliniques, plus insidieuses car difficilement détectables **(Spanu, 2009).**

Ce type de mammites a tendance à passer inaperçu au sein des élevages, où il est assez répandu et responsable des pertes économiques les plus importantes.

I. 3. Les germes impliqués lors de mammites :

Les mammites sont provoquées par plus d'une centaine de micro-organismes **(Rinaldi et *al.*, 2010 ; Watts, 1988)** tels que les virus, les mycoplasmes, les champignons et surtout les bactéries qui constituent la cause majeure **(Bergonier et *al*., 2003).** L'inflammation de la mamelle due à des traumatismes ou des agressions de la peau du trayon (mordre excessif des agneaux) et parfois à des sténoses du canal du trayon qui provoque par la machine à traire. (**Bonnefont, 2011)**.

Selon la pathogénicité des germes en cause on classe les espèces bactériennes responsables d'infections mammaires en deux groupes :

I.3.1. Pathogènes majeurs :

I.3.1.1. *Staphylocoque a coagulase positive :*

S. aureus est la cause la plus commune de la mammite clinique chez les petits ruminants, avec des taux de 11% à 65.3% des cas signalés **(Suarez et *al*., 2002 ; Mork et *al.*, 2007)**. La bactérie est coque Gram positif, elle est présente sur la surface de la peau et des muqueuses, mais son réservoir principal est le trayon de la mamelle

infectée **(Van De Leemput, 2007**). La multiplication de *Staphylococcus aureus* est provoquée par la lésion de trayon et le manque d'hygiène des élevages.

Elle peut être associée à une mammite aiguë gangreneuse évoluant dans la plus part des temps vers une mammite subclinique (Mammite chronique).

La réaction inflammatoire est lente et souvent modérée **(Salat et *al*., 2007).** Parfois, on observe des mammites aigues avec des signe inflammatoires graves et des lésions tissulaires irréversibles, conduisant à la perte du quartier ou parfois l'animal. Selon **(Smith et *al*., 2009** et **Eicher et *al*., 2003)** une infection chronique est associée à une diminution de la production lactée lors de l'induration et formation des micro-abcès dans le parenchyme mammaire qui protègent la bactérie des défenses immunitaires et des traitements antibiotiques .

I.3.1.2. *Streptococcus :*

Chez le mouton les streptocoques sont probablement le deuxième groupe de micro-organismes après les satphylocoques à redouter dans la mammite. Cette dernière est provoquée par plusieurs espèces de streptocoque (*Streptococcus agalactiae, Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae*), Les streptocoques peuvent causer des manifestations de mammite de l'individu ou le troupeau **(Las Heras et *al*., 2002 ; Bedolla, 2010).**

I.3.1.3. *les entérobactérie :*

Cette famille comprend de nombreux genres, parmi lesquels trois sont impliqués fréquemment en pathologie mammaire : *Escherichia* (en particulier *E. coli* germe le plus fréquent de cette famille), *Klebsiella*, et *Enterobacter*. D'autres germes de cette famille peuvent aussi être à l'origine de mammites (*Serratia*, *Proteus*, et *Salmonella*) mais de façon moins fréquente.

Il s'agit de bacilles Gram négatifs, généralement à l'origine de mammites cliniques aiguës (symptômes locaux et généraux) et subaiguës (symptômes locaux uniquement). On observe dans ces cas, une guérison clinique spontanée en 2 à 3 jours, et bactériologique pour 66 % des quartiers en moins de 10 jours. Elles peuvent aussi être à l'origine, dans moins de 10% des cas, de mammites suraiguës (avec une atteinte très importante de l'état général), dites à coliformes, car un cas sur deux est du à *E. coli*.

Lors d'une épidémie des mammites à entérobactéries, on retrouve de très nombreuses souches différentes (jusqu'à 69) dans un même élevage, ce qui montre que l'infection se fait depuis une source multiple : l'environnement, qui constitue leur réservoir principal.

Cependant**(Lam *et al.*, 1996)** ont observé que 9% des quartiers ayant présenté une mammite dans leur étude, ont eu plus d'un cas clinique du à la même souche *d'E coli*, signant la présence d'une infection persistante**. (Döpfer *et al.*, 2000)** ont d'ailleurs observé que certaines souches d'*E. Coli* à l'origine d'infections persistantes, étaient capables de pénétrer à l'intérieur des cellules épithéliales. Mais ce type d'infection reste anecdotique, et les nouvelles infections se font depuis l'environnement et particulièrement pendant la période sèche et autour du vêlage. En effet **(Bradley et Green ,2000)** ont montré que 71 % des mammites à entérobactéries ont lieu sur des quartiers dont la même souche (utilisation de marqueurs génomiques) avait déjà été isolée au tarissement, avant ou après le vêlage. Ces observations indiquent que la bactérie a pénétré dans la mamelle lors du tarissement ou péri-partum, mais sans expression clinique. Les symptômes induits par ces infections ne sont apparus que tardivement durant la lactation.

Les entérobactéries sont capables de se multiplier dans un lait sain (en particulier dans la citerne du trayon), mais ils sont sensibles :

- à la phagocytose par les neutrophiles (qui, s'ils sont déjà présents, protègent la mamelle d'une nouvelle infection),
- au complément,
- à la lactoferrine du lait lors d'inflammation, ce qui explique les guérisons

Spontanées.

Cependant certaines souches de *Klebsiella* et *d'E. coli* présentent une capsule polyosidique autour de leur paroi, ce qui leur permet d'échapper aux immunoglobulines, et les rend moins sensibles aux neutrophiles et au complément **(Serieys et Seegers ,2002)** Le pouvoir pathogène de ce germe est lié d'une part au lipopolysaccharide (LPS) libéré lors de la mort bactérienne ,(pouvant survenir lors de la multiplication bactérienne, mais aussi du fait des défenses de l'organisme), à l'origine de la réaction inflammatoire et d'une endotoxémie, et d'autre part à la

sécrétion d'agents cytotoxiques pour l'épithélium mammaire par *E. coli*. On observe aussi dans 30 à 40% des cas graves (mammites aiguës à suraiguës) une bactériémie. Ces infections sont caractérisées par la très forte inflammation qu'elles induisent.

De façon beaucoup moins fréquente on observe également des cas de mammites dues à un autre genre d'entérobactéries : *Serratia*. Les deux espèces retrouvées lors de mammites à *Serratia* sont *S. marcescens* et *S. liquefaciens*. Même si elles appartiennent au groupe des entérobactéries, elles sont à l'origine principalement de mammites subcliniques, parfois subaiguës. Ces mammites sont difficiles à traiter avec des antibiotiques, et on observe ainsi une durée moyenne de l'infection de l'ordre de 55 jours (mais certaines peuvent durer jusqu'à 10. L'infection a lieu pour 50% pendant la première moitié du tarissement, pour 30% pendant la seconde, et pour 20% en lactation. Cette spécificité peut s'expliquer par le fait que ces bactéries sont capables de capter le fer nécessaire à l'activité de la lactoferrine. Ces germes ont pour source principale l'environnement (litière et eau).

I.3.2. Les pathogènes mineurs

I. 3.2.1. *Arcanobacterium Pyogènes*

Ce germe est à Gram négatif provoque des macro-abcès multiples dans la mamelle avec un lait prenant la forme de pus jaune sans grumeaux et l'abcédations des noeuds rétro-mammaires, parfois multiple entraînant l'atrophie du quartier **(Devillechaise et *al*., 1996 Hirsh et *al*., 2004).** La source de contamination est le tractus génital, les lésions du trayon de la mamelle, ou toutes autres blessures. Selon **(Smith., 2008 et Remy., 2007),** cette infection évolue généralement soit vers la chronicité, soit vers la destruction du quartier et parfois vers la mortalité.

I.3.2.2. *Staphylocoques à Coagulases Négatives (SCN)*

Il existe plusieurs espèces de SCN qui ont la capacité de causer la mammite chez les moutons. Les plus fréquemment isolées sont : *S. hyicus, S. chromogènes, S. haemolyticus, S. epidermidis, S. simulans et S. warneri*, les SCN sont isolées surtout dans les mammites subcliniques des brebis à travers toutes les étapes de lactation **(Menzies, 2000 ; Menzies & Ramanoon ,2001 ; Bedolla, 2010).** En l'absence d'infection par des pathogènes majeurs, les SCN sont responsables de sévères augmentations des taux cellulaires **(Paape et *al*., 2001).** Ces germes sont des hôtes

normaux des animaux. Ils sont fréquemment isolés de la peau, du vagin, des poils, du canal du trayon ou dans le lait prélevé par des moyens non aseptiques.

I.3.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

C'est une bactérie Gram négatif, elle existe surtout au niveau des lésions de la peau du trayon. C'est aussi un saprophyte du milieu extérieur et capable de résister aux défenses de l'organisme via la formation de biofilm, la source de l'infection est souvent les boues de sédimentation des abreuvoirs, de l'eau de lavage des pis, literie humide **(Leitner et *al*., 2007).** Les mammites dont il est responsable sont sporadiques, mais elles peuvent toucher parfois plus du tiers du troupeau. L'espèce *Pseudomonas Aeruginosa* est à l'origine d'une forme suraiguë séro-hémorragique **(Smith, 2008 ;Hanzen, 2014)** et d'après**(Le Guillou, 1989)** la mortalité est fréquente .

I.3.2.4. *Corynébactéries*

Les corynébactéries sont des pathogènes mineurs qui provoquent rarement des mammites cliniques. *C. pseudotuberculosis* est le principal agent de la maladie caséeuse des petits ruminants. Il peut entraîner l'abcédation des noeuds lymphatiques rétro-mammaires, mais il est rarement à l'origine d'une vraie mammite **(Hirsh et *al*., 2004).**

I.3.2.5. *Mannheimia haemolytica :*

C'est un bacille à Gram négatif provoque des mammites cliniques (gangrène) avec des températures élevées, le lait devient purulent et inflammation termine par la nécrose du quartier atteint. Il est transmis par l'allaitant des agneaux malades, où on le trouve en tant que flore normal de l'appareil respiratoire supérieur **(Scott et *al*., 1998. Gougoulis et *al*., 2008).**

I.3.2.6. *Mycoplasmes*

La mammite due aux mycoplasmes est suspectée fréquemment quand les signes de la

mammite clinique apparaissent en répétition alors que le diagnostic bactériologique est négatif. L'infection par mycoplasme est caractérisée par divers symptômes au sein d'un même élevage. Les symptômes mammaires signalés par **(Mercier et *al*., 2000)** et **(Mercier, 2001)** sont : baisse de production voire agalactie, lait modifié, atrophie

et fibrose du quartier. Selon **(Buxadé, 1996** et **Rodriguez, 1995)** ils peuvent aussi parfois être accompagné de kérato-conjonctivite, d'arthrite ou pneumonie dans les troupeaux.

I.3.3. D'autres germes :

Certains pathogènes rarement retrouvés chez les moutons dans le cas de mammite ont été signalés par quelques auteurs à savoir : *Klebsiella pneumoniae,* **(Agraz, 1984)** *; Brucella, Serratia macrescens, Salmonella sp* **(Nickerson, 2002)** ; *Bacillus cereus, Clostridium perfringens* (**Radostits et *al*., 2002**).

I.3.3.1. Les agents mycosiques :

Les mammites mycosiques sont dues principalement aux *Candida albicans, Aspergillus fumigatus,* ou *Cryptococcus spp* **(Bergonier et *al*., 2002).** Elles sont à l'origine de mammites cliniques subaiguës s'aggravant suite à l'utilisation d'antibiotiques (injection septique), évoluant ensuite vers la chronicité. Ne pouvant pas être traitées par l'absence d'antifongique actif dans la mamelle sur le marché. La source principale de contamination est l'aliment et l'eau **(Elad et *al.*, 1995 ; Hintikka, 1995)**. La peau, les fèces des animaux, le sol, le matériel de literie peuvent constituer un risque de contamination **(Loftsgard & Lindquist, 1960).**

I.3.3.2. Virus

Des virus peuvent être impliqués dans le déclenchement des mammites, soit en causant des lésions du trayon et ainsi en favorisant la contamination par d'autres pathogènes, soit en ayant une action immunosuppressive **(Barkema et *al*., 2009 ; Wellenberg et *al*., 2002).**

Maedi-visna (MV) est une maladie viral lente (longue période d'incubation) des moutons définie par l'infiltration interstitielle chronique des cellules inflammatoires mononucléaires dans plusieurs organes **(Julio Benavides et *al*., 2013).** Selon la sévérité des lésions et les signes cliniques propres, quatre manifestations pathologiques ont été distingué (Palsson, 1990). Parmi, la forme mammaire de l'infection par les lentivirus des petits ruminants a été récemment mise en évidence **(Dawson, 1987 ; van der Molen & Houwers, 1987 ; Lerondelle, 1988 ; Narayan et *al*., 1993).** L'infection par le virus de Maedi-visna est caractérisée par l'importance de

l'incidence économique puisque la production de colostrum (mammite interstitielle aiguë) est presque totalement supprimée ou que la production laitière est partiellement diminuée (mammite interstitielle chronique). Donc on en conclue une augmentation de la mortalité d'agneau par famine **(Pekelder et *al*., 1994).**

I.4. Pathogénie

Le processus infectieux se déroule en trois temps :

de surface. Leur élimination par le flux de lait lors de la traite est ainsi limitée.

les épithéliales : on observe des microvésicules et des ulcères diffus de l'épithélium des canaux lactifères.

affluent vers l'épithélium puis vers la lumière des acini et des canaux.

observables dans le lait **(Paape et Capuco, 1997 ; Fetherson et *al.*, 2001).**

En fonction de l'efficacité de la réponse immunitaire, trois évolutions sont possibles :

'étend à l'ensemble de la glande ce qui aboutit à une mammite clinique.

développement après diminution de l'inflammation ce qui conduit à des formes subcliniques ou chroniques **(Paape et Capuco, 1997 ; Fetherson et *al.*, 2001).**

I.5. Importance des mammites :

I.5.1. Aspect économique :

Selon **(Ranucci , 1999)** les mammites sont des pathologies qui provoquent une perte économique importante sur les troupeaux laitiers ovins. Cela est due à la mortalité de brebis et d'agneau, aux coûts de traitement, à la production laitière réduite, à la réforme des animaux mammiteux, à la croissance réduite d'agneau, aux paiement de lait sur la qualité cellulaire dans certains secteurs **(Bergonier et *al*., 2003).**

I.5.1.1. Diminution de la production laitière et de réforme :

(Timms, 2007) a signalé, dans ses travaux sur les mammites chez les brebis, un taux de réduction de la production laitière de 12% et une fréquence de 58% de mamelle infectées. En outre, **(Barillet, 1999)** à l'INRA, a considéré que la diminution de production laitière comme une cause primaire de réforme (environ de 13% de brebis par an), et lors de mammite clinique la reforme été en moyenne de 7,2%, et cela variait de 5,6% des brebis en première lactation à 8,8% en troisième lactation.

Aussi, d'après **(Radostits et *al*., 2002; Ebrahimi et *al*., 2007)** les mammites sont responsables d'une augmentation des taux de mortalité des brebis d'environ de 10% et peuvent être une des causes de diminution du gain de poids des agneaux, voire d'une mortalité des agneaux avant le sevrage. **(Moule ,1954)** a rapporté un taux de mortalité d'agneaux de 34.6% en Australie dont 23.6% d'agneaux morts chez des brebis malades de mammites.

I.5.1.2. Coût de traitement :

Une augmentation du coût du traitement des brebis dans les conditions de terrain en comparaison de la valeur de la réforme et du rétablissement qu'on peut en attendre **(Bergonier et *al*., 2005).** La rechute de traitement lors de mal conduit ou inadéquat.

Chapitre II

Les entérobactéries

Chapitre II : Les Entérobactéries

II.1.Généralités sur les Entérobactéries

Les entérobactéries constituent un grand groupe de bactéries ayant un forte similitude. La création de ce groupe a été proposée par Rahn en 1937 qu'il dénomma *Enterobacteriaceae*. Si le nom de famille est toujours maintenu, en revanche le classement des bactéries dans la famille a beaucoup évolué **(Joly et Reynaud, 2007)**. Actuellement, les entérobactéries sont classées sur la base du séquençage des ARN 5S et 16S dans :

-Domaine : *Eubacteria*

-Phylum XII : *Proteobacteria*

-Classe : *Cammaproteobacteria*

-Ordre des Enterobacteriales

-Famille des *Enterobacteriaceae* **(Meyer et *al.*, 2004)**.

44 genres sont regroupés en cinq tribus, d'après leurs propriétés fermentatives: *Escherichiae, Klebsielleae, Proteae, Yersiniae* et *Erwiniae* **(Larpent, 2000)**. Les genres les plus communément isolés en bactériologie clinique sont: *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Proteus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella et Yersinia* **(Morice, 2003)**.

Le nom « entérobactérie » fait référence à la localisation de cette famille de microorganismes dans le tube digestif et principalement le côlon de l'homme et des animaux **(Scheftel, 2008)**. La famille des entérobactéries se définit par un ensemble de caractères généraux communs. Ce sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, le plus souvent mobiles grâce a une ciliature péritriche mais immobiles dans le cas des bactéries des genres *Klebsiella, Shigella* et *Yersinia pestis*. Elles fermentent le D-glucose avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites. Elles n'ont pas d'oxydases et possèdent une catalase **(Joly et Reynaud, 2007)**. Elles sont aérobies-anaérobies facultatives et elles cultivent sur les milieux ordinaires. La température optimale de croissance est 37°C mais la culture est possible entre 20°C et 40°C. Leur temps de division varie de 20 à 40 minutes. Sur gélose, les colonies sont lisses **(Decoster, 2005)**.

II.2. Habitat :

Les Enterobactéries sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux où ils sont retrouvés soit à l'état de pathogène, soit à l'état de commensaux. Mais cette localisation digestive n'est pas exclusive. On les retrouve également dans l'environnement (sols, eau) où ils participent à la dégradation des matières organiques, à l'altération des plantes suite à des nécroses, à une dégénérescence ou à un ramollissement. (**Avril et *al*., 2001)**

II .3.Les caractères bactériologiques :

II .3.1.Les caractères morphologiques :

Toutes les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique, sous forme de bacilles à gram négatif de 2 à 3µ de long sur 0,6µ de large généralement polymorphes. Les espèces les plus nombreuses sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, Les autres sont immobiles (Klebsiella, Shigella, Yersinia pestis). La présence d'une capsule visible au microscope est habituelle chez Klebsiella. La plupart des espèces pathogènes chez chez l'homme possèdent des pili (ou fimbriae) qui constituent des facteurs d'adhésion **(Bakhoum, 2004 ; Bossert et *al* ., 1986 ;Dram,2001 ; Le Minor et *al* .,1989 ; Ndoy, 2004)**

II .3.2 . Les caractères culturaux :

Les entérobactéries aéro-anaérobies facultatives se développent facilement sur milieux nutritifs simples. Sur milieux gélosés, les colonies d'entérobactéries sont habituellement lisses, brillantes, de structure homogène (type « smooth » ou S). Cet aspect peut évoluer après cultures successives vers des colonies à surface sèche et rugueuse (type « rough » ou R). Les colonies de bactéries capsulées telles que Klebsiella sont mucoïdes, plus grandes que les colonies S, avec une tendance à la confluence. **(Bakhoum ,2004 ; Dram,2001 ; Ferron,*1984* et Pilet et *al* .,1979).**

II .3.3. Les caractères biochimiques :

Le diagnostic de genre et d'espèce repose sur l'étude des caractères biochimiques, après que le diagnostic de famille ait été établi avec certitude.

II.3.4.Production d'Hydrogène sulfuré (SH2) :

La production de SH2 par les microorganismes est mise en évidence par incorporation du fer ou de plomb dans le milieu destiné à cette étude. Il se forme un précipité noir de sulfure de fer ou de plomb. Ce souffre réduit va se combiner avec le fer ferreux Fe2+ qui vient du sulfate de fer. **(Le Minor et *al.*, 1984)**

II .3.5.Recherche de l'uréase :

Les bactéries possédant une uréase active scinde l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniaque. Ceux-ci en se combinant donnent du carbonate d'ammonium. Le carbonate d'ammonium formé alcalinise le milieu, ce qui ce traduit par le virage de l'indicateur coloré de l'orange au rose framboise ou dans de rares cas au rouge violacé**. (Le Minor et *al.*, 1984**)

II.3.6.Production d'indole :

Certaines bactéries dégradent le tryptophane grâce à une tryptophanase. Il se forme de l'indole, de l'acide pyruvique et de l'ammoniac. L'indole est apolaire et réagit fortement avec le paradiméthyl amino benzaldéhyde en milieu acide pour donner un anneau rouge qui remonte en surface. **(Le Minor et *al.*, 1984**)

II .3.7.Recherche des décarboxylases :

Les décarboxylases (LDC, ODC, ADH) scindent les acides aminés, entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO2. Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH optimum : 3,5 à 5,5) et des conditions d'anaérobiose. Le milieu d'étude contient du glucose, un indicateur coloré (le rouge phénol) et bien entendu un acide aminé. Chez les bactéries à métabolisme, la fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme ; l'alcalinité due à l'amine entraîne ensuite le virage de

l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement. Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune. **(Le Minor et *al.*, 1984**)

II.3.8.Recherche des désaminases oxydatives :

Les désaminases, enzymes induites, agissent sur les acides aminés en entraînant la formation des acides cétoniques correspondants. Les acides cétoniques formés ont la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe3+, réaction utilisée pour la lecture.

(Le Minor et *al.*, 1984)

II .3.9.Utilisation du Citrate de Simmons (CS) :

L'utilisation du citrate, comme seule source de carbone par les bactéries, se traduit par une alcalinisation du milieu (virage au bleu). **(Le Minor et *al.*, 1984**)

II.3.10.Utilisation du malonate :

Le malonate inhibe le cycle de Krebs (inhibition de la succinate déshydrogénase). Seules les bactéries qui peuvent utiliser le cycle glyoxalique sont capables de pousser sur un milieu au malonate. L'utilisation du malonate s'accompagne d'une libération d'ions OH alcalinisan **(Le Minor et *al.*, 1984**)

II.3.11.Action de la Phényl Alanine Désaminase (Ph-al-Da) :

La Ph-al-Da, enzyme induite, agit sur la phényl alanine en entraînant la formation d'acide cétonique correspondant. L'acide cétonique formé a la propriété de donner des complexes colorés avec les ions Fe3+ donnant une coloration bleue.

(Le Minor et *al.*, 1984)

II.3.12.Milieu au Citrate de Christensen (CC) :

A la différence du Citrate de Simmons, ce milieu contient une faible quantité de glucose, d'extrait de levure et une source d'azote organique. Dans ces conditions, certaines bactéries citrate négatif sur milieu de Simmons sont capables d'utiliser le citrate en milieu de Christensen. La formation d'ions hydroxyles alcalinise le milieu (virage du jaune au rose). **(Le Minor et *al.*, 1984**)

II.3.13 .Recherche de l'acétoïne ou Réaction de Voges-Proskauer (VP) :

On étudie la formation de l'acétyl méthyl carbinol (A.M.C. ou acétoïne) soit à partir de deux molécules d'acide pyruvique, soit à partir du glucose. En présence d'une base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (oxydation en diacétal). **(Le Minor et *al.*, 1984**)

II.3.14.Test à l'ONPG (Orthonitrophényl β-D-Galactopyranoside) :

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de β-galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose. En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté du nitro2-phénol et non de celui du β-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas les lactoses. Le test à l'ONPG est une technique basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl-β-Dgalactopyranoside ou le 2-naphtol-β-D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrats et libèrent respectivement l'orthonitrophénol (jaune) et le β-naphtol **(Le Minor et *al.*, 1984**)

II.4. Etude des principaux genres :

II.4.1.*Escherichia coli :*

Escherichia coli, isolée par **Escherich en 1885**, est l'espèce type du genre *Escherichia* qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un Bacille à Gram négatif, assez grand (1–1.5 × 2–6 μm), aéro-anaérobie facultatif, oxydase négatif, nitrate positif et qui fermente le glucose **(Farmer et *al.*, 2007).** Les principaux caractères distincts de *E. coli* vis à vis les autres entérobactéries sont : la fermentation du lactose, la production d'une β-galactosidase, la production d'indole à partir du tryptophane, l'absence d'uréase et l'absence d'utilisation du citrate (Simmons) comme source d'énergie et de carbone. Concernant l'habitat, on trouve *Escherichia coli* en abondance dans la flore commensale, en particulier dans le

tube digestif. Par ailleurs, elle est très répondue dans l'environnement : eau, sols, et dans les aliments **(Baraduc et *al.*, 2000).**

Parmi les infections bactériennes récurrentes à la fois en élevage et en santé humaine, celles qui sont causées par Escherichia coli occupent une place particulière par leur diversité. E. coli est une espèce bactérienne hétérogène d'une grande plasticité génétique et de nombreuses souches sont potentiellement pathogènes. Plusieurs pathovars d'E. coli sont ainsi caractérisés par la possession d'un ensemble de facteurs de virulence et par une spécificité d'hôte. Ces souches pathogènes ont acquis un arsenal de fonctions qui leur permettent de coloniser de nouvelles niches écologiques en contournant les mécanismes de défense de l'hôte et en piratant les signaux de transduction des cellules eucaryotes. Les colibacilles pathogènes ont ainsi un impact majeur en santé publique et en santé animale (diarrhées, infections urinaires, toxi-infections alimentaires, infections respiratoires, septicémies, etc.).
En pathologie ovine les entités pathologiques suivantes sont à retenir : septicémies et entérites – agneau baveur – syndrome "agneau mou" – mammites colibacillaires, qualité du lait et coliformes. **(Jean, 2004) .**

II .*4.2.Klebsiella pneumoniae :*

Klebsiella pneumoniae est une entérobactérie qui appartient au genre *Klebsiella*. Il s'agit d'un bacille immobile, aéro-anaérobie, à Gram négatif, de 0.3 à 1.0µm de diamètre sur 0.6 à 6 µm de longueur **(Abbott, 2007),** se présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en
courtes chaînes. Ce sont des bactéries non sporulées, d'aspect muqueux des colonies, ayant une oxydase négative, nitrate réductase positive, uréase positive, Réaction de Voges-Proskauer positive (VP+) et qui fermente le glucose avec production de gaz **(Janda et Abbott, 2006).** L'espèce *Klebsiella pneumoniae* est subdivisée en 3 sous espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae, K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* et *K. pneumoniae* subsp. *Rhinoscleromatis.* C'est une espèce ubiquitaire, et fréquemment isolée de l'environnement (eaux usées sol,….etc) et de flore commensale du tube digestif et des voies respiratoires supérieures **(Avril et *al* .,2000 ; Bagley et *al.*,1978).**

Klebsiella pneumoniae est un germe opportuniste, responsable d'infections diverses : Infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires qui peuvent être à l'origine de bactériémie et surtout de septicémie de pronostic sévère, principalement chez les malades immunodéprimés, cancéreux, brûlés, cirrhotiques, diabétiques, chez les vieillards, nourrissons, nouveau-nés et prématurés **(Sahly et *al.*, 2004 ; Stone et *al.*, 2003).** Il est responsable de plus de 10% des infections nososcomiale **(Chung et *al.*, 1992 ; Podschun et Ullmann, 1998).**

II.*4.3. Enterobacter cloacae :*

Les *Enterobacter cloacae* sont des espèces du genre *Enterobacter* qui font partie de la famille des Enterobacteriaceae. Ils sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, mesurant 0,6 à 1 μm de diamètre et 1,2 à 3 μm de longueur; ils se déplacent grâce à un flagelle péritriche et sont dotés de pilus de classe 1 (**Hart, 2006 ; Paterson et *al.*, 2005**). Ils produisent un acide à partir de la fermentation du glucose, donnent une réaction négative à l'épreuve au rouge de méthyle et une réaction positive au test de Voges-Proskauer; leur température optimale de croissance est de 30 °C. Quatre-vingts pour cent des bacilles sont encapsulés **(Hart, 2006).**

Ces bactéries se rencontrent souvent dans le sol et dans l'eau; ils peuvent se loger dans les intestins d'humains et d'animaux et peuvent aussi se trouver dans les eaux usées. Concernant le pouvoir pathogène, les *E. cloacae* sont des germes qui colonisent souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par antibiotiques. Ils ont été associés à des épidémies nosocomiales et sont considérés comme des pathogènes opportunistes **(Hart,2006 ; Pagotto et *al.*, 2003)**. Ils peuvent causer de nombreux types d'infections, y compris abcès cérébraux, pneumonie, méningite, septicémie et infection de plaies, infection des voies urinaires et des infections de la cavité abdominale ou des intestins **(Farmer et *al.*, 2007).** De plus, ils ont été observés dans des infections liées à des appareils intravasculaires et des infections au point de chirurgie (surtout des infections postopératoires ou liées à des dispositifs comme des prothèses biliaires).

II.*4.4. Citrobacter freundii :*

Les *Citrobacter freundii* sont de bacilles ou de coccobacilles Gram négatif, font partie de du genre *Citrobacter*, facultativement anaérobiques, de 0,3 à 1 μm de diamètre et de 0,6 à 6 μm de long **(Abbott, 2007),** dont la mobilité est assurée par des flagelles péritriches **(Holmes et Aucken, 1998 ; Knirel et *al.*, 2002).** Ces bactéries fermentent le mannitol et produisent du H2S gazeux; elles sont aussi capables d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone **(Chen et *al.*, 2002 ; Knirel et *al.*, 2002).**

Le réservoir de ces bactéries est l'intestin de l'humain et des animaux, sol, eau, eaux usées et aliments **(Doran, 1999).**

Les *Citrobacter freundii* sont des agents pathogènes nosocomiaux opportunistes rares **(Ryan, 2004**) , qui entraînent normalement des infections des voies urinaires, des bactériémies, des sepsis abdominaux et des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies et d'autres infections**c**néonatales **(Pepperell et *al.*, 2002)**, comme la méningite, le sepsis néonatal, l'infection articulaire et la bactériémie **(Doran, 1999).** Les infections du système nerveux central (SNC) sont plus courantes chez les nourrissons de moins de 2 mois que chez les enfants plus âgés et les adultes immunodéprimés; cependant, certains cas rares ont été signalés **(Holmes et Aucken, 1998 ; Ryan, 2004).**

Chapitre III

L’ Antibiorésistance

III.1.Définition des antibiotiques :

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhibé spécifiquement la croissance d'autres micro-organisme par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe **(Gogny *et al.*, 2001).** Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne **(Ogwara, 1981).**

III.2. Mode d'action des antibiotiques :

On considère les antibiotiques comme le groupe le plus important de médicaments pour la médecine. À coté de leurs propriétés de lutter contre les infections humaines dues aux bactéries pathogènes, ils sont également utilisés en médecine vétérinaire **(Emmanuel, 2003)**.

Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre **(figure 01).**

- **Action sur la paroi bactérienne :** Bacitracine, Pénicilline, Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, se qui lui permet de résisté à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) **(Zeba, 2005)** .Or, la pénicilline est un antibiotique empêche la synthèse de peptidoglycane ; par conséquent, la paroi cellulaire est grandement affaiblie, et la cellule finit par se lyse. Puisque la pénicilline agisse seulement sur les cellules en croissance active **(Gerard.I *et al.*, 2003)**.
- **Action sur la structure de la membrane :** en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échange électrolytique avec le milieu extérieur **(Flandrois *et al.*, 1997).**
- **Action sur la synthèse protéique :** sur les ribosomes, ce qui entraine l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéine anormale. Les aminoglycosides ou aminosides (Streptomycine, gentamycine, amykacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes **(Hermann, 2005).** Les phénicols (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien.

Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaine peptidique en se fixant sur la petite sous-unité **(Flandrois *et al.*, 1997).**

Les macrolides et les kétolides (érythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaine peptidique **(Nilius et Ma, 2002).**

La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaine peptidique.

- **Action sur la synthèse de l'ADN :** certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques **(Flandrois *et al.*, 1997),** les quinolones et les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase **(Chopra, 1998).**
- **Autre** : en agissant entant qu'antimétabolites bactériens (c'est-à-dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries), par exemple ; agisse sur le métabolisme de l'acide folique **(Gerard. *et al.*, 2003)**

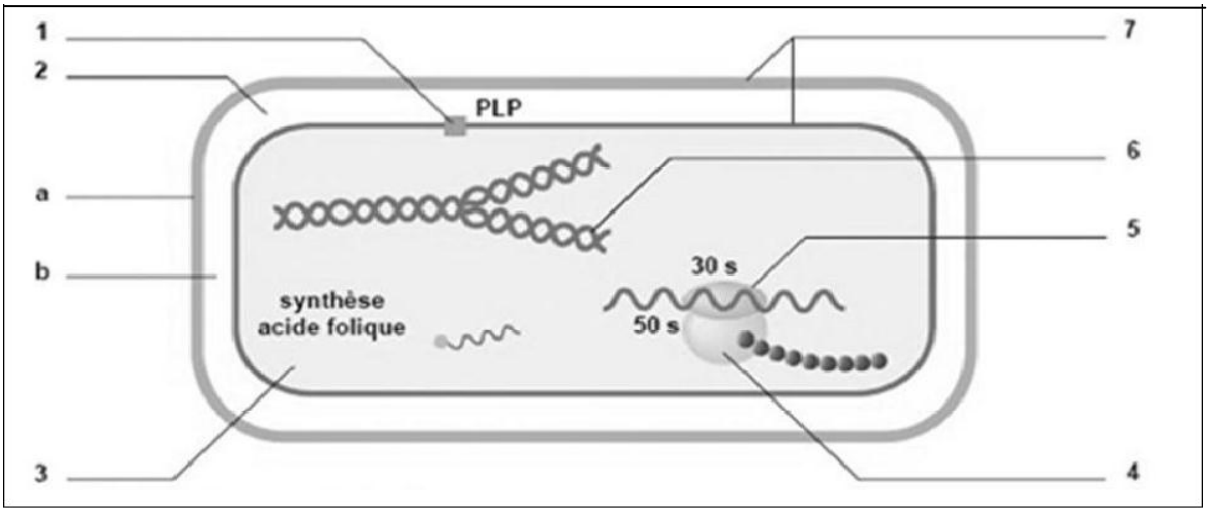


Figure N°01 : Cibles des principaux antibiotiques **(Benlmouden et Hakkou, 2007)**.

a .Paroi bactérienne ; b. Espace périplasmique ; 1. β-lactamine (PLP) ; 2. Glycopeptides (Dala); 3. Dihydroptéorate synthétase (sulfamides) ; 4. Fixation à la sous-unité 50 S du ribosome (macrolides, synergistines, lincosamides, phénicolés) ; 5. Fixation à la sous-unité 30 S duribosome (aminosides, tétracyclines) ; 6. Acides nucléiques (quinolones, rifamycines, nitroimidazolés) ; 7. Membranes cytoplasmiques (polymyxines)**.**

III.3.La résistance aux antibiotiques :

De nombreuses molécules des antibiotiques d'origine naturelle ou synthétique, ont été découvertes de la fin des années 1940 jusqu'aux années 1970. Le succès fulgurant des premiers traitements anti-infectieux a fait considérer un peu hâtivement le problème des maladies infectieuses comme définitivement réglé. Mais, rapidement, l'enthousiasme a décliné avec l'apparition des premières résistances des bactéries aux antibiotiques. Les bactéries ont su s'adapter et résister plus ou moins vite à chaque nouvel antibiotique introduit en thérapeutique **(Ploy *et al.,* 2005)**. Ces résistances peuvent avoir un spectre étroit, limité à un ou quelques antibiotiques de structure voisine, mais on observe depuis plusieurs années l'émergence de mécanismes de résistances croisées à des drogues de structures et de modes d'actions différents **(Walsh, 2000)**. Aujourd'hui, apparaissent de véritables « monstres » bactériens résistants à tous les antibiotiques potentiellement actifs **(Ploy *et al.,* 2000)**.

III.3.1. L'origine génétique de la résistance et modalité de transfert génétique :

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de la résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique). Soit dans des éléments mobiles, comme plasmides, élément transposables ou intégrons (résistance extrachromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise **(Mandell *et al.,* 2009).**

III.3.1.1. Résistance naturelle :

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les cellules de toutes les souches alors que la résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée.

La résistance naturelle est stable, transmise à la descendance mais pas ou peu transmissible sur un mode horizontal. Inversement, la résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. La résistance naturelle a pour support génétique le chromosome bactérien et elle permet de définir le spectre d'activité des antibiotiques **(Fauchère et Avril, 2002).** Ses mécanismes biochimiques sont nombreux et quelques uns d'entre eux sont cités ci-dessous.

- Les bacilles à Gram négatif (et notamment les entérobactéries dont *K.p* et *Pseudomonas aeruginosa*) sont naturellement résistants, le plus souvent à bas niveau, aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masse moléculaire élevée (pénicilline G, pénicilline M, macrolides,

rifampicine, acide fusidique, novobiocine, vancomycine) puisque ces antibiotiques ne peuvent traverser la membrane externe de la paroi. Klebsiella pneumoniae est naturellement résistante à l'amoxicilline, ampicilline et à la ticarcilline, grâce à une β-lactamase chromosomique naturelle **(Pina et al., 2000).**

- Les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies. Pour les mêmes raisons, les bactéries aéroanaérobies facultatives sont moins sensibles aux aminosides lorsqu'elles sont placées dans un environnement pauvre en oxygène **(Paul, S .2005).**
- Certaines espèces (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp.,*Morganella* spp., *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardia* spp., ...) produisent naturellement des β-lactamases **(Paul,S .2005).**

III.3.1.2. Résistance acquise :

Elle existe grâce à l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance qui déterminent un phénotype bien précis de résistance, différent du phénotype sauvage, caractérisant les souches n'ayant pas acquis ce mécanisme. Elle ne concerne qu'une population plus ou moins importante de souches d'une espèce.

Dès le début de l'antibiothérapie la résistance acquise a été observée mais sa fréquence était faible. Ultérieurement, la généralisation de l'utilisation des antibiotiques a conduit à une sélection des souches résistantes et on constate, quotidiennement, que de très nombreuses souches ne se comportent pas à l'égard des antibiotiques conformément à ce que les spectres d'activité permettraient de le supposer. Ce phénomène a atteint une telle ampleur que la seule identification bactérienne ne permet plus de prédire le comportement d'une souche isolée vis à-vis des antibiotiques **(Ros, 1999; Meyer *et al.*, 2004).**

III.3.1.2.1. Mutation chromosomique (évolution verticale) :

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20% des bactéries. Elle produit environ une fois pour chaque milliard de divisions cellulaires **(Pallasch, 2003).**

III.3.1.2.2. Acquisition de gène de résistance (évolution horizontal) :

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolé en clinque s'observe aussi bien chez les bactéries Gram positif qu'à

Gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'élément mobile. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situe à l'extérieur et sur certain éléments mobiles du chromosome, tels les transposons. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes. Le risque d'une résistance à plusieurs antibiotiques augmente aussi avec le transfert d'un seul plasmide. Par exemple, *Enterococus faecalis* peut transférer un plasmide responsable de résistance à quatre ou cinq antibiotiques différents.

Les gènes ou les groupes de gènes de résistance peuvent s'acquérir par transformation, transduction ou conjugaison **(Carattoli, 2001)**

- ***La transformation***

La transformation est un processus actif qui permet le transfert et l'échange de gène, ce phénomène naturel est contrôlé par des gènes chromosomiques qui permettent l'absorbation de l'ADN exogène libre par une cellule compétente **(Bacon *et al.*, 2003).** C'est un mécanisme d'échange de gène très répandu, mais pas universel entre les souches bactériennes **(Wolfgang *et al.*, 1999).**

Beaucoup de bactéries transformables libèrent leur ADN pendant la croissance. Ainsi, au moins 50 bactéries différentes ont été démontrées comme étant compétentes pour acquérir des gènes libérés dans l'environnement par d'autre organisme, même d'origine eucaryote (plante, levures et animaux) **(Havarstein *et al.*, 1998).** Les gènes acquis après transformation doivent être intégré dans un plasmide ou un chromosome pour être fonctionnel **(Levy *et al.*, 1998)** après une recombinaison homologue entre les séquences exogène et endogène **(Michael, John .M .2007).**

- ***La transduction :***

Dans le phénomène de la transduction, l'ADN est transféré d'une cellule à une autre par un bactériophage. Ce mécanisme se produit généralement lorsqu'un virus porte accidentellement de l'ADN d'une cellule bactérienne et l'injecte dans une autre essentiellement à la même espèce **(Davison *et al.*, 1999).** Le transfert de gènes de l'hôte par les phages peut se faire de deux façons. Dans le premier cas, appelé transduction généralisée, et dans le deuxième cas transduction spécialisé (**Michael , John .M .2007) .**

- ***Transduction généralisé :***

Elle résulte d'une erreur rare lors de l'assemblage d'un phage, lorsqu'un segment de génome de l'hôte est emporté avec l'ADN du phage. Cet ADN sera injecté à l'intérieur de la bactérie réceptrice et pourra apporter des gènes de résistances aux antibiotiques transmis verticalement à la descendance. S'il n'est pas intégré au chromosome de la réceptrice il sera perdu par dilution au cours des divisions bactériennes **(Michael, John .M .2007).**

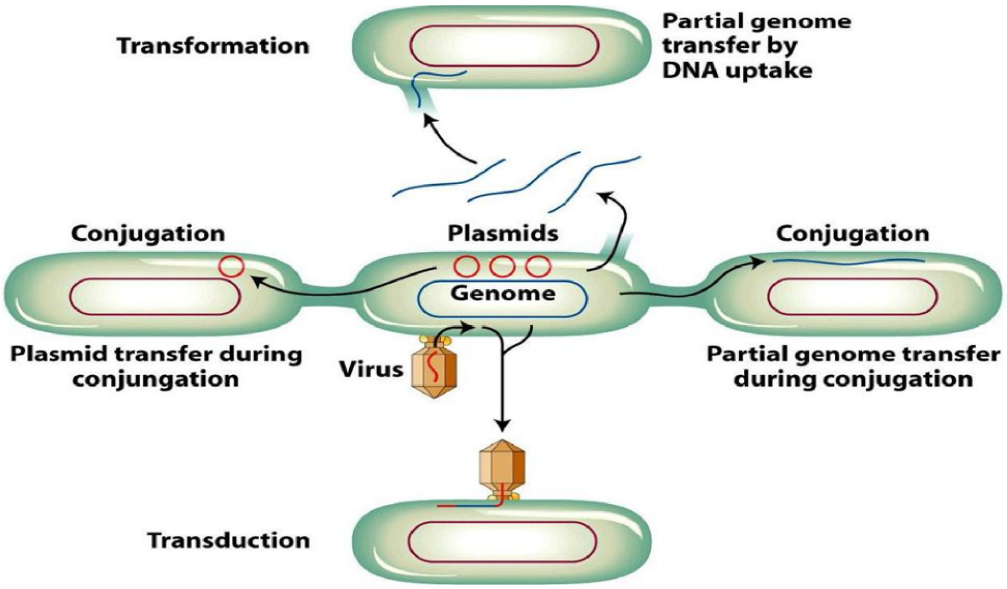
- ***Transduction spécialisé :***

C'est une caractéristique de certains phages lysogène qui sont restés intègres dans le chromosome de l'hôte un certain temps. A l'activation, l'excision du génome viral emport des gènes adjacents de leur site d'intégration, l'infection d'une autre bactérie par ces virions apportera à celle-ci des nouveaux gènes qui pourront être des gènes de résistances aux antibiotiques **(Michael et John. 2007).**

- ***La conjugaison :***

La conjugaison est un processus au cours duquel l'ADN est transféré d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice. La conjugaison est un mécanisme qui implique un plasmide, et Le plasmide conjugatif utilise ce mécanisme pour transférer une copie de lui-même à un nouvel hôte. Donc, La conjugaison est un procédé de transfert génétique qui nécessite un contact direct entre deux cellules **(Michael et John .2007),** et responsable en grande partie de l'émergence d'une résistance chez les bactéries pathogènes. En pareil cas, la résistance se transmet aux bactéries filles. Les bactéries ayant reçu cet élément mobile peuvent se rétablir et redevenir sensibles aux antibiotiques si elles ne sont pas exposées à ces derniers **(Yamashita *et al.*, 2000).**

Les trois mécanismes de transfert génétique sont illustrés dans la **figure N°02 .**



Transfer as part of viral genome

Figure N°02 : Les trois mécanismes de transfert génétique

III.3.1.3.Résistance croisée et Co-résistance :

La résistance croisée résulte d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques appartenant à la même famille .La Co-résistance est liée à plusieurs mécanismes (plusieurs gènes de résistance impliqués) et concerne des antibiotiques appartenant à différentes familles.

III.4. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques :

Une souche bactérienne est dite résistante à un antibiotique quand elle est capable de se développer en présence d'une concentration élevée de cet antibiotique **(Lavigne, 2007)**. Alors ces micro-organismes ont développé trois types de mécanismes de résistance **(tableau N°01**)

- Le premier est la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques (ex :

β- lactamases).

- Le deuxième est la modification des cibles des antibiotiques empêchant l'action de ces derniers, comme par exemple la résistance aux fluoroquinolones par modification des topoisomérases de classe II.

-Enfin, le troisième mécanisme est la réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotique. Ce phénomène peut être dû à un transport actif vers l'extérieur de la cellule via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux et/ou à une imperméabilité **(Cattoir,**

2004) (ex. résistance à l'imipénème causée par la surproduction de AmpC pouvant être associée à des pertes de porines de la membrane externe et/ou la surexpression des pompes à efflux) **(Paul, 2005).**

Tableau N°01 : Les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques **(Li et Nikaido, 2004)**.

Antibiotique	Cible bactérienne	Mécanisme de résistance			
		Inactivation enzymatique	Modification de cible	Imperméabilité cellulaire	Efflux actif
Inhibition de la synthèse de la paroi (peptidoglycane)					
β- lactamines	PLP	+++	++	++	++
Glycopeptides	Précurseurs D-Ala-D-Ala		+++		
Inhibition de la synthèse protéique					
Aminosides	ARN ribosomal 30s	+++	++	+	+
MLS	ARN ribosomal 50s	+	+++		++
Tétracyclines	ARN ribosomal 30s		++		+++
Phénicolés	ARN ribosomal 50s	++			++
Oxazolidinones	ARN ribosomal 50s		++		
Inhibition de la synthèse ou de fonctionnement de l'ADN					
Fluroquinolones	Topoisomérases		+++		++
Rifamycines	ARN Polymérase		+++		+
Sulfamides	DHFS		++		+
Triméthoprimes	DHFR		++		+

III.5. La sensibilité aux antibiotiques :

Les entérobactéries sont naturellement résistantes aux pénicillines G et M, Macrolides, lincosamides, synergistines et glycopeptides. Elles sont habituellement sensibles aux β-Lactamines, Phénicoles, Tétracyclines, Sulfamides, Triméthoprime, Nitrofuranes, Fosfomysine, Colistine et Aminoside (Kanamycine, Gentamicine, Tobramycine, Amikacineel Nétilmicine) **(Bonnet, 2006).**

Etude Expérimentale

Matériels et méthodes

II.1. Problématique et objectifs :

Les pathologies mammaires sont liées à une grande perte économique dans l'élevage ovin (Perte des quartiers chez les brebis ou/et mort de jeune et d'adulte). Parmi, lesquelles les mammites cliniques et subcliniques. Cette constatation est bien observée sur le terrain malgré l'absence des données algériennes enregistrées auprès des services concernés. Pour cela on a entrepris cette étude sur les mammites des brebis dans cinq(05)commune dans la wilaya de MEDEA . Dans ce contexte, nous sommes fixés les objectifs suivants :

1. d'une enquête. Cette dernière a été réalisée à travers un questionnaire adressé pour le vétérinaire et l'éleveur.

2. Isolement et identification des souches des Entérobactéries à partir des divers prélèvements de lait des mammites

3. Détermination de la sensibilité ou la résistance des souches aux antibiotiques vis-à-vis de certaines familles d'antibiotique

II .2.Cadre et période d'étude :

Ce travail rentre dans la préparation de mémoire de master spécialité biotechnologie et microbiologie appliquée.

Nous avons focalisé notre travail sur l'isolement, l'identification et l'étude du profil de l'antibio-résistance des souches des Entérobactéries isolé a partir des différente mammite ovine.

Ce travail a été effectué à l'unité de recherche et de biotechnologie microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie au niveau de faculté de SNV université de docteur yahia faris (MEDEA).

Notre travail s'étale dans la période allant du Janvier 2018 au Mai 2018.

II.3.Fiche d'enquête:

La partie permettant l'évaluation des mammites sur le terrain et de récolter toutes les informations en relation avec le sujet a fait l'objet d'un questionnaire qui a été distribué auprès des vétérinaires praticiens sur les sites choisis (Ain boucif ; Boughzoul ; Chahbounia ; Kef lakhdar ;Elaouinet). Cette fiche d'enquête a porté sur les principaux points suivants :

- Estimation de la fréquence des mammites.

- influence des différents paramètres (stabulation, état de propreté, nature du sol, équipements et l'alimentation…)
- une connaissance les tests de diagnostic sur lesquels se base le vétérinaire sur le terrain

II.4. Matériel biologique :

II.4.1. Les animaux :

Notre travail a porté sur un effectif de 228 brebis des races suivant : Ouled Djelel ;Al-hamra et d'autre races locale appartenant à des élevages ovins différents situés commune de MEDEA(Ain boucif ;Boughzoul ;Chahbounia ;Kef lakhdar ;Elaouinet) Notre étude s'est étalée sur une période allant de Janvier 2018 à mai 2018.

Les animaux qui ont été concernés par ce travail sont en stabulation libre dans la plus part des élevages où les conditions d'hygiène d'une manière générale sont mauvaises. Aussi, tous les aspects de bien-être des animaux ne sont pas respectés.

Dans ces exploitations, les principales mesures de contrôle des infections mammaires ne sont pas gérées par l'intervention du vétérinaire. Par contre, l'éleveur applique de façon anarchique l'utilisation des antibiotiques intra-mammaires sans aucune mesure d'hygiène.

II .4.2.Matériels de prélèvements de lait :

Le matériel nécessaire pour le prélèvement :

- Glacière isotherme avec pain de glace.
- Pots de prélèvement stériles de 60ml.
- Gants d'examen.
- Coton hydrophile, compresse stérile et l'Alcool à 70 ° pour désinfecter les trayons.
- Papier absorbant.
- Feutre indélébile.

II.4.3. Milieux de culture et produits :

II. 4.4.Milieux de culture :

- Gélose nutritive (IPA, Algerie) ;

- Gélose Hékteone
- Mueller Hinton (dimed, Algerie).
- Bouillon TSB (Dimed, Algérie, 2016).
- Gélose Chapman (Oxoid, Uk ; 2016) ;
- Gélose Columbia base (Oxoid, UK,2016) ;

La composition et le mode de préparation des milieux qui ont servi à notre étude sont rapportés en détail dans l'annexe 01.

II.4.6. Réactifs des tests biochimiques :

- Eau oxygénée à 10,20 volumes ;

-VP1 et VP 2.

-TDA.

-James.

- **Tests biochimiques:**

  Galerie API 20 E (Bio Mérieux)

- **Solutions et Tampons:**

  L'eau physiologique

  L'eau distillée

  Cristal violet

  Lugol

  Fuchine

  Alcool

II. 4.7.Antibiotiques en disques :

Les antibiotiques utilisés sont les suivant :

Amoxiciline Clavulanique Acid AMC 30 µg ; Ampicilin AMP 10 µg ;Cephalothin CEF 30µg ;Chloramphénicol CHL 30 µg ;Colistin COL 10 µg ;Ofloxin OFX 5 µg ; Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole SXT 25 µg ; Kanamycin KMN 30 µg ;Gentamicine GMN 10 µg ; Céfotaxim CTX 30 µg.

II.5.Matériels non biologique :

- Bec bunsen.
- Etiquettes.
- Autoclave.
- Micropipette
- Anse de platine.
- Glycérol anhydre, (ref Merck: 12011)
- Boites de pétri.
- Etuve.
- Autoclave.
- Balance de précision.
- Bain marie.
- Eprouvettes.
- Erlenmeyer.
- Flacon en verre avec bouchon rodé.
- Tubes à essai stériles.
- Bec bunsen.
- Etuve.
- Agitateur magnétique.
- -Microscope optique.
- Micropipettes.
- Embouts stériles.
- Anse de platine.
- Becher.
- Emballage en plastique.
- Lames porte-objet.
- Lamelles.
- Papier buvard.
- Les gantes.
- Tubes stériles
- Portoirs.
- Pipette pasteur.

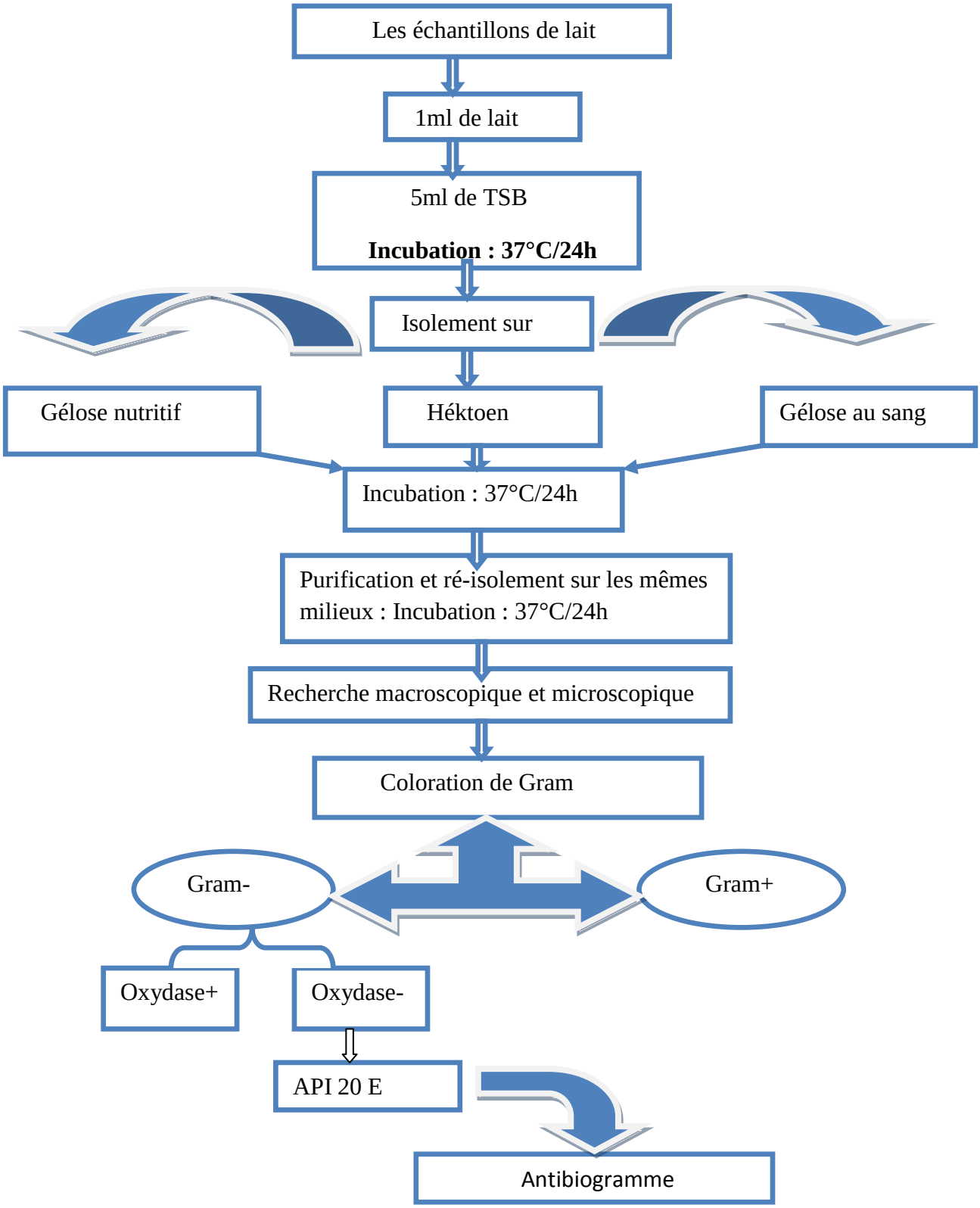


Figure N°03 : Représentation schématique de la méthode d'isolement et d'identification bactérienne.

II.6.Méthodes d'analyse de lait :

II.6.1.Technique de prélèvement du lait :

Les prélèvements de lait ont été réalisés au niveau de cabinet vétérinaire ou dans les élevages avant l'instauration de tout traitement selon les étapes suivantes :

- désinfecté les mains de l'opérateur et Porter des gants à usage unique.
- Lavage avec l'eau.
- Lavage et séchage soigneusement des trayons et la partie basse de la mamelle avec l'Alcool.
- Désinfection de l'extrémité du trayon (l'orifice du canal) avec coton hydrophile imbibé dans l'alcool à 70% puis essuyage avec compresse stérile.
- Après avoir éliminé les premiers jets de lait, ouvrir le pot stérile d'une main en gardant le capuchon disponible entre le pouce et l'index, et maintenu le tube incliné à 45° de façon éviter la pénétration des poussières, des poils de la mamelle puis en prélever environ 10ml de lait. Ce pot était immédiatement refermé pour éviter la contamination.
- Marquage et identification de chaque pot avec des étiquettes portant les abréviations de l'âge, la date du prélèvement, la race, du nom du site où a été fait le prélèvement, et du quartier mammaire atteint gauche ou/et droit (G ou D).
- Les pots sont ensuite placés dans la glacière et analysés au bout de 48 heures ont été conservés à +4°C selon la norme **ISO 17604, 2003**. Concernant les échantillons traités au-delà ce délai ont fait l'objet d'une congélation -18°C.

Celle-ci permet de garder les prélèvements sur une longue durée avant de les analysés.

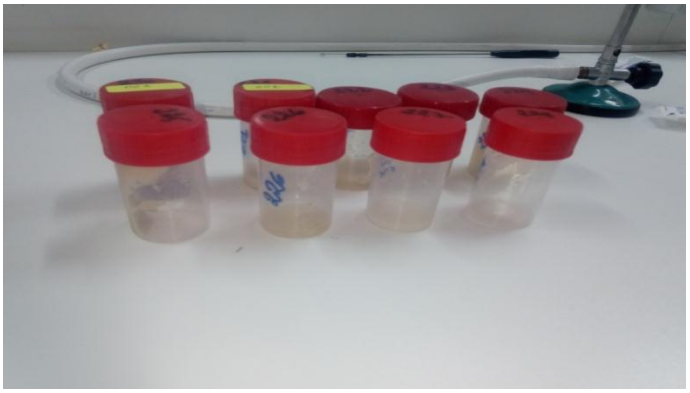


Figure N°04 : Des prélèvements au lait prés a enrichis

II.6.2.Enrichissement :

Cette étape consiste à remplir 1ml de lait à l'aide d'une seringue dans un tube de 5ml de TSB tout a fait dans les conditions stérile devant le bec bunsen, et incuber à 37°C pendant 24 heures.

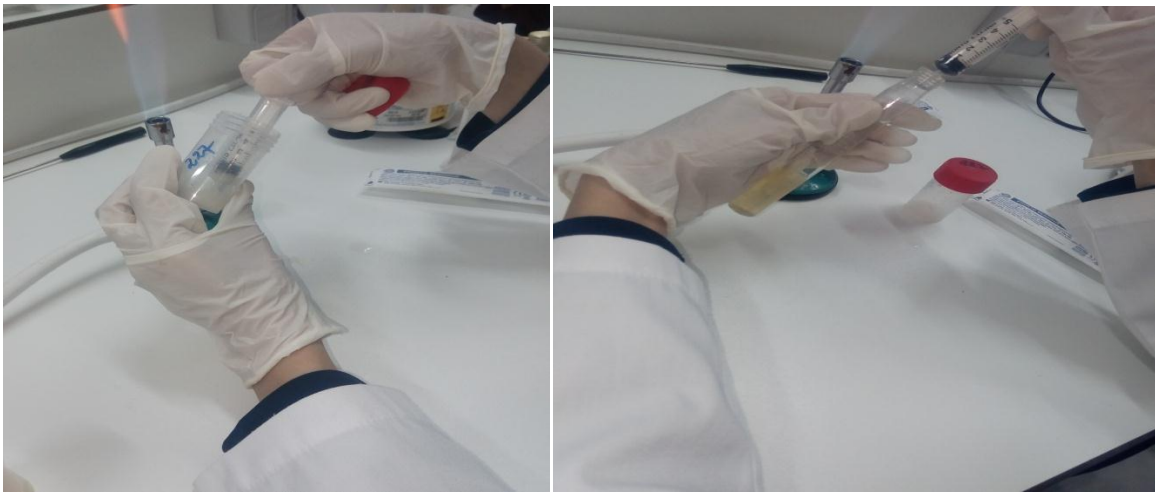


Figure N° 05 : Enrichissement du prélèvement au lait

II.6.3.Isolement et purification:

L'isolement a été réalisé par ensemencement de la culture d'enrichissement dans trois milieux sélectifs qui ont été choisis. Par la suite on incube pendant 24 à 48 heures à 37°C.

herche des entérobactéries.

II.6.4.Identification:

L'identification est l'étape qui précède toujours l'antibiogramme et elle est prise à partir des cultures pures représentées par des colonies typiques que l'on peut différencier par leur aspect, forme, taille, bord, surface et chromogénèse.

II.6.4.1.Identification morphologique

II.6.4.1.1.Etude macroscopique : la forme et la couleur des colonies sont décrites dans les annexes

II.6.4.1.2.Etude microscopique : L'identification est basée sur l'observation microscopique de bacilles Gram- après coloration différentielle de Gram pour la confermation

. Ces entérobactéries se présentent sous l'aspect de petits bâtonnets (2 à 3 µm par 0,6 à 0,8 µm) présentant une ciliature péritriche

II.6.4.2.Identification biochimique

On utilise la galerie API 20E

Des systèmes API 20E ont été utilisés afin de déterminer les caractéristiques biochimiques de l'espèce bactérienne isolée. Le système API 20E se présente sous la forme d'une bande de plastique (figures 21et 22) avec 20 microcupules contenant des substrats déshydratés pouvant permettre la détection de certains caractères biochimiques qui sont :

- Fermentation des carbohydrates : glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, mélibiose, amylase et arabinose ;
- Décarboxylation des acides aminés : lysine, ornithine et arginine.
- Hydrolyse de l'urée.
- Formation d'indole, la production d'acétïone.
- Hydrolyse de la gélatine.
- Hydrolyse de l'ONPG.

II.6.5. Ensemencement d'une galerie API 20 E

- **Préparation de l'inoculum** :

A partir d'une culture pure de 18 à 24 h (culture jeune) sur milieu d'isolement approprié, un raclage à l'aide d'une pipette pasteur de quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques a été effectué. . Dans le cas de *Streptococcus spp,* on a Utilisé un écouvillon pour prélever plus facilement les colonies bactériennes.

Bien décharger la pipette ou l'écouvillon dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%Na. homogénéiser la suspension bactérienne par l'agitateur magnétique, son opacité doit être équivalente à 0,5Mac Farland (MF) ou à une densité optique (D.O). De 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

La suspension bactérienne doit être utilisée dans les 15 minutes suivant sa préparation.

- **Préparation de la galerie :**

-Mettre quelque goute de l'eau distillée sur le fond de la boîte (partie alvéolée) pour former une chambre humide. Toutes les alvéoles doivent être remplies.

-Puis placer la galerie sur le fond de la boîte elle doit être manipulée avec la pince.

-Recouvrir la boîte avec son couvercle.

-Inscrire nom, référence souche, date et température d'incubation sur la languette latérale de la boîte.

L'ensemble est incubé à une température adaptée pendant 24h à 37°C.

- **Inoculation et lecture de la galerie** :

Ensemencer la galerie avec une pipette Pasteur stérile ouverte chargée en suspension, pointe posée sur un côté de la cupule, en laissant couler doucement la suspension dans la cupule. Tenir la boîte légèrement inclinée pour éviter la formation de bulles.

- Pour les caractères encadrés (**CIT, VP, GEL**) : remplir entièrement la cupule (tube et orifice) ⟶ mise en aérobiose
- Pour les autres caractères, ne remplir que le tube.
- Pour les caractères soulignés (**ADH, LDC, ODC, H2S, URE**) : remplir l'orifice de la cupule avec de l'huile de paraffine stérile ⟶ mise en anaérobiose

Identifié et fermer la boîte et mettre à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

II.6.6.Calculer le profil numérique.

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois (chaque groupe de trois tests est séparé du groupe voisin par un trait vertical).

Chaque test donnant une réaction négative prend la valeur 0. Lorsqu'un test est positif, il prend la valeur1, 2 ou 4 selon sa position au sein d'un groupe de trois : si le premier test d'un groupe de trois est positif il est noté 1, si le deuxième test est positif il est noté 2 et si le

dernier test d'un groupe de trois est positif il est noté 4. Le 21ème test mentionné sur la fiche de résultat (OX), correspond à l'oxydase (test réalisé avant l'ensemencement de la galerie pour les entérobactéries).

Pour chaque groupe de trois, additionner les chiffres correspondants. On obtient un nombre à sept chiffres qui constitue le profil numérique de la souche étudiée.

La recherche du profil numérique dans le "Catalogue analytique" commercialisé par le fabriquant permet d'identifier la bactérie. Site API web.

II.6.7. Conservation des souches bactériennes :

1. Mettre 850 µl de la culture bactérienne dans un microtube.
2. Ajouter 150 µl de glycérol. Agiter le microtube, centrifuger brièvement.
3. Sur une étiquette, noter la date et le contenu.
4. Coller cette étiquette et mettre le microtube à -20°C



Figure N° 6 : Les étapes de conservation d'une souche bactérienne

II.6.8.Etude de l'antibiorésistance des souches isolées

L'étude des profils de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées a été réalisée par la technique de l'antibiogramme selon la méthode recommandée par l'**OMS** et répondant aux critères définis par le **CLSI** et standardisées depuis 1999 en médecine vétérinaire en Algérie (**OMS, 2011**).

II.6.8.1.Principe

Il consiste à estimer, in vitro, l'activité d'une dix(10) d'antibiotiques qui sont les plus en vue dans le traitement des mammites ovines sur le terrain.

II.6.8.2.Préparation de l'inoculum pour réalisé l'antibiogramme :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprie, racler à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Bien décharger la pipette ou l'écouvillon dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, et ajustée jusqu'à atteindre une opacité équivalente à 0,5 McF. L'ajustement s'opère en ajoutant, soit de la culture à la suspension bactérienne, soit de l'eau physiologique stérile à 0,9%.
- L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

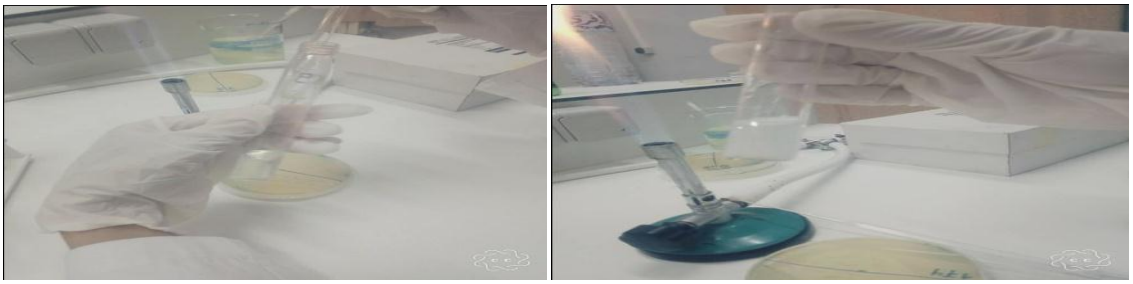


Figure N°07 : Préparation de l'inoculum bactérienne utilisé dans l'antibiogramme

II.6.8.3.Ensemencement :

- Plonger un écouvillon en coton stérile dans l'inoculum, étaler ce dernier sur la totalité de la surface gélosée du milieu Mueller Hinton.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boite de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Fermer les boîtes et laisser sécher 5 minutes sur la paillasse.

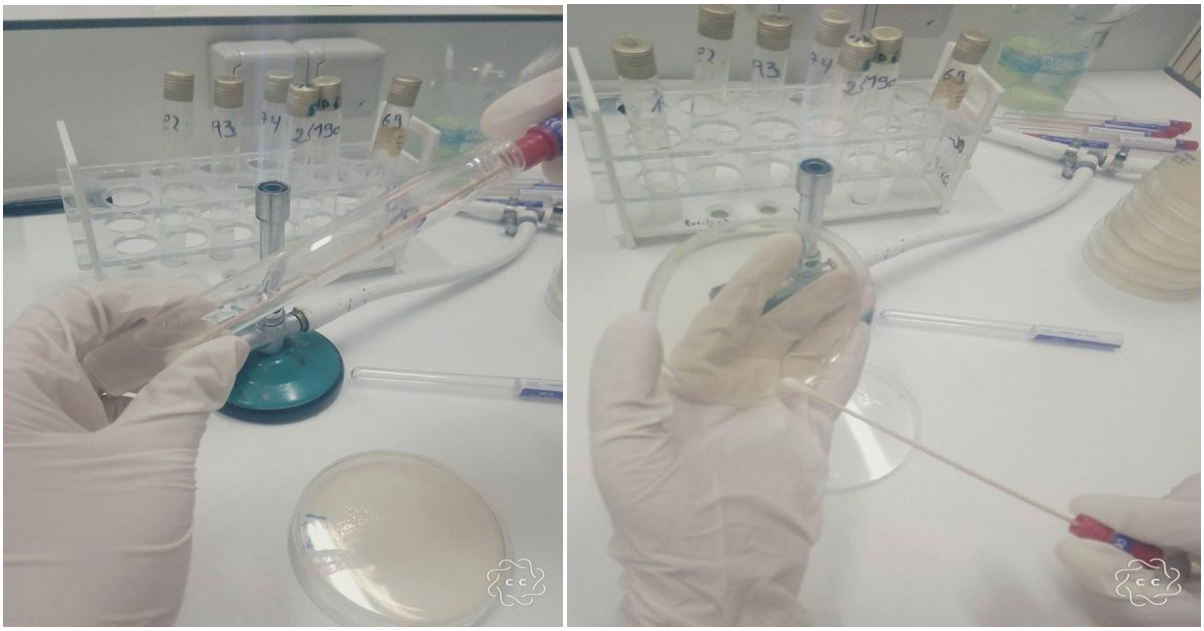


Figure N°08 : Ensemencement de l'inoculum bactérienne sur gélose MH

II.6.8.4.Application des disques d'antibiotiques et incubation :

- Chaque disque d'antibiotique est appliqué à l'aide de pince stérile.
- Disposer les disques de façon régulière.
- La liste des antibiotiques utilisée selon le groupe bactérien (tableau N°02).
- Les boites sont immédiatement incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

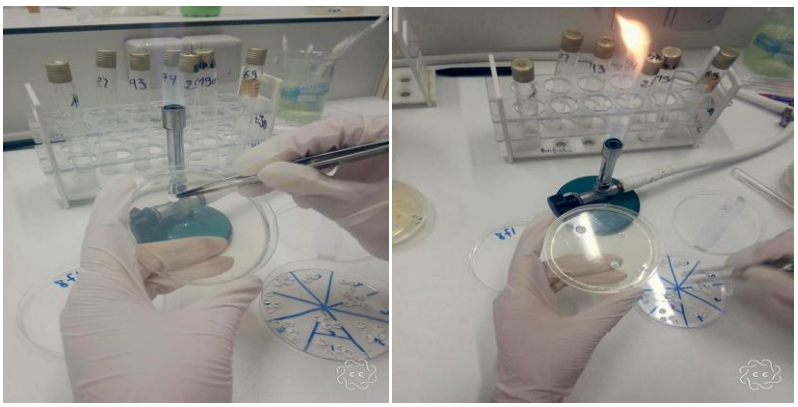


Figure N° 09 : Application des disques d'antibiotiques

Tableau 02 : Antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.

Famille	**Antibiotique**	**Sigle**	**Charge du disque (µg)**
β lactamines	Amoxiciline +Ac.clavulanique	AMC	30
	Apmiciline	AMP	10
	Céfotaxime	CTX	30
Aminosides	Kanamycine	KMN	30
	Gentamycine	GMN	10
Phenicoles	Chloramphénicole	CHL	30
Quinolones	Ofloxine	OFX	05
Polypeptides	Colistine	COL	10
Céphalosporines	Céphalothine	CEF	30
Sulfamides et associes	Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	SXT	25

II.6.8.5.La lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle.

Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture dans le guide de standardisation d'antibiogramme a l'échelle nationale pour la médecine vétérinaire, ensuite la bactérie est classée dans l'une des catégories : sensible, intermédiaire ou résistante.

- Les résultats ont été interprétés selon les critères du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2010).

➢ **Analyse statistique**

Le traitement des données et les représentations graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Microsoft office Word 2007. L'analyse statistique a été réalisée à partir des valeurs obtenues par l'application des tests (chi2, intervalle de confiance) pour la comparaison entre les différents paramètres étudiés.

Résultats et discussion

III.1.Résultats de l'enquête épidémio-clinique:

Durant la période d'étude s'étalant du 21 janvier au 16 mai 2018, huit (08) souches des entérobactéries ont été isolées avec treize (13) souches de référence qui a été déjà préparé par notre co-promoteur Mr.AZZI durant une période d'étude de 12 mois 2017 donc 21 souches isolées à partir de 228 prélèvements du lait de brebis ont été récollettes à partir du cinq(05) communes de MEDEA.

Les principaux facteurs qui peuvent influencer sur l'apparition des mammites à entérobactérie chez la brebis sont représentés dans cette partie, les tableaux lésionnels et les différents procédés de traitement appliqué et leurs efficacités. Parmi les facteurs influençant l'apparition de cette pathologie, nous citons ceux qui sont liés à l'animal et ceux qui sont en relation aux conditions d'élevage.

III.1.1.La brebis:

Choix des brebis **:** L'espèce ovine a été choisie comme modèle pour étudier les mammites des ruminants pour différentes raisons. D'abord, il existe de fortes ressemblances entre la physiologie (mérocrine) et la physiopathologie de la mamelle et des mammites entre les ovins et les bovins. C'est beaucoup moins vrai pour les caprins, qui ont un mode de sécrétion apocrine du lait et une cellularité différente tant au plan quantitatif que qualitatif (Bergonier *et al.*, 2003). De plus, on dispose d'enregistrements CCS et d'une évaluation génétique sur une large population de brebis **(Rupp *et al.*, 2003).** Enfin, on a dans cette espèce une plus grande facilité pour élever, produire, et faire le suivi d'un nombre significatif d'animaux.

Les brebis ne sont pas seulement modèle dans l'étude, mais également cibles : cette sélection est aussi utilisée en élevage laitier ovin depuis 2002 **(Rupp *et al.*, 2003).**

III.1.1.1.L'âge :

Les résultats relatifs à la prévalence des mammites ovines à entérobactérie en fonction de l'âge sont rapportés dans le tableau 03et illustrés par la figure 10.

Tableau 03: Proportion des mammites des ovins a entérobactérie en fonction de l'âge des brebis.

L'âge des brebis	Nombre des cas	Fréquence	Intervalle de confiance	P
2 ans	05	23 ,81%	[05,36% ; 42,60%]	0,003
3ans	07	33,33%	[12,48% ; 53,10%]	
4 ans	05	23,81%	[05,36% ; 42,60%]	
5 ans	02	9,52%	[03,09% ; 23,20%]	
6 ans	01	4,76%	[04,51% ; 10,10%]	
7 ans	01	4,76%	[04,51% ; 10,10%]	
Nombre total	21	100%		

L'analyse statistique (test du khi-deux) montre que la différence des prévalences des mammites ovine a entérobactérie en fonction de l'âge est significative ($p < 0,05$) donc les animaux présentent une différente sensibilité à l'affection en fonction de l'âge et les brebis âgée de 3 ans apparaissent plus sensibles (33,33%).



Figure N°10: répartition des mammites ovines a entérobactérie en fonction de l'âge.

Au cours de la présente étude, on a trouvé que l'âge de l'animal joue un rôle important sur l'augmentation de la prévalence de la maladie, comme celle décrite par **Al-Majali et *al* (2003)** et **Beheshti et *al* (2010),** où ils ont signalés que les brebis âgées sont à risque à la mammite clinique que les brebis jeunes contrairement au notre résultats, cela peut être

expliquer par l'âge moyenne du cheptel ovin étudié où nous avons remarqué la fréquence élevé des élevages des jeunes animaux.

III.1.1.2. Numéro de lactation:

Le tableau 04 et la figure 11 indiquent la prévalence des mammites à entérobactérie constatée en fonction de numéro de lactation des brebis.

Tableau 04 : Répartition des mammites clinique a entérobactérie des brebis en fonction de numéro de lactation.

Numéro de lactation	Nombre de cas	Fréquence	Intervalle de confiance	Proportion
01	02	09,52%	[03,09% ; 23,20%]	P=0,08
02	02	09,52%	[03,09% ; 23,20%]	
03	04	19,05%	[01,98% ; 36,10%]	
04	06	28,57%	[09,19 %; 48,80%]	
05	02	09,52%	[03,09% ; 23,20%]	
06	04	19,05%	[01,98% ; 36,10%]	
08	01	04,76%	[04,51% ; 10,10%]	
Nombre total	21	100%		

L'analyse statistique (test du khi-deux) montre que la différence des prévalences des mammites ovine a entérobactérie en fonction de numéro de lactation est non significative ($p>0,05$) donc les animaux présentent la même sensibilité à l'affection quelque soit le numéro de lactation malgré que les brebis a numéro de lactation 04 apparaissent plus sensibles (28,57%).



Figure N°11: répartition des mammites ovines a entérobactérie en fonction de numéro de lactation.

III.1.1.3. Stade de lactation:

La répartition de la population est hétérogène par rapport au stade de lactation, une fréquence très élevée de 71,43% En début de lactation. Les résultats sont rapportés dans le tableau 05 et le figure 12.

Tableau 05 : répartition des cas de mammites clinique a entérobactérie en fonction de stade de lactation.

Stade de lactation	Nombre des cas	Fréquence	Intervalle de confiance	Proportion
En début de lactation	15	71,43%	[51,19% ; 90,80 %]	P=0,002
En pic de lactation	04	19,05%	[01,98% ; 36,10%]	
En fin de lactation	01	4,76%	[04,51% ; 10,10%]	
Après tarissement	01	4,76%	[04,51% ; 10,10%]	
La totalité	21	100%		

L'analyse statistique (test du khi-deux) montre que la différence des prévalences des mammites ovine a entérobactérie en fonction de stade de lactation est significative ($p < 0,05$) donc les animaux présentent une différente sensibilité à l'affection en fonction de stade de lactation et on remarque que les brebis en début de lactation apparaissent plus sensibles (71,43%).

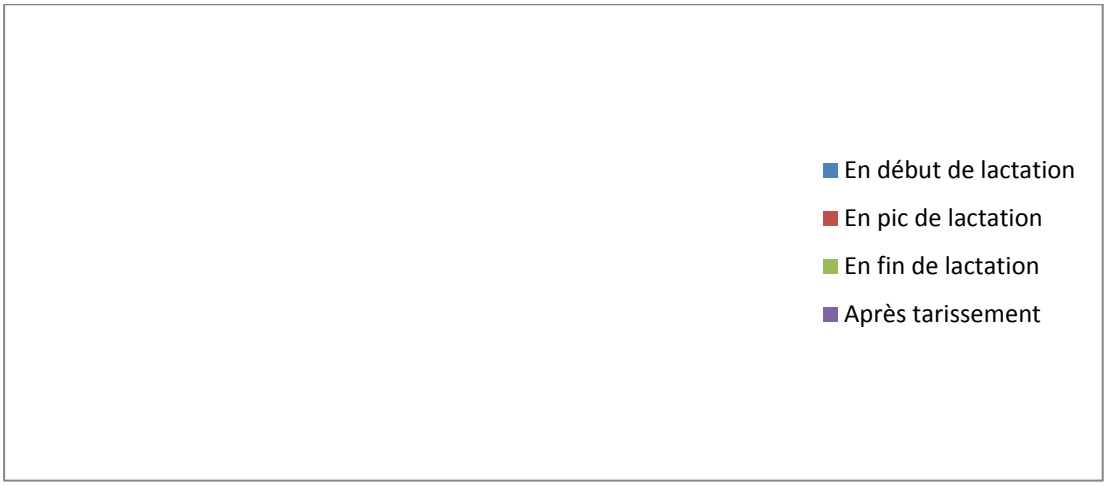


Figure N°12: répartition des mammites ovines a entérobactérie en fonction de stade de lactation

D'autre part, on a observé une tendance à l'augmentation du taux de l'incidence avec le stade de lactation, surtout en début de lactation, où elle donne une fréquence 71,43 %. Ces résultats sont en concordance avec les résultats rapportés par **Mork et *al* 2007, Vatn 2005, Arsenault 2008** où la mammite s'est produite pendant les trois premières semaines après l'agnelage. Selon **Onnasch et *al* (2002)** la mammite produite pendant la première semaine de lactation et entre la troisième et quatrième semaine, alors que **Jones en 1991** décrit une mammite produite à la première semaine de lactation et entre la quatrième et septième semaine après l'agnelage.

Le stade de lactation de l'animal a été toujours un facteur important qui régit la prévalence de la mammite clinique des brebis **(Kirk et *al*, 1996 ; Leitner et *al*, 2001 ; Menzies, 2007).** Globalement, dans nos résultats la différence entre la prévalence de mammites clinique enregistrés, pendant les différentes stades de lactation est statistiquement significative ($p<0,05$), ce qui suggéré que le stade de lactation constitue un facteur de risque très important dans l'épidémiologie de la mammite clinique. En plus, en raison de la détection et de l'élimination pauvre de telles infections pendant la lactation, avec une persistance très longue de la maladie selon l'agent étiologique. **(Bergonier et *al*, 1996).**

Selon **Vandiest** en **2012** Le risque de mammite est présent durant toute la période de la citation, mais surtout durant les deux premiers mois lorsque la production de lait est importante.

III.1.1.4. Les conditions d'élevage:

Tableau 06 : Les conditions d'élevages :

Les informations			Le nombre	Le pourcentage%
Les conditions d'élevage	Stabulation	Libre	19	90,48
		Entravée	02	9,52
	Etat de propreté	Bon	06	28,57
		Moyen	10	47,62
		Mauvais	05	23,81
	Nature du sol	Sec	11	52,38
		Humide	07	33,33
		Boueux	03	14,29

Les résultats de notre enquête montre que 90, 48% des élevages ont été des stabulations libre et 9,52% sont des stabulations entraver. L'état de propreté des élevages dans 45,62% des cas était moyen, 28,57% bon et le reste 23,81% mauvais. La nature de sol dans la majorité des cas était sec 52,38%, 33,33 humide et dans 14,29% des élevages étaient boueux.

Le pourcentage élevé de la mammite clinique pourrait être due aux mauvaises conditions d'élevage (stabulation est majoritairement libre) avec un manque d'hygiène, ce qui favorise la mammite. Ce constat a été rapporté par **Shekimweri en 1992**.

Alors que dans notre cette étude :les brebis à l'état de propreté moyen et stabulation libre sont les plus touché par les entérobactéries

Selon de **Bulletin trimestriel (2012) ;** l'élevage ovin en Algérie conduit d'une manière traditionnel caractérisé par un système extensive **.**Toutefois ; le système de gestion des exploitations et considéré comme l'un des facteur influençant la qualité physicochimique et hygiénique du lait ovin **(Yabrir et al ., 2003)**

III.1.2.Aspect clinique des cas de mammites ovines a entérobactérie:

Les données relatives aux renseignements sur la mammite, état de la mamelle et l'aspect du lait ont été recueillies lors de nos visites et résumé dans le tableau 07 et les figure 13, 14 et 15.

Tableau 07 : Informations cliniques sur les cas des mammites ovines à entérobactérie:

Informations			Cas positive	Cas négative
Mammites	Les signes cliniques	Fièvre	16	05
		Dégradation de l'état général	11	10
		Baisse de l'appétit ou anorexie	15	06
		Déshydratation de l'animal	00	21
		Signe de toxémie	00	21
	Etat de la mamelle	Gonflée	18	03
		Douloureuse	15	06
		Rougeâtre	12	09
		Dure	17	04
		Chaude	14	07
		Nécrosée	00	21
	Aspect du lait	Aspect normal	05	16
		Présence des grumeaux	14	07
		purulent	09	12
		Aqueux	13	08
		Sang	14	07

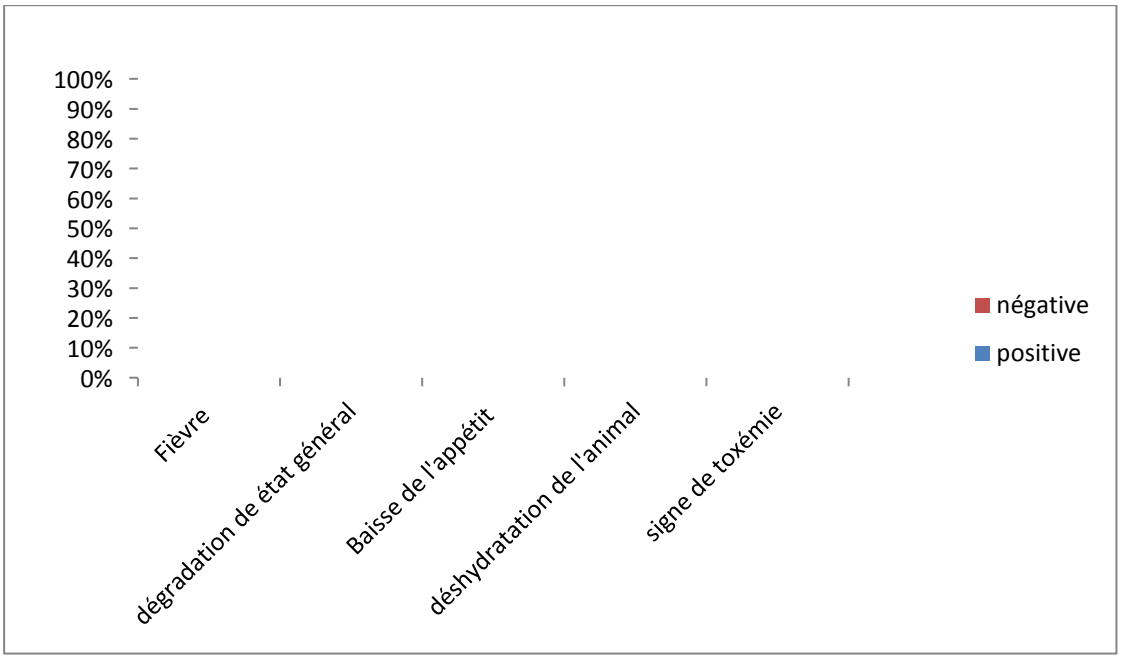


Figure N°13 : La fréquence des différents signes cliniques lors des mammites à entérobactéries.

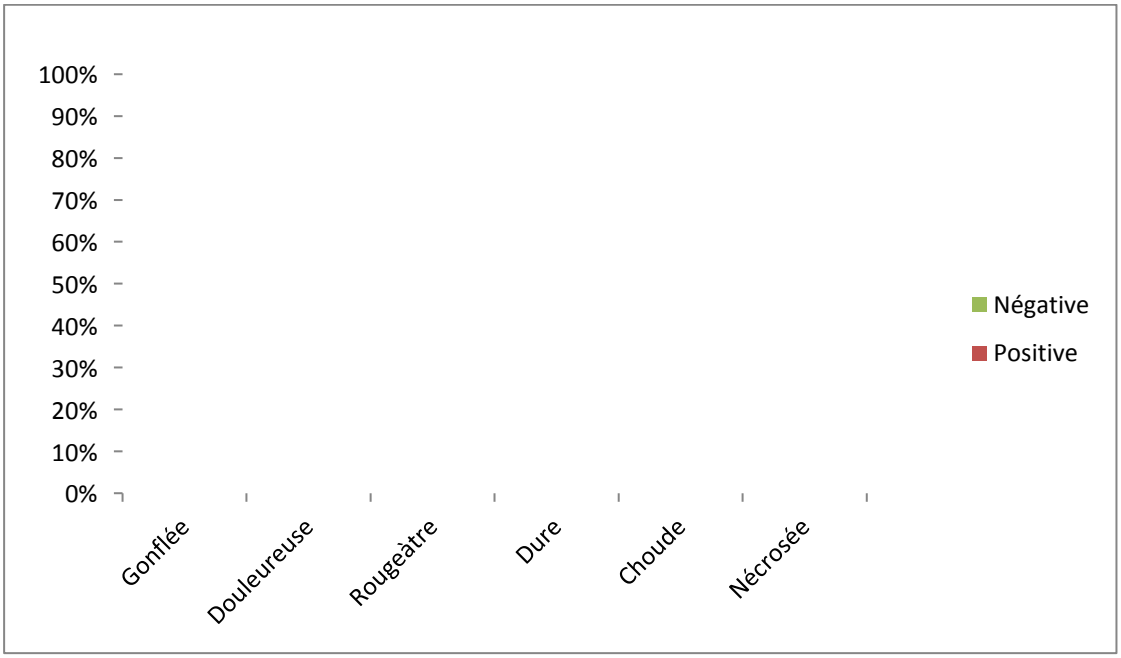


Figure N°14 : Prévalence selon état de mamelle lors des mammites à entérobactéries.

Nous avons enregistré pour la plupart des mammites a entérobactéries un état de la mamelle gonflée, douloureuse, dure et chaude .la même chose était décrit par **Vandiest (2012)** que les mammites aiguës (ou cliniques) qui s'expriment par des symptômes observables visuellement et qui sont douloureux pour la brebis, signes cliniques lui sont révélés :

- Gonflement de la mamelle et modification de l'aspect du lait (lait aqueux contenant des grumeaux),
- Pis chaud, rouge et douloureux (déplacement accompagné de boiterie),
- Brebis affaiblie (hyperthermie, prostration, isolement).

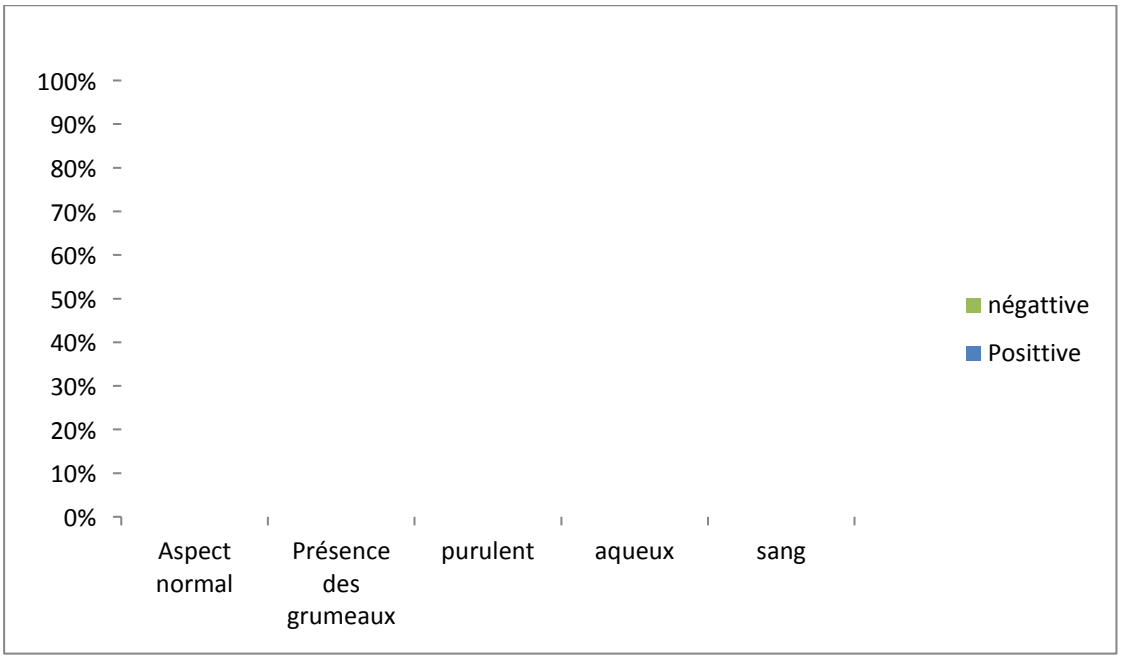


Figure N°15: Prévalence selon l'aspect du lait lors des mammites à entérobactéries.

III.1.2.1.La zone du prélèvement :

Le tableau 08 présente la Prévalence des mammites chez les brebis dans la région de MEDEA plus précisément à Ain boucif ;Boughzoul ;Chahbounia ;Kef lakhdar et Elaouinet

Tableau 08 : Répartition de cas de mammites a entérobactéries en fonction de la zone du prélèvement.

Zone du prélèvement (commune)	Nombre des prélèvements	Pourcentage %
Ain boucif	13	61,90
Boughzoul	03	14,29
Kef lakhdar	02	9,52
Elaouinet	01	4,76
Chahbounia	02	9,52
Nombre total	21	100



Figure N°16 : Prévalence des mammites clinique chez les brebis dans les zones du prélèvement

III.1.2.2. la fréquence saisonnière des mammites a entérobactéries chez la brebis

Les résultats relatifs à la prévalence des mammites ovines à entérobactérie en fonction des saisons sont rapportés dans le tableau 09 et illustrés en fonction des mois par la figure 17.

Tableau 09 : Répartition des entérobactéries dans le lait des brebis en fonction des saisons

Les saisons	L'effectif	La fréquence	Intervalle de confiance	Proportion
Hiver	10	47,62 %	[26,20% ; 69,80%]	P=0,002
Printemps	04	19,05%	[01,98% ; 36,10%]	
Eté	01	4,76%	[09,19 %; 48,80%]	
Automne	06	28,57%	[09,19 %; 48,80%]	
Totale	21	100%		

L'analyse statistique (test du Khi -deux) montre que la différence des prévalences des mammites a entérobactéries des ovins entre les quatre saisons est hautement significative ($p<<0,05$) et que l'intensité d'apparition de ce type des mammites est plus importante en hiver, moindre en automne et au printemps et devenir plus faible en été.

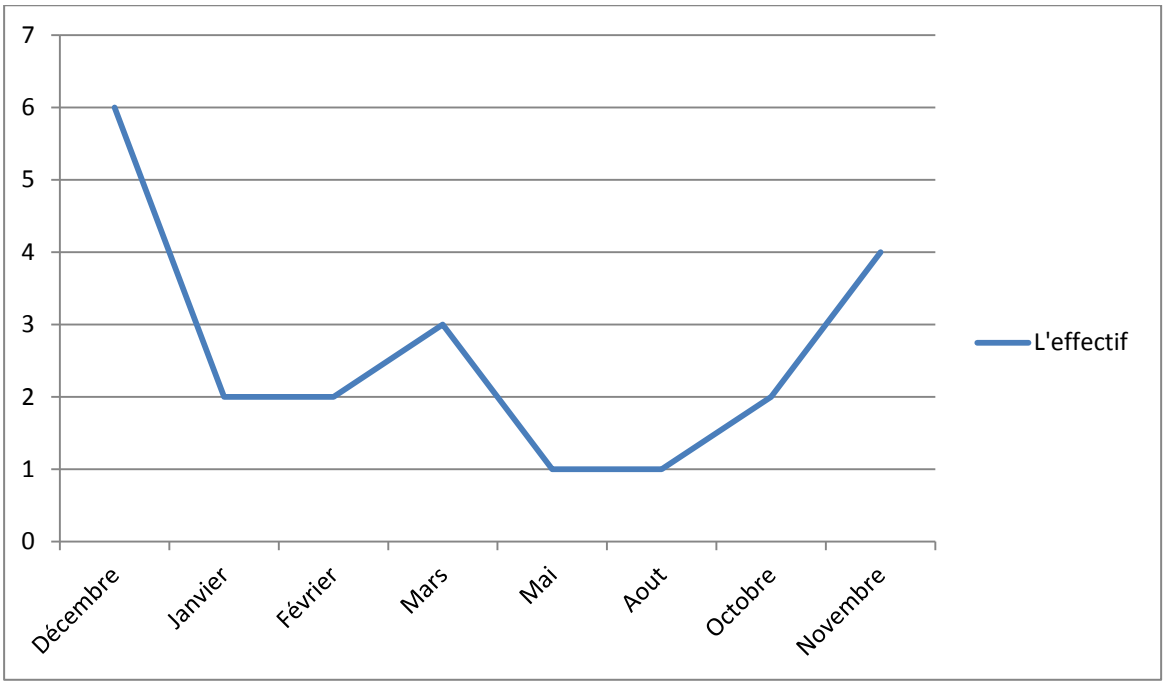


Figure N°17: Fréquence saisonnière des cas de mammites a entérobactéries.

On se trouve que la répartition des mammites à entérobactéries au l'hiver et l'automne plus élevé donc nos résultats se concordent avec ceux rapportés dans une étude de **Rozette en 2008** que Les conditions climatiques telles que le froid et l'humidité prédisposent aux mammites. Il est probable que le froid réduise la circulation sanguine vers la mamelle provoquant une baisse de l'immunité.

III.2.Analyse microbiologique :

- **Isolement et identification :**

Parmi les 228 prélèvements du lait des mammites ovines ; 21 espèces appartiennes a la famille de entérobactériaceae ont été isolée à partir des quelque communes de MEDEA qui sont : Ain boucif ; Boughzoul ;Chahbounia ; Kef lakhdar et Elaouinet. La répartition des entérobactéries et présenté dans le tableau 10.

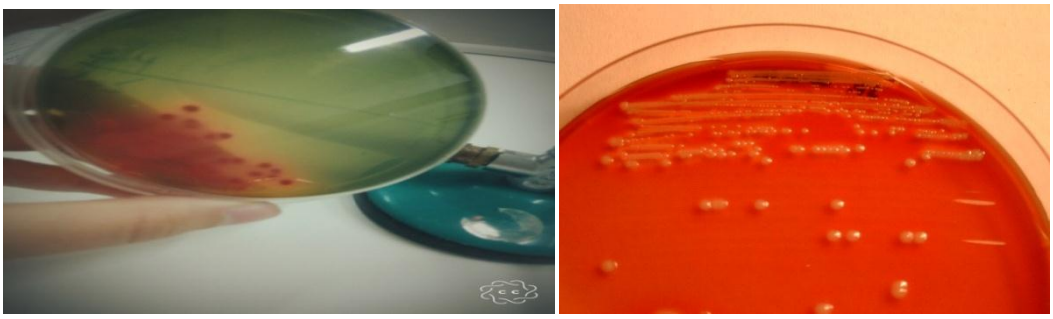


Figure N°18 : isolement des entérobactéries sur milieu Héktoen

Tableau 10 : Les résultats des prélèvements :

Statistique / Les résultats	Les nombres	Les pourcentages %
résultats total des prélèvements	228	100
résultats des prélèvements avec des souches appartiennent aux entérobactéries	21	9,21
Résultats des prélèvements qui présents des souches différents aux entérobactéries	207	90,79

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que les entérobactéries sont décillées dans 09,21% des échantillons total de lait de brebis examiné.des valeur superieure sont rapporté par certain auteur **Muehlherr et al.(2003)** en suisse 71,4% et smaali .2014 à l'est algériens 19%.

Cependant la famille des entérobactéries renferme des micro-organismes les plus pathogènes, il sont souvent rencontrées dans les aliments **(Chaves-Lopez et al 2006 ;Fulya 2011).**

Les entérobactéries peuvent être à l'origine des IMI(infection intra-mammaires)mais avec des taux faibles **(Bergonier et al ., 2003)** .Ces résultats peuvent être reliés a une série de facteurs , y compris le manque d'hygiène dans les fermes(**Muehlherr et al.2003)**

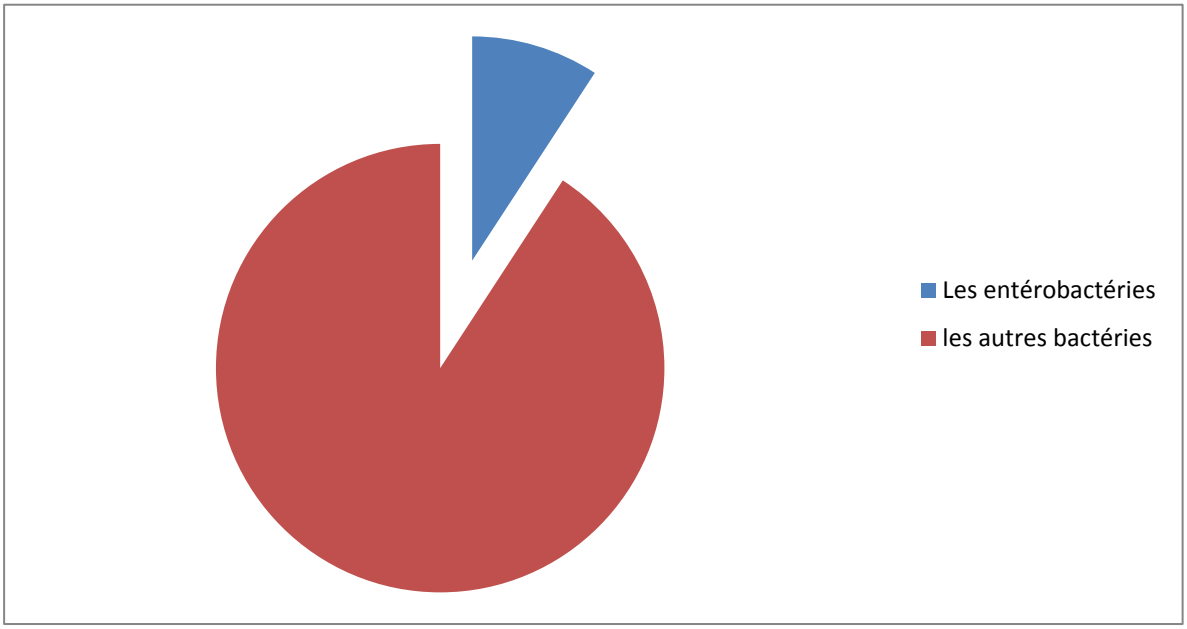


Figure N°19 : Fréquence des entérobactéries isolée au lait des mammites clinique.

- **Observation microscopique :**

Donnant un aspect rosé. Souvent on a une coloration bipolaire et des Bacille ou cocobacille de taille moyen, isolée et par fois en amas.
(On fait cet examen microscopique juste pour la confirmation)

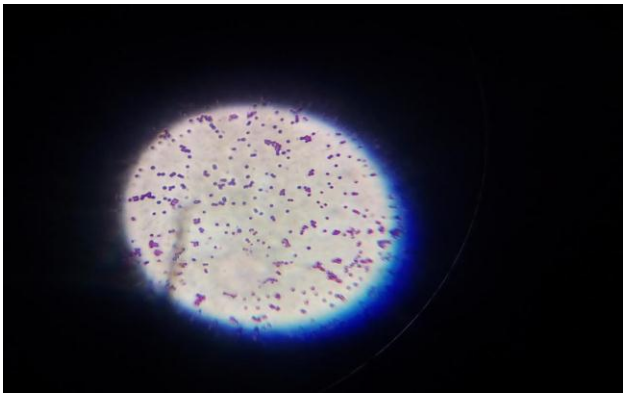


Figure N°20 : Observation microscopique d'entérobactéries

III.2.1.Identification spécifique :

Résultats des galeries API 20 E :

Dans notre étude, l'analyse microbiologique qui a porté sur 228 prélèvements de lait cru de mammite ovins nous a permit d'isolé et purifié 21 isolats suspectés d'êtres entérobactéries, par la suite nous avons réalisé une identification en utilisant le système miniaturisé API 20 E pour l'identification des isolats suspectés.



Figure N°21 : profile biochimique *d'E.coli* sur galerie API 20 E.



Figure N°22 : Profile biochimique de *klebsiella pneumonia* sur galerie API 20 E

III.2.2.Nature et prévalence des différentes espèces d'entérobactéries isolées:

Nos résultats montrent des pourcentages différents pour les principales espèces bactériennes obtenues. La répartition des souches montre que les *E.coli* constituent l'espèce la plus isolée 71,43%, suivi d' *Enterobacter cloacae* avec 19,05%, et nous avons isolée une seul bactérie de *Citrobacter freundi* et une autre de *Klebsiella pneumoniae* (tableau 11)

Tableau 11 : fréquence des différentes espèces d'entérobactéries isolées :

L'espèce	Les numéros	Les pourcentages %
E.coli	15	71,43
Klebsiella pneumoniae	01	4,76
Enterobacter cloacae	04	19,05
Citrobacter freundi	01	4,76
Nombre totale	21	100

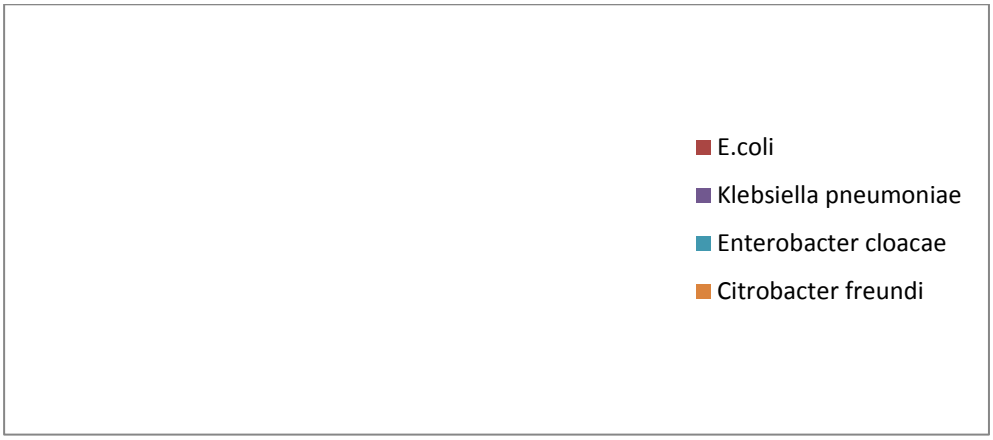


Figure N°23 : Répartition des espèces des entérobactéries isolée par quartier

Pour les entérobactéries étudiées ,les résultat révèlent qu' *Escherichia coli* était l'espèce le plus isolée, ce qui concorde bien avec ceux obtenus en Tunisie (**Messai et al.,2007**), au Maroc (**Sekhsok et al.,2008**)et en France (**Gardien et al.,1997**) cet dernier se trouve une fréquence de 40,2% contre une pourcentage plus élevé dans notre étude (71 ,43%).

On trouve les *Escherichia coli* (71,43 % des isolements des entérobactéries), La prévalence des *E coli* dans les mammites cliniques varie selon les différentes études. Selon l'étude de **Baysal & Kenar (1989) ; Lafi et *al* (1998)** on estime une prévalence très proche de 18,7%. Par contre à l'étude de **Marco et al (1991)** où elle trouve une fréquence très basse de 2,5%.

III.3.Résultats de l'antibiogramme

L'antibiogramme a permis de déterminer, in vitro, la résistance et la sensibilité de l'ensemble des souches isolées. Ces dernières ont été testées vis-à-vis des différents antibiotiques énumérés dans le chapitre matériels et méthodes.

L'interprétation des résultats est simple ce qui explique son intérêt :

-Une souche est dite sensible à un antibiotique si sa croissance peut être réduite par un traitement à base de cet antibiotique

-Une souche est dite intermédiaire à un antibiotique si elle n'est pas atteinte par un traitement standard ; mais si une augmentation de la dose d'antibiotique permet de détruire ce germe

-Une souche est dite résistante à un antibiotique si elle ne peut être atteinte par ce traitement même en augmentant les doses d'antibiotique.

Les résultats de l'antibiogramme, sont reportés dans le tableau 12.

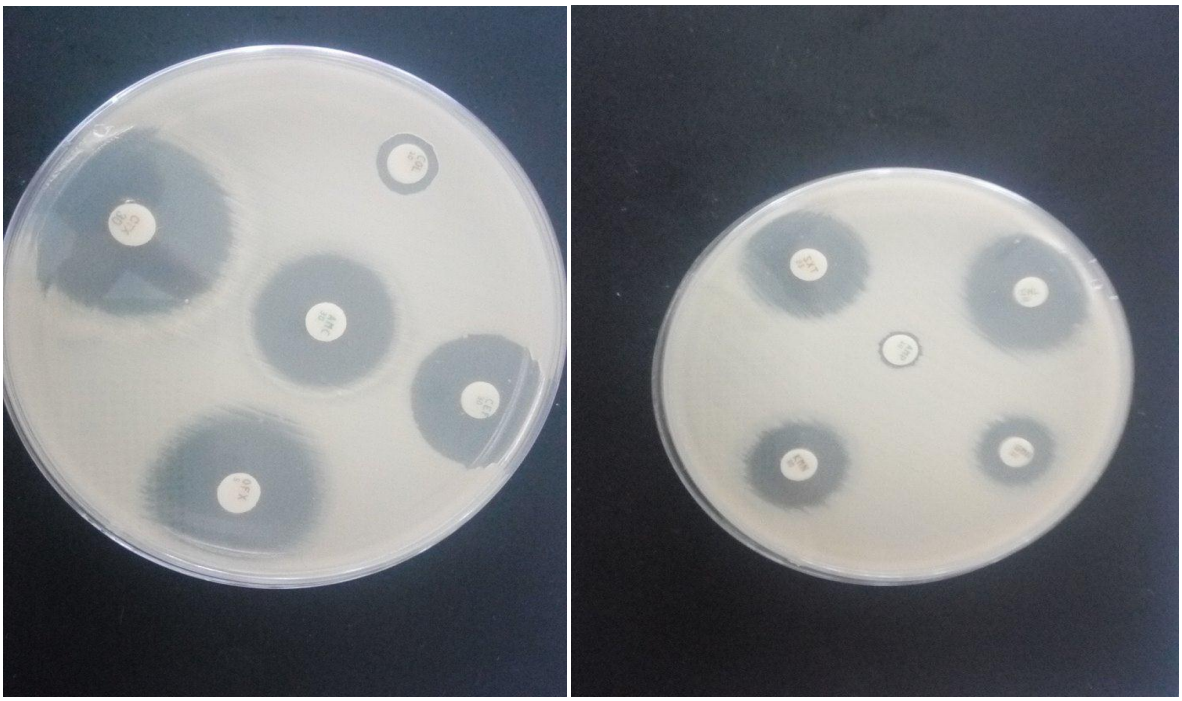


Figure N°24: Sensibilité aux ATB des isolats des entérobactéries

Tableau 12 : La sensibilité et la résistance de différentes souches d'entérobactéries isolées aux antibiotiques

Référence	Identification	AMC	AMP	CEF	CHL	COL	OFX	SXT	KMN	GEN	CTX
22(a)	*E.coli 1*	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S
77(a)	*E.coli 1*	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S
12	*E.coli*	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
3	*E.coli 1*	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S
13	*E.coli 1*	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
198	*E.coli*	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S
25	*E.coli*	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S
173	*Enterobacter cloacae*	R	R	R	R	S	R	R	I	R	S
174	*Enterobacter cloacae*	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S
59	*E.coli*	S	R	I	S	S	S	R	I	S	S
69	*E.coli*	I	R	R	S	S	S	R	S	S	S
178	*E.coli*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
190	*E.coli*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
205	*E.coli*	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
5	*Enterobacter cloacae*	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
37	*E.coli*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
170	*E.coli*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
221	*E.coli*	I	R	S	S	S	S	R	S	S	S
215	*Citrobacter freundi*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
164	*Klebsiella Pneumoniae*	S	R	S	S	R	S	S	I	S	S
113	*Enterobacter cloacae*	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S

Tableau 13: statistique sur les résultats d'antibiogramme

Référence	Les souches isolées	Nombre des antibiotiques résistants	Nombre des antibiotiques sensibles	Nombre des antibiotiques intermédiaires
22(a)	*E.coli*	01	08	01
77(a)	*E.coli*	00	08	02
3	*E.coli*	01	07	02
13	*E.coli*	00	09	01
12	*E.coli*	00	09	01
25	*E.coli*	02	07	01
59	*E.coli*	02	07	01
69	*E.coli*	03	06	01
178	*E.coli*	00	10	00
190	*E.coli*	00	10	00
205	*E.coli*	02	07	01
37	*E.coli*	00	10	00
170	*E.coli*	00	10	00
221	*E.coli*	02	07	01
198	*E.coli*	01	08	01
173	*Enterobacter cloacae*	08	01	01
174	*Enterobacter cloacae*	07	01	02
5	*Enterobacter Cloacae*	03	07	00
113	*Enterobacter cloacae*	03	07	00
164	*Klebsiella pneumoniae*	02	07	01
215	*Citrobacter*	00	10	00

	freundi			

Il est difficile de comparer nos résultats obtenus avec les travaux de d'autre auteurs car les techniques de mesure de la sensibilité aux antibiotiques sont différentes (méthode d'ensemencement, technique de disques) tout comme les critères d'interprétation sont différents d'une étude à l'autre. **Erskine et *al*., 2001**.

Nous constatons que le pourcentage de sensibilité des entérobactéries est 100% pour la céfotaxime puis nous avons enregistré une sensibilité très élevé pour la colistine de 95,24% ;chloramphénicole de 90,48% et 80,95% pour Ofloxacine et Gentamycine et dans un degré moindre aux autres antibiotiques à savoir Kanamycine ; Amoxicilline acide clavulanique ; Triméthoprime + Sulfaméthoxazole ;Cephalothine et Ampicilne ont été respectivement 71,43% ; 61,90% ; 61,90 ; 52,38% ;47,62% .Nos résultats et représenté dans le tableau 14 et illustré dans la figure 25.

Tableau 14 : La sensibilité des souches des entérobactéries aux antibiotiques testé

ATB	Les souches résistantes		Les souches sensibles		Les souches intermédiaires	
	Nombre	fréquence%	Nombre	fréquence%	Nombre	fréquence%
AMC30µg	4	19 ,05	13	61,90	4	19,05
AMP10µg	10	47,62	10	47,62	1	4,76
CEF 30 µg	6	28,57	11	52,38	4	19,05
CHL 30µg	2	9,52	19	90,48	0	00
COL 10µg	1	4,76	20	95,24	0	00
OFX 5 µg	3	14,29	17	80,95	1	4,76
SXT25 µg	7	33,33	13	61,90	1	4,76
KMN30µg	2	9,52	15	71,43	4	19,05
GMN10µg	2	9,52	17	80,95	2	9,52
CTX 30µg	0	00	21	100	0	00

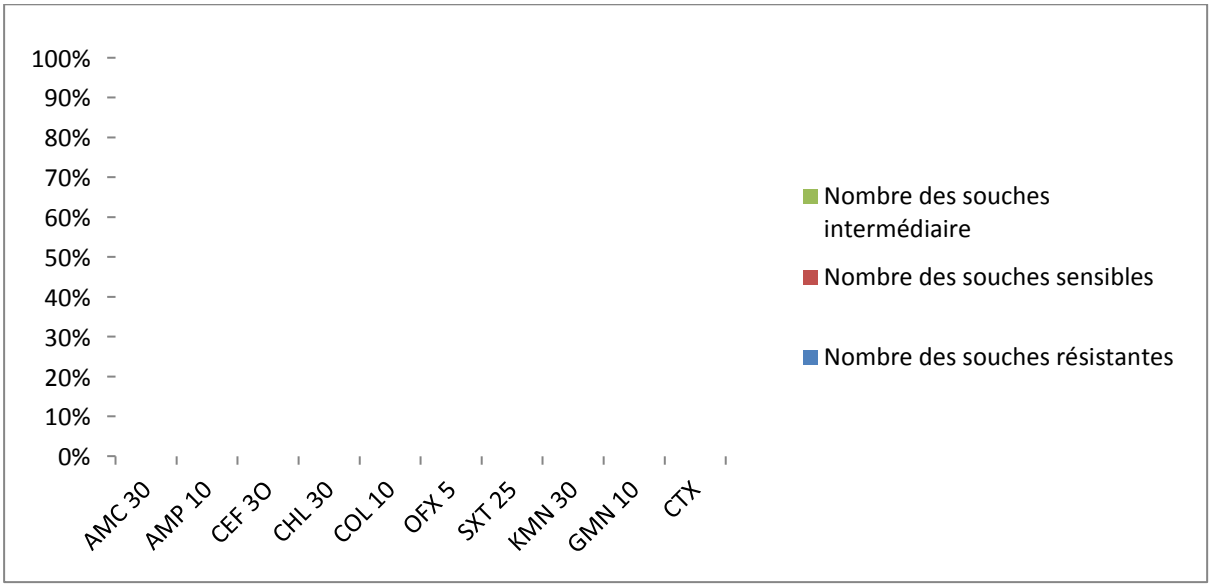


Figure N°25 : Profil de sensibilité et résistance des entérobactéries aux antibiotiques

Tableau 15 : La sensibilité et la résistance de différentes espèces isolées aux antibiotiques testé

Les souches / ATB		*E.coli*		*Enterobacter cloacae*		*Klebsiella pneumoniae*		*Citrobacter freundii*	
		Nbrs	P%	Nbrs	P%	Nbrs	P%	Nbrs	P%
AMC	R	00	00	4	100	0	00	0	00
	S	11	73,33	0	00	1	100	1	100
	I	04	26,66	0	00	0	00	0	00
AMP	R	04	26,66	4	100	1	100	0	00
	S	10	66,67	0	00	0	00	1	100
	I	1	06,67	0	00	0	00	0	00
CEF	R	2	13,33	4	100	0	00	0	00
	S	9	60	0	00	1	100	1	100
	I	4	26,66	0	00	0	00	0	00
CHL	R	0	00	2	50	0	00	0	00
	S	15	100	2	50	1	100	1	100
	I	0	00	0	00	0	00	0	00
COL	R	0	00	0	00	1	100	0	00

	S	15	100	4	100	0	00	1	100
	I	0	00	0	00	0	00	0	00
OFX	R	2	13,33	1	25	0	00	0	00
	S	13	86,67	2	50	1	100	1	100
	I	0	00	1	25	0	00	0	00
SXT	R	5	33,33	2	50	0	00	0	00
	S	9	60	2	50	1	100	1	100
	I	1	06,67	0	00	0	00	0	00
KMN	R	0	00	1	25	0	00	0	00
	S	13	86,67	2	50	0	00	1	100
	I	2	13,33	1	25	1	100	0	00
GEN	R	0	00	2	50	0	00	0	00
	S	13	86,67	2	50	1	100	1	100
	I	2	13,33	0	00	0	00	0	00
CTX	R	0	00	0	00	0	00	0	00
	S	15	100	4	100	1	100	1	100
	I	0	00	0	00	0	00	0	00

Nos résultats se concordent avec ceux rapportés dans une étude iranienne **Jalalpoor, (2011)** où les taux de sensibilité ont été très élevés surtout au CTX qui était actif à 74,5%.

III.3.1.*E.coli* :

Durant cette étude on a enregistré une sensibilité accrue de 100% des *E coli* vis-à-vis la Colistine, Chloramphénicol et Céfotaxime ; et de 86,67% pour la Ofloxin, Kanamycine et Gentamycine. Cependant la résistance est élevée pour amoxiciline acide clavulanic 73,33% ; 66,67% Ampiciline ; 60% pour Triméthoprime+Sulfaméthoxazole et meme ci pour la Cefalothine (figure 26)

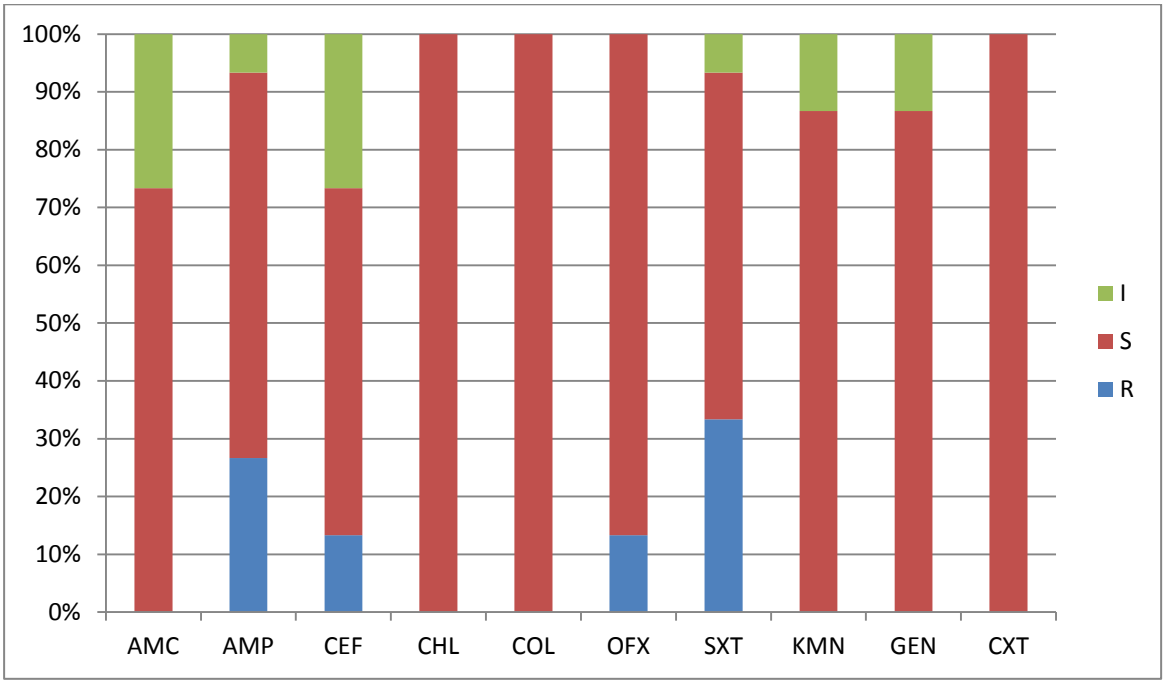


Figure N°26 : Pourcentage de sensibilité et de résistance des ***E.coli*** aux Antibiotiques

III.3.2.*Enterobacter cloacae :*

Selon nos résultats on a enregistré une sensibilité accrue de 100% des *Enterobacter cloacae* vis-à-vis le Céfotaxim, Colistin et de 50% pour le Chloramphinicol , Gentamicine ,Kanamycine ,Ofloxine et Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole Cependant La résistance est de 100% pour Ampicilline, Amoxiciline acide clavulanique et Céphalotine

Nos souches d'*Enterobacter* étaient sensibles aux aminosides, fluoroquinolones, Quinolones, Phénicoles et Sulfamides-trimethoprime. En comparaison avec le travail de **Makan D en 2007.** Ce dernier que ces souches d'*Enterobacter* étaient également sensibles aux aminosides et aux quinolones. D'autre part nos résultats sont confirmés par ceux de **Diall**, **(1989).**

Concernent le même espèce l'étude de **Abir R en 2014** et **Ndiaye A en 2005** a rapporté des taux de sensibilité pour les aminosides qui dépassent ceux trouvés dans notre travail (100% contre 50%). On notait aussi une assez grande sensibilité pour la Céfotaxime (100%), colistine (100%) ; Ces résultats sont presque similaires à ceux trouvés par **Souna**

(2010) qui a constaté que les souches qu'il avait isolées présentent une grande résistante pour les beta-lactamines.

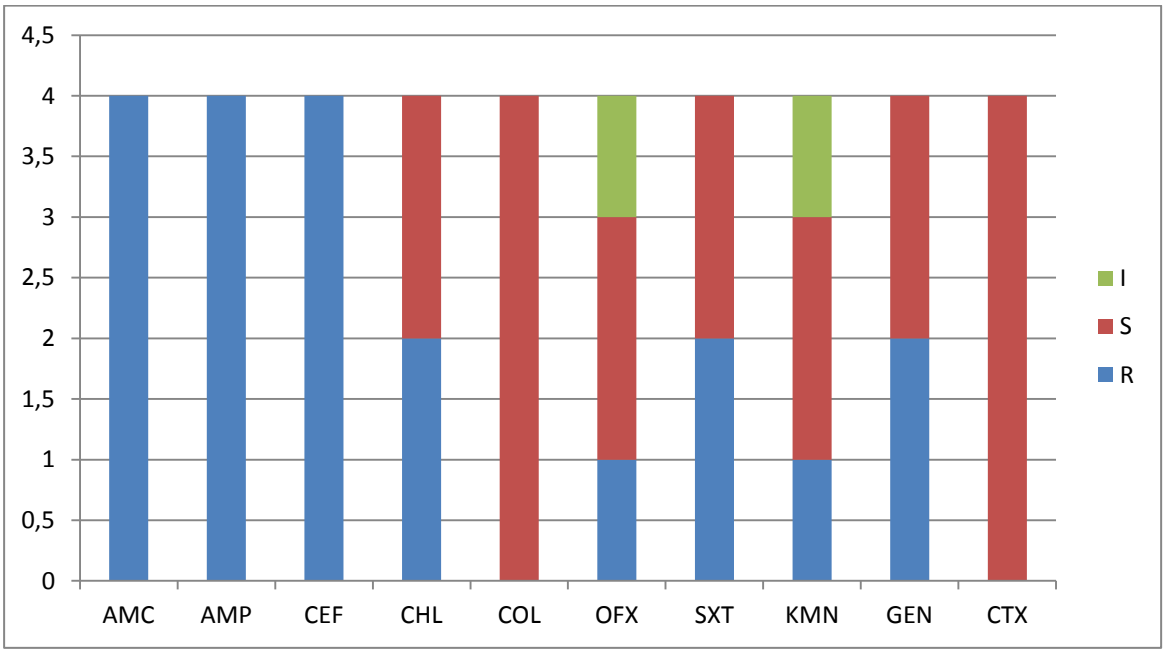


Figure N°27 : Pourcentage de sensibilité et de résistance des *Enterobacter cloacae* aux Antibiotiques

III.3.3.*Klebsiella pneumoniae :*

Durant cette étude on a isolées une seul souche de *klebsiella pneumoniae* qui est sensible aux Amoxicilline acide clavulanique ,Cephalothine ,Chloramphénicole , Triméthoprime+

Sulfaméthoxazole ,Ofloxacine et la Cephotaxime .En outre, la *Klebsiella pneumoniae* été résiste tel que les molécules des Ampicimine et Colistine.

Notre souche de *Klebsiella pneumoniae* et sensible aux antibiotiques :Cefotaxime, Chloramphénicol et Triméthoprime-Sulfanéthoxazol, ce résultat est similaire à celui rapporté par **Abid *et al.*, (2007)**. Avec une sensibilité aux Amoxicilline acide clavulanique , Cephalothine et Ofloxacine dans notre étude.

Concernant la même espèce, **Jalalpoor, (2011)** a rapporté des taux de sensibilité à CTX (71% qui est proche de ce que trouve dans notre travail 100%)

III.3.4.*Citrobacter freundii :*

Aussi on a isolés une seul souche de *Citrobacter freundii* cette dernière était sensible a tout les antibiotique testé dans notre étude.

Conclusion

Ce travail, réalisé pour objectif de définir le profil de sensibilité des entérobactéries isolées de lait cru des mammites ovines dans la wilaya de MEDEA.

Parmi les principaux facteurs influençant l'apparition de cette pathologie, nous citons ceux qui sont liés à :

-l'animal, premièrement cela concerne l'âge ; au cours de la présente étude, on a trouvé que l'âge de l'animal joue un rôle important sur l'augmentation de la prévalence de la maladie et nous avons enregistré que les jeunes brebis plus exposées aux mammites a entérobactéries que les brebis âgées .Puis la stade de lactation ;on a observé une tendance à l'augmentation du taux de l'incidence, surtout en début de lactation, où elle donne une fréquence 71,43%.

-Et ceux qui sont en relation aux conditions d'élevage; le pourcentage élevé de la mammite clinique pourrait être due aux mauvaises conditions d'élevage (stabulation est majoritairement libre) avec un manque d'hygiène, ce qui favorise la mammite et nous avons enregistré pour la plupart des mammites a entérobactéries un état de la mamelle gonflée, douloureuse, dure et chaude.

Les analyses bactériologiques des laits de mammites mettent en évidence la fréquence d'isolement des entérobactéries 9,21%. Les résultats révèlent une certaine diversité pour les espèces d'entérobactéries identifiées. L'espèce le plus prédominante si le *E.coli* (71,43%), suivie par *Enterobacter cloaceae*(19,05%) ;avec une seul souche de *klebsiella pneumoniae et de citrobacter freundii* .

Dans notre étude nous avons essayée aussi de déterminer le profil de la sensibilité des nos souches collectées et identifiées vis-à-vis 10 antibiotique par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé. Les résultats obtenus nous ont permit de constater que :

- Les souches des entérobactéries isolées sont marquées par une forte sensibilité

vis-à-vis des antibiotiques : la céfotaxime (100%) puis nous avons enregistré une sensibilité très élevé pour la colistine de 95,24% ;chloramphénicole de 90,48% et 80,95% pour Ofloxacine et Gentamycine et dans un degré moindre aux autres antibiotiques à savoir Kanamycine ; Amoxicilline acide clavulanique ; Triméthoprime + Sulfaméthoxazole ;Cephalothine et Ampicilne ont été respectivement 71,43% ; 61,90% ; 61,90 ; 52,38% ;47,62%.

- Les antibiotiques les plus actifs sur nos souches d*'E.coli* étaient :la Colistine, Chloramphénicol et Céfotaxime , Ofloxin, Kanamycine et Gentamycine.

- Les antibiotiques les plus actifs sur nos souches *d'Enterobacter cloaceae* étaient : La Céfotaxim et la Colistin.
- Les antibiotiques les plus actifs sur nos souche de Klebsiella pneumoniae étaient : Amoxicilline acide clavulanique ,Cephalothine ,Chloramphénicole , Triméthoprime+Sulfaméthoxazole ,Ofloxacine et la Cephotaxime.
- Notre souche de *Citrobacter freundii* était sensible a tout les antibiotique testé dans notre étude.

L'étude des profils de sensibilité aux antibiotiques a révélé des résistances marquées vis-à-vis de certains antibiotiques largement utilisés en médecine vétérinaire surtouts les Bêta-lactamines, ce qui laisse prévoir de nombreux échecs thérapeutiques.

Références

Abir, R. (2014). Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. Thèse. Faculté des sciences. Université badji mokhtar – annaba.

Avril, L. (2000). Bactériologie clinique. 2ed .Ellipses, Paris. pp. 171-177

Al-Majali, A.M., Jawabreh, S., (2003). Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. Small Ruminant Res. 47, 243–248.

Ansart, S., Xavier, N., Yvon, L., Pennec, Michel, G., (2005). Quand - utiliser une fluoroquinolone systémique ? Revue 29609 Brest Cedex.

Argente, G., Lardoux, S., LE Berre, K., Labbe, J-F., (2005). Valeur de l'observation clinique de symptômes simples de mammite pour prédire les bactéries en cause. Bull. Group. Tech. Vét., 32, 39-46

atteint de mammites, Rec. Méd. Vét., 1985, 161 (6-7) : p 617-623

Arsenault, J., Dubreuil, P., Higgins, R., Bélanger, D., (2008). Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. Prev. Vet. Med. 87, 373–393.

Bacon, R.T. (2003). Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial-resistant salmonella strains cultured under stationary-phase acid toleranceinducing and non-inducing conditions. Journal of food Protection. 66: 732-740**.**

Bagley, S.T., Seidler, R.J., Talbot, H.W.J., and Morrow, J.E., (1978). Isolation of *Klebsiella* from within living wood. Appl Environ Microbiol. 36: 178-185.

Barillet, F., Rupp, R., Mignon-Gastreau, S., (1999). Genetic analysis for mastitis resistance and somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. Milking and milk production of dairy sheep and goats. In : Proceedings of the 6th International Selection on the Milking of Small Ruminants, Athens, Greece Wageningen Pers, The Netherlands, pp 393-399.

Barkema, H.W., Green, M.J., Bradley, A.J., Zadoks. R.N., (2009). « Invited review: The role of contagious disease in udder health ». J. Dairy Sci92 (10): 4717-4729.

Bedolla, C.C., (2010). Tipos de mastitis ovina. Mimeo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolٍs de Hidalgo. 3pp.

Benlmouden, A., et Hakkou, F., (2007). Antibiotiques : Mécanismes d'action et de résistance. Service de Pharmacologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Casablanca, Maroc. La Chronique

Ibn Rochd.1: 46-54.

Bergonier, D., Berthelot, X., (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. Live Prod. Sci. 79, 1–16.

Blagitz, M.G., Benites, N.R., Melville, P.A., Batista, C.F., Betiol, P.S., Azedo, M.R., Gomes, V., Souza, F.N., Della Libera, A.M.M.P., (2012). Lactation stage and udder helathy status in Santa Ines ewes. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 64, 495–498.

Bonnefont, C. (2011). Analyses génomiques fonctionnelles de la résistance aux mammites : études de deux lignées divergentes de brebis sélectionnées sur la concentration cellulaire du lait. Thèse pour le doctorat vétérinaire, université de Toulouse, 223 p.

Bonnet, R. (2006). β-Lactamines et entérobactérie .In Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Antibiogramme . Edition ESKA.pp.141-177

BRADLEY A. J. et GREEN M. J., A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period, *J. Dairy Sci.*, 2000,83: p 1957-1965

Bryskier, A. (1999). Evolution de la chimiothérapie antibactérienne. Antibiotiques agents

Carattoli, A. (2001). Importance of integrants in the diffusion of resistance. Veterinary

Cattoir, V. (2006). Chloramphenicol, fosfomycine, acide fusidique et polymyxines. Chapitre In Antibiogramme. 2 ed. Paris. ESKA , P. 359-363.

Cattoir, V. (2012). Quinolones : de l'antibiogramme aux phénotypes de résistance. Rev Elsevier Masson SAS.

Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C., and Garrabé, E., (2004). Bêtalactamines. EMC Maladies infectieuses. 1: 129-202.

Charlier, P. (1998). Résistance bactérienne au β-lactamines. Synthèse.médecine/sciences. 14 : 544-555.

Changeur, N., Cherruault, M., (2009). Pharmacologie des aminosides (aminoglycosides). 3P.

Chopra, I.(1998). Research and developpement of antibacterial agents. Current opinion in Microbiology. 1:495-501.

Clements, A.C.A., Taylor, D.J., Fitzpatrick, D.J., 2003. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. J. Dairy Res. 70, 139–148.

Courvalin, P., Drugeon ,H., Flandrois ,J.P., Goldstein, F., (1991). Bactericidie: aspect théoriques et thérapeutiques ; édition maloine. Pages, 13, 14, 23, 26.

Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. Plasmid. 42, 73-91.

Dawson, M., (1987). Pathogenesis of maedi-visna. Vet Rec, 120:451-454 .

Dbaibo, G.S. (2000). Old and new targets of antibacterial therapy. *Leb Med J*. 48: 177-181.

Devillechaise, P. (1996). Mammites de la chèvre. Supplément Technique n°54 à la Dépêche Vétérinaire, 27-30.

Döpfer L., (2000) Adhesion and invasion of Escherichia coli from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro, Veterinary microbiology, 2000, 74:p 331-343

Ebrahimi, A., Lotfalian, Sh., y Karimi, S., (2007). Drug resistance in isolated bacteria from milk of sheep and goats with subclinical mastitis in Shahrekord district. Iranian Journal of Veterinary Research, University of Shiraz, Vol. 8, No. 1, Ser. No. 18.

Emmanuel, E. (2003). Evaluation des risques sanitaires et ecotoxicologiques lies aux effluents hospitaliers. L'institut national des sciences appliquées de LYON pour l'obtenir de grade du docteur. Formation doctorale: science et technique du déchet école doctoral de chimie de Lyon.pp. 59-60.

Erskine, R., Walker, R., Bolin, C., (2001). Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. J. Dairy Sci., 85: 1111-1118.

Fauchère, J.L., et Avril, J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses Edition Marketing. Paris. pp. 250-260

Ferech, M., and Coenen, S. (2006). "European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe". J Antimicrob Chemother. 58(2): 401-407

Fetherson, C.M., Lee, C., Hartmann, P.E., (2001). Mammary gland defense: the role of colostrums, milk and involution secretion. Advances in nutritional research, 10, chap 8167-198.

Fisher, J.F., Meroueh, S.O., and Mobashery, S., (2005). Bacterial resistance to beta-lactam

Flandrois,J.C., Courco, L., Lemeland, J.F., Ramuc, M., Sirot, J. et Souny, C.J., (1997). Bactériologie médicale. Pesses Universitaire de Lyon. ISBN : 2729705678.

Gerard, I. (2003). Introduction à la microbiologie, pp.608-612.

Ghuysen, J.M. (1991). Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. Annu Rev Microbiol. 45: 37-67.

Gogny, M. (2001). Classification des principes actif. L'arsenal thérapeutique vétérinaire. Edition le point vétérinaire. pp. 165-168.

Gootz, T.D. (1990). Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 3(1): 13-31.

Grace Yim, (2011). L'Attaque des superbactéries: Résistance aux antibiotiques. The Science Creative Quarterly. Issue Six. Lapsus Nivium.

Hanzen C.H., (2014). physio-anatomie et propédeutique de la glande mammaire symptomatologie, étiologie et thérapeutiques. Approches individuelles et de troupeau des mammites. P 96. 143-146. 166-167.

Havarstein, L.S. (1998). Bacterial gene transfer by natural genetic biotransformation. Acta pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica.106, 84-55.

Hermann, T. (2005). Drugs targeting the ribosome. Corrent opinion in microbiolgie. 15, 335-366.

Hirsh, D.C., Maclachlan, N.J., Walker, R.L., (2004). Veterinary microbiology. Second Edition. Blackwell Publishing, Oxford, 536 pp.

Jalalpoor S. Study of the antibiotic resistance pattern among the bacterial isolated from the hospital environment of Azzahra Hospital, Isfahan, Iran. African Journal of Microbiology Research **2011**. 5 (20): 3317-3320

Jaureguy, F. (2009). Host and bacterial determinants of Escherichia coli extra intestinal infections. Med Sci. Paris. 25(3): 221-223.

Jones J.E.T., (1991). Mastitis in sheep. In Breeding for Disease Resistance in Farm Animals Edited by: Owen JB, Axfor RFE. Bangor: Tucson, AZ, CAB International. 412-423.

Jones, J.E.T., Watkins, G.H., (2000). Mastitis and contagious agalactia. In : Martin, W.D., Aitken, I.D. (Eds.), Diseases of Sheep. Blackwell Science, Oxford, pp. 75–80.

Keisler, D.H., Andrews, M.L., Moffatt, R.J., (1992). Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance. J. Anim. Sci. 70, 1677±1681.

Kiossis, E., Brozos, C. N., Petridou, E., Boscos, C., (2007). Program for the control of subclinical mastitis in dairy Chios breed ewes during lactation, Small Ruminant Research, 73, 194–199.

Kirk, J.H., Glenn, J.S., Maas, J.P., (1996). Mastitis in a flock of milking sheep. Small Ruminant Res. 22, 187–191.

Lam M., (1996): Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting, *AJVR*, 1996, **57** (1): p 39-42

Larouche, G. (2001). Les quinolones : des années soixante à aujourd'hui. Pharmacothérapie théorique. Pharmacothérapie théorique. Pharmactuel.34(2) :40.

Larpent, J.P. (1997) . Mémento technique de microbiologie .3eme Ed. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. 910 pages.

Las Heras, A., Vela, A.I., Fernandez, E., Legaz, E., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F., (2002). Unusual Outbreak of Clinical Mastitis in Dairy Sheep Caused by Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. J Clin Microbiol. 2002. March; 40(3): 1106–1108.

Lavigne, J-P. (2007). Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. MB7 :

Le Minor, L. (1989).*Salmonella.* In Bactériologie médicale (L. Le Minor & M. Véron, édit.).2ed. Flammarion, Paris, pp. 411-425.

Lerondelle, C. (1989). Influence de l'infection par le CAEV sur les numérations cellulaires du lait de chèvre. in Pathologie caprine et production, 2ème colloque international de Niort, 25-28.

Levy, S.B. (1998). The challenge of antibiotic resistance. Scientific American, 278, 32-39.

Leitner, G., Silanikove, N., Merin, U., (2008). Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. Small Ruminant Res. 74, 221–225.

Li X-Z, et Nikaido, H., (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drug ; 64:159-204.

Makan, D . (2007). sensibilite des bacteries pathogenes aux antibiotiques dans le district de bamako en 2006. Thèse. Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie. Université de Bamako.

Mandell, G.L.,(2009). Principales and parctice of infectious diseases. 6eme ed.
Elservier, Churchill Livingstone éditeurs, USA.edition en ligne.http: // www.ppidon-line.com.

Matagne, A., Dubus, A., Galleni, M., and Frere, J.M., (1999). The beta-lactamase cycle: a tale of selective pressure and bacterial ingenuity. *Nat Prod Rep*. 16: 1-19.

Menzies, P.I., Ramanoon, S.Z., (2001). Mastitis of sheep and goats. Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract., 17, 2, 33-58.

Mercier, P., Coutineau, H., Lenfant, D., Decoux, V., (2000). Un épisode d'agalactie causé par Mycoplasma putrefasciens dans un troupeau caprin. Le Point Vétérinaire, 208 (31), 69-72.

Meyer, A., Deïania, J.,Bernard, A., (2004). Résistance aux agents antimicrobiens. In Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2ème ed. Doin. Biosciences et techniques collection dirigée par Fagarella J et Calos A.

Michael., John,M., (2007). Brock : Biologie de Microbiologie.11ed .Paris.1047 p.

Mørk, T., Waage, S., Tollersrud, T., Kvitle, B., Sviland, S., (2007). Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. ActaVet Scand 49:23–31.

Moule, G.R., (1954). Observations on mortality amongst lambs in Queensland. Aust. Vet. J. 30, 153–171.

Narayan, O., Zinc, M.C., Correll, M., Crane, S., Huso, D., Jolly, P., Saltarelli, M., Adams,R.J., Clements, J.E., (1993). The lentiviruses of sheep and goat. In: the retroviridae, edited by JA Levy. Plenum Press: New York. 229-255.

Ndiaye, A. (2005). Les enterobacteries secretrices de beta-lactamase a spectre

elargi.Thése.Faculté de medecine, de pharmacie et Dodont-Stomatologie. Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Nilius, A.M., et Ma, Z., (2002). Ketolides: the future of microlides? Current Opinion in pharmacology. 2 : 1-8.

Ogawara, H. (1981). Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. Microbial. Rev.45(4), 591-619.

Onnasch, H., Healy, A.M., Brophy, P.O., Kinsella, A., Doherty, M.L., (2002). A study of mastitis in sheep. Res Vet Sci, 72:42.

Paape, M.J., Poutrel, B., Contreras, A., Marco, J.C., Capuco, A.V., (2001). Milk somatic cells and lactation in small ruminants. J. Dairy Sci. 84:E237-E244.

Pallasch, T.J. (2003). Antibiotic resistance. Dental Clinics of North America.47, 623-639.

Paul, S. (2005). Bactériologie.6ed.Dunod.Paris. 515 p.

Pekelder, J.J., Veenink, G.J., Akkermans, J.P., van Eldik, P., Elving, L., Houwers, D.J., (1994). Ovine lentivirus induced indurative lymphocytic mastitis and its effect on the growth of lambs. Veterinary Record 134, 348–350.

Ploy, M.C., Gassama, A., Chainier, D., et Denis, F., (2005). Les intégrons en tant que support génétique de résistance aux antibiotiques. Integrons: an antibiotic resistance gene capture
system. Immuno-analyse & Biologie spécialisée. 20: 343-352.

Ploy, M.C., Lambert, T., Gassama, A., et Denis, F., (2000). Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Annales de Biologie Clinique. 58(4), 439-44.

Podschun, R., and Ullmann, U., (1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 11:589-603.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood D.C., y Hinchcliff, K.W., (2002). Medicina Veterinaria; tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9a ed. Vol. 1. McGraw - HiII Interamericana. Madrid. pp. 711 -718.

Remy, (2007); Les mammites, cours de DCEV 3 de l'ENVA, juillet 2007

Rinaldi, M., Li, R.W., Bannerman, D.D., Daniels, K.M., Evock-Clover, C., Silva, M.V.B., Paape, M.J., Van Ryssen, B., Burvenich, C., Capuco, A.V., (2010). « A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response elements define early response to E. coli mastitis ». Functional & Integrative Genomics 10 (1) : 21-38.

Ros, A. (1999). La résistance bactérienne ou le naufrage des antibiotiques. VIIIème assemblée annuelle des CLIN du sud-est. Lyon. 28 octobre.

Rozette,L. (2008). Bulletin de l'alliance pastorale N°783.

Sahly, H., Ancken, H., Benedi, V.J., Forestier, C., Fussing, V., Hansen, D.S, Ofek, I., and Podshun, R., (2004). Impairement of Respiratory Burst in polymorphonuclear Leukocytes by Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Strains of Klebsiella pneumoniae. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23: 20-26.

Sekhsokh, Y., Arsalane, L., El Ouenass, M., Doublali, T., Bajjou, T. et Lahlou Amine, I., (2007). Bactériémie à *Serratia rubidaea*. Médecine et maladies infectieuses; 37 : 287-289.

Serieys.et Seegers (2002) ; L'intervention du vétérinaire face à un problème de

mammites 1- Questions de base et réponses possibles aujourd'hui, Recueil du congrès national de la SNGTV, 2002 : p 139-145

Smith, (2008) ;Mammary gland health and disorders. Large animal internal medicine, 2008, fourth edition: 1112-1119

Soussy, (2007) : Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie. P: 21-46.

Spanu, C., (2009). Somatic cell count control strategies in dairy ewes. Dottorato di Ricerca in Produzione e Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale. Università degli Studi di Sassari.p1-142.

Stone, P.W., Gupta, A., Loughrey, R.N., Della-Latta, P.H., Cimiotti, R.N., Larson, E. Rubenstein, D., and Saiman, L., (2003). Attribuable Coast And Length Of Stay Of An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreak In A Neonatal Intensive Care Unit. 24: 601-606.,

Stratton, C.W. (2000). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Leb Med J; 48:186-198.

Timms, L., (2007). Dynamics and significance of mastitis in sheep. Iowa State University Dairy Specialist. 11p.

Vandiest,P (2012). Les mammites une cause importante de réforme Filière Ovine et Caprine n°40 - 2ième trimestre.

Van der Molen, E.J., Houwers, D.J., (1987). Indurative lymphocytic mastitis in sheep after experimental infection with maedi–visna virus. Veterinary Quarterly 9, 193–202.

Vatn S., (2005). Epidemiology of mastitis in Norwegian sheep. In Proceedings of the 6th International Sheep Veterinary Congress: 17–21 June 2005; Hersonissos Edited by: Fthenakis GC, McKaller FA. 6th International Sheep Veterinary Congress; 2005:318-319.

Watson, D.J., Buswell, J.F., (1984). Modern aspects of sheep mastitis. British Veterinary Journal 140, 529–534.

Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature; 406: 775-81.

Wellenberg, G.J., van der Poel, W.H.M., Van Oirschot, J.T., (2002). « Viral infections and bovine mastitis: a review ». Veterinary Microbiology 88 (1): 27-45.

Wolfgang, M., (1999). The comp locus of *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation. Molecular Microbiology. 31, 1345-1357.

Yamashita, S.K., (2000). Microbiological surveillance and parental antibiotic use in a critical care unit. Can J Infect Dis. 11, 107-111.

Zeba, B.(2005). Overview of β-lactamase incidence on bacterial drug resistance. African journal of biotechnology.4 (13):15591562.

Annexe

Annexe I

Composition des milieux de culture, réactifs et tampons :

- **Les milieux liquides :**

Eau physiologique

Chlorure de sodium 9g

Eau distillée qsp 1000ml

PH. 7

Bouillon tryptophane soja(TSB)

20g /l Peptone

(origine non- animale)

2,5g /l Glucose

5g/l NaCl

2,5g/l K2HPO4

- **Les milieux gélosés :**

Gélose Muller-Hinton

Extrait de viande 2g

Hydrolysat acide de caséine 17.5g

Amidon 1.5g

Agar 10g

Eau distillée qsq 1000ml

pH 7.4.

Stériliser à 121°C pendant 15min.

Gélose nutritive (GN)

Peptone 10g/l

Extrait de viande 3g/l

Extrait de levure 3g/l

Chlorure de sodium 5g/l

Agar 18g/l

pH 7.3

Autoclavage à 115°C pendant 20min.

Gélose de chapman :

11,0 g /l Peptone

1,0 g/l Extrait de viande

75g/l Chlorure de sodiume

10 ,0g/lManitol

0,025g/l Rouge de phénol

15g/l Agar

1L Eau distillé

Gélose Héktoen :

12 g /l Protéose peptone

3g /l Extrait de levure

5g/l Thiosulfate de sodiume

9g/l Sels biliare

1.5g/l Citrate de fer d'ammoniume

2g /l Salicine

12g/l Lactose

12g/l Saccharose

0,1 g /l Fuschine acide

0,065g/l Bleu de bromothymol

14g/l Agar

1L Eau distillé

- **Solution et Tampon**

Cristal violet

Solution A

Cristal violet 2g

Alcool à 95o 20ml

Solution B

Oxalate de NH4 0.8g

Eau distillée qsp 20ml

Mélanger les solutions A et B.

Lugol :

Iode 1g

Iodure de potassium 2g

Eau distillée 300ml.

Fuschine

Fuschine basique 1g

Alcool éthylique à 90o 10ml

Phénol 5g

Eau distillée qsp 100ml

La solution est diluée au 1/15.

VP1 :

Hydroxyde de potassium 40g

H2O 100ml

VP2 :

α-naphtol 6g

Ethanol 100ml

Annexe II :

1/ Coloration de Gram

1-Déposer une goutte d'eau physiologie stérile sur une lame bien propre.

2-Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène.

3-Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.

4-Laver l'excès du colorant avec de l'eau distillée.

5-Couvrir de lugol pendant 60 secondes.

6-Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

7-Rincer immédiatement le frottis avec le mélange alcool-acétone 30 secondes.

8-Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

9-Couvrir avec de la fuschine pendant 60 secondes.

10-Laver à l'eau distillée pendant 10 secondes.

11-Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à un fort grossissement. Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.

2/ Teste Oxydase

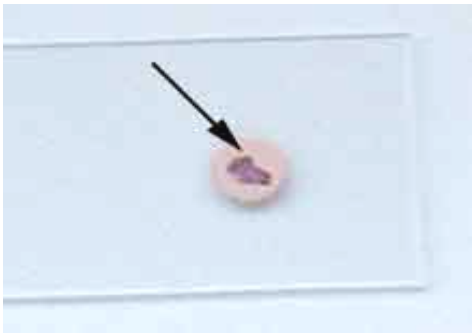
- UTILISATION:

A l'aide de pinces placer un disque d'oxydase sur une lame porte objet. Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraiche à tester. Prélever la colonie choisie à l'aide d'un bâtonnet ou d'une öse. Ne pas utiliser d'öse de métal (à l'exception du platine) cela peut provoquer des réactions faussement positives. Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration violette dans un délai de 30 secondes.

❖ LECTURE :

✓ Réaction positive : coloration bleu foncé à violet apparaissant dans un délai de 30 secondes.

✓ Réaction négative : absence de coloration ou coloration au-delà de 30 secondes.



Annexe III :

1/ Préparation de la galerie API 20E:

* Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 mL d'eau dans les alvéoles (avec pipette graduée et pipeteur) pour créer une atmosphère humide.

* Inscrire les références de la souche bactérienne sur la languette latérale de la boîte (+ date et initiales de l'opérateur).

* Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.

2/Préparation de l'inoculum :

* Ouvrir une ampoule de « Suspension Medium » ou introduire quelques mL d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile.

* Avec la pipette Pasteur, prélever **une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé**.

* Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu

3/ Inoculation de la galerie API 20 E :

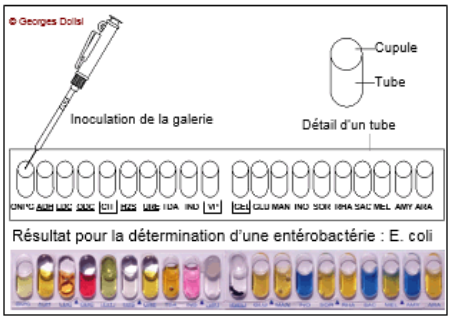
Avec la suspension bactérienne et la pipette ayant servi au prélèvement, **remplir tubes et cupules** des tests

CTI	GEL	VP

* Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.

* Créer une anaérobiose dans les tests **ADH**, **LCD**, **ODC**, **URE**, **H_2S** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

* Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 35 - 37° C pendant 18 à 24 heures.



Lecture de la galerie miniaturisée Api20E :

Tests	**Substrats**	**Caractère recherché**	**Résultat**	
			Négatif	Positif
ONPG	Orthonitrophenylgalactosidae	Beta-galactosidase	Incolore	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge /Orangé
LDC	L-lysine	Lysine Décarboxylase	Jaune	Orangé
ODC	L-ornitine	Otnithine Décarboxylase	Jaune	Rouge /orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert Pale /Jaune	Bleu-vert /vert
H2S	Thiosulfate de Sodium	Praduction d'H2S	Incolore/grisatre	Dépôt noir/fin lisere
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/Orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/immédiat	
				Jaune
IND	L-tryptophane	Production d'indole	James/2mn	
			Jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de Sodium	Production d'acétoine	VP 1+VP 2/10mn	
			Incolore	Rose-rouge
GEL	Gélatine	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
MAN	D-mannitol	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
INO	Inositol	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune

RHA	L-rhamnose	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /Oxydation	Bleu /bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /Oxydation	NIT 1+NIT 2/2-3mn	
			Jaune	Rouge
Nitrate réductase Tube GLU	Potassium nitrate	Production de NO2 Réduction au stade N2	Zinc / 5mn	
			Rouge /orangé	Jaune

Caractères biochimiques et culturaux d'*Escherichia coli.*





Gélose Hékteon : Colonies lisses à bords réguliers de 2 à 3 mm de diamètre



Profil biochimique d'*E. coli* sur galerie API 20

Annexe IV

Table de lecture : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition d'antibiotique pour Entérobactérie. Groupe viridans (En médecine vétérinaire) http://www.sante.dz/aarn

Antibiotiques Testes	**L'abréviation**	**Charge du Disque µg**	**Diamètres critiques (mm)**		
			R	I	S
Amoxiciline Clavulanique Acid	AMC	30	≤13	14-17	≥18
Ampicilline	AMP	10	≤13	14-16	≥17
Cefalothin	CEF	30	≤14	15-17	≥18
Colistine	COL	10	≤10	-	≥11
Ofloxacine	OFX	5	≤19	20-21	≥22
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	SXT	25	≤10	11-15	≥16
Kanamycin	KMN	30	≤13	14-17	≥18
Gentamicin	GMN	10	≤12	13-14	≥15
Céfotaxime	CTX		≤13	14-17	≥18
Chloramphénicol	CHL	30	≤12	13-17	≥18

Annexe V :

Questionnaire méthodes d'élevage

Les prélèvements :

- **Numéro du prélèvement**
- **Date du prélèvement**
- **Zone du prélèvement**

La brebis :

- **La race**
- **L'âge**
- **Numéro de lactation**
- **Stade de lactation : En début de lactation** ☐
  En pic de lactation ☐
  En fin de lactation ☐
  Après tarissement ☐

Les conditions d'élevages :

- **Stabulation : libre** ☐
  Entravée ☐
- **Etat de propreté : Bon** ☐
  Moyen ☐
  Mauvais ☐
- **Nature de sol : Sec** ☐
  Humide ☐
  Boueux ☐

Mammite :

- Symptômes d'appel :

  Animal triste, prostré ? Oui ☐ Non ☐

  Observation de la mamelle ? Oui ☐ Non ☐

  Palpation de la mamelle ? Oui ☐ Non ☐

  Observation des premiers jets ? Oui ☐ Non ☐

- Les signes cliniques **:**

Fièvre : Oui ☐ Non ☐

Dégradation de l'état général : Oui ☐ Non ☐

Baisse de l'appétit ou anorexie : Oui ☐ Non ☐

Déshydratation de l'animal : Oui ☐ Non ☐

Signe toxémie : Oui ☐ Non ☐

- Etat de mamelle :

Gonflée : Oui ☐ Non ☐

Douloureuse : Oui ☐ Non ☐

Rougeâtre : Oui ☐ Non ☐

Dure : Oui ☐ Non ☐

Chaude : Oui ☐ Non ☐

Nécrosée : Oui ☐ Non ☐

- Aspect du lait :

Aspect normal : Oui ☐ Non ☐

Présence des grumeaux : Oui ☐ Non ☐

Purulent : Oui ☐ Non ☐

Aqueux : Oui ☐ Non ☐

Sang : Oui ☐ Non ☐