

République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement
Supérieur et la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Sciences Vétérinaires
Option : Immunologie animale

Thème :

L'immunité locale de la mamelle lors de mammites
chez les bovins

Présenté par : LAMARI Imane

Les membres du jury :

Président : Dr.Chahed Amina (MCA-ENSV d'Alger)

Promoteur : Pr.Khelef Djamel (Professeur-ENSV d'Alger)

Examineurs : Pr.Ait Oudhia Khatima (Professeur-ENSV d'Alger)

Dr.Bouzid Riad (MCA-ISV Blida)

Année Universitaire : 2017/2018

Dédicaces

Au nom de dieu le tout puissant le très miséricordieux, je dédie ce travail à :

Mes chers parents, sans qui, je ne serais jamais arriver là ou je suis aujourd'hui. Mes parents, qui me chérissent à ce jour comme si que je n'avais encore que 5 ans; Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude et de mon amour les plus profonds

Mes chers Karima et Sidali, qui participent à chaque projet dans ma vie jusqu'à ce jour sans aucune lassitude et qui me bercent dans leur amour et compréhension ; Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma gratitude et de mon amour les plus profonds

Mon mari, qui participe à chaque parcelle de ma vie la plus profonde ; Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de mon amour les plus profonds

Mes grands parents et mes deux tantes, vous êtes ma famille la plus chère, je vous aime !

Mes cousins et leurs femmes respectives, qui ont toujours été et qui seront à tout jamais mes frères et sœurs bien aimés, Je vous aime !

À mon petit Anes, pour tous les sourires que tu affiches en permanence, je t'aime !

Mes beaux-parents, qui se soucient toujours de mon bien-être et de l'avancement de ma carrière entre autre ce mémoire ; Merci pour tout !

Ma famille toute entière, merci d'exister !

Mes chers amis, merci pour les moments inoubliables que nous avons passés et que nous passons encore ensemble.

À tous ceux qui m'ont aidés de loin ou de près

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné force et courage pour finaliser mon travail.

Mes remerciements les plus sincères vont au **Pr. Khelef Djamel** mon encadreur, pour son aide, sa disponibilité et ses conseils ; Il m'a guidé et permis d'achever mon mémoire.

A la présidente du jury et à ses membres

Dr. Chahed, Pr. Ait Oudhia et Dr Bouzid

Merci de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail en participant au jury de mon mémoire.

Je remercie également Dr Rerdouane Mohamed Abdelhak et Dr Abdennebi Isma pour leur aide et participation dans ce projet.

Je tiens également à remercier tous mes enseignants, plus spécialement Pr. Aïn Baaziz Hacina, Pr. Ait Oudhia Khatima, Dr. Azzag Naouelle, Dr. Ghalmi Farida, Dr. Tennah Safia, Pr. Hamdi Taha Mossadak et Dr. Goucem, pour leur bonne humeur, leur disponibilité et leurs conseils.

Je remercie vivement Dr. Saidi Radhwane et Dr. Messai Chafik pour leur disponibilité et leur aide tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie énormément Hadj-Kouider Djamel pour son aide à la finalisation de ce travail et pour sa patience et disponibilité.

Mes sincères remerciements aux organismes sollicités pour la réalisation de ce travail

Aux personnes qui travaillent à la ferme IBRAHIM à Tipaza

Aux membres du laboratoire de Bactériologie de l'hôpital Zemirli à El Harrach

Mes plus sincères remerciements vont à l'ensemble du personnel de la bibliothèque de l'ENSV en particulier Yacine et Hamid pour leur aide, disponibilité et gentillesse.

Enfin je remercie l'ensemble des travailleurs de l'ENSV en particulier Saadi Ahmed Rachid pour sa bienveillance et sa disponibilité.

Résumé

Les mammites bovines représentent un coût économique et sanitaire important dans la production laitière. La prévention et le traitement de cette maladie reposent essentiellement sur l'usage des antibiotiques qui affectent négativement la qualité de lait et dont l'efficacité est limitée. Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité d'un traitement alternatif à base d'un symbiotique dans la lutte et la prévention des mammites subcliniques, et dans l'amélioration de la qualité du lait produit dans un élevage bovin laitier situé à la wilaya de Tipaza.

Le lait de 68 vaches a été collecté et analysé en subissant un Comptage Cellulaire (à l'aide du Delaval Cell Counter®), ainsi qu'une analyse bactériologique; De ce fait, trois prélèvements différents sont réalisés à un mois d'intervalle. Le premier étant fait avant l'administration d'un additif alimentaire (SYMBIOVEBA®) à des vaches laitières en lactation. A partir de là, les vaches sont classés en 2 groupes dans le but d'étudier les deux effets : curatif et préventif du symbiotique. Chaque groupe est divisé en deux lots, un recevant le symbiotique et l'autre témoin.

La prévalence de la mammite subclinique dans cet élevage était de 33,82%. L'identification des germes a été effectuée par la méthode classique et n'a concerné que le groupe de vaches atteintes de mammites initialement ; Ça a permis d'isoler 13 germes différents sur les trois prélèvements succincts. Nous avons constaté une prédominance de Staphylocoques avec une fréquence de 45% et les Entérobactéries 40%. Ces taux ont connu une baisse considérable chez les 2 lots, sauf qu'elle est plus importante chez les vaches traitées : 100% de guérison pour les Staphylocoques et les Entérobactéries; Cependant le nombre de Stenotrophomonas maltophilia a augmenté dans les deux lots.

Les concentrations cellulaires somatiques individuelles (CCSI) réalisés aux trois prélèvement et aux deux groupes ont révélées, pour un seuil de guérison S de 200.000Cl/mL, un taux de guérison de 100% pour le lot de vaches sous SYMBIOVEBA® contre 62,5% pour le lot témoin ; L'analyse non paramétrique (Mann-Whitney-Wilcoxon) de ces taux de guérison a révélé une différence significative ($p < 0,05$). L'application du test statistique (Mann-Whitney-Wilcoxon) sur les CCSI du groupe de vaches initialement indemnes de mammites subcliniques au dernier prélèvement ne montre pas de différence significative ($p = 0,47$).

Mots-clés : Vache laitière, Mammite subclinique, Analyse bactériologique, CCS, Immunité, Symbiotique, Probiotique.

Summary

Bovine Mastitis represents an economic and health costs in milk production. Prevention and treatment of this disease is based on the use of antibiotics which negatively affect the quality of milk and whose effectiveness is limited. The purpose of this study is to evaluate the effectiveness of alternative treatment with symbiotic in the fight and prevention of Subclinical Mastitis, and in improving the quality of the milk produced in a dairy cattle located in the province of Tipaza.

68 cows milk has been collected and analyzed by undergoing a cell count (using the Delaval Cell Counter®), as well as a bacteriological analysis; For that, three different samples are taken a month apart. The first being done prior to administration of a food additive (SYMBIOVEBA®) in dairy cows in lactation. From there on, cows are classified into 2 groups to study both effects: curative and preventive of the symbiotic. Each group is subdivided into two lots, one receiving the symbiotic and the other witness.

The prevalence of Subclinical Mastitis in this breeding was 33,82%. Identification of germs was performed by the classic method and has concerned the Group of cows with mastitis initially; It allowed to isolate 13 different germs on three successive samples. We found a predominance of staphylococci with a frequency of 45% and 40% for Enterobacteriaceae. These rates have experienced a decline in the two batches, except that it is more important in treated cows: 100% of healing for staphylococci and the Enterobacteriaceae. However the number of *Stenotrophomonas maltophilia* increased in the two batches.

The Cell Somatic Individual Concentrations (CCSI) made to the three samples and to the two groups revealed, for a threshold of healing S of 200.000Cl/mL, a cure rate of 100% for the batch of cows under SYMBIOVEBA® against 62.5% for the batch witness; Nonparametric analysis (Mann-Whitney-Wilcoxon) of these healing rates revealed a significant difference ($p < 0,05$). Application of the statistical test (Mann-Whitney-Wilcoxon) on the CCSI at the last sampling of the Group of cows initially unscathed by Subclinical Mastitis, shows no significant difference ($p = 0,47$).

Keywords: Dairy cow, Subclinical Mastitis, bacteriological analysis, CCS, immunity, symbiotic, probiotic.

ملخص

التهاب الضرع البقري تمثل تكاليف اقتصادية وصحية في إنتاج الحليب. الوقاية والعلاج من هذا المرض يستند إلى استخدام المضادات الحيوية التي تؤثر سلبا على نوعية الحليب كما أن فعاليتها محدودة. والغرض من هذه الدراسة هو تقييم فعالية العلاج البديل في مكافحة والوقاية من "التهاب الضرع تحت الاكلينيكي"، وفي تحسين نوعية الحليب المنتجة من طرف الأبقار الحلوب الواقعة في مقاطعة تيبازة

حليب 68 بقرة تم تجميعه و تحليله بواسطة حساب عدد الخلايا فضلا عن إجراء تحليل البكتريولوجية. كنتيجة لذلك، تؤخذ ثلاث عينات مختلفة بفواصل شهر. الأول جرى القيام به قبل إقامة المكمل الغذائي في الأبقار الحلوب. من هناك، تصنف الأبقار إلى مجموعتين لدراسة الآثار على حد سواء: العلاجية والوقائية للمكمل الغذائي. وتنقسم كل مجموعة إلى دفتين، أحدهما تتلقى المكمل الغذائي و الثاني شاهد.

انتشار "التهاب الضرع تحت الاكلينيكي" في دراستنا هذه كان 33,82 في المائة. تحديد الجراثيم أدي بالطريقة الكلاسيكية وتعني مجموعة الأبقار بالتهاب الضرع في البداية؛ سمح بعزل 13 جراثيم مختلفة على العينات المتتالية. وجدنا فيها انتشار الستافلوكوكسي بنسبة 45% و 40% انتيروباكتيرياسي. وهذه المعدلات قد شهدت انخفاضا في الدفتين، إلا أنها أهم في الأبقار المعالجة: 100% شفاء للستافيلوكوكسي وللانثيروباكتيرياسي، ومع ذلك ارتفع عدد ستينوتروفوموناس مالتوفيليا في الدفتين

التركيزات الخلوية الفردية للعينات الثلاث وللفرقتين كشفت، لحد أدنى للشفاء ب200.000 خلية في الملييلتر، نسبة شفاء 100% لدفعة الأبقار تحت المكمل الغذائي ضد 62.5% لمجموعة الشاهد؛ تطبيق تحليل العامل غير المتغير في التجربة (مان-ويتني-ويلكوكسون) لنسبة الشفاء هذه كشفت اختلاف نوعي ($F < 0.05$). تطبيق الاختبار الاحصائي (مان-ويتني-ويلكوكسون) على التركيزات الخلوية الفردية في آخر عينة لمجموعة الأبقار السالمة من "التهاب الضرع تحت الاكلينيكي"، لا يظهر فرقا نوعيا كبيرا ($F = 0.47$)

الكلمات الرئيسية: ألبان البقر، التهاب الضرع تحت الاكلينيكي، تحليل البكتريولوجية، التركيزات الخلوية الفردية، الحصانة، المكملات الغذائية، الكائنات الحية المجهرية

Liste des abréviations

| | |
|----------------|-------------------------------------------------|
| AC | Anticorps |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AI | Anti-Inflammatoires |
| AINS | Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens |
| AIS | Anti-Inflammatoires Stéroïdiens |
| AMM | Autorisation de Mise sur le Marché |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| BL | Bactéries Lactiques |
| CCS | Concentration Cellulaire Somatique |
| CCSI | Concentration Cellulaire Somatique Individuelle |
| CCST | Concentration Cellulaire Somatique de Tank |
| Cls/mL | Cellules/millilitre |
| CMH | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CMT | California Mastitis Test |
| DCC | Delaval Cell Counter |
| DMSCC | Direct Microscopic Somatic Cell Count |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ENSV | Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire |
| Gram - | Bactérie à coloration de Gram négative |

| | |
|------------------|----------------------------------------|
| <i>Gram +</i> | Bactérie à coloration de Gram positive |
| IC | Intervalle de Confiance |
| Ig | Immunoglobuline |
| IgA | Immunoglobuline de type A |
| IgE | Immunoglobuline de type E |
| IgG | Immunoglobuline de type G |
| IL | Interleukine |
| PAMPs | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SCC | Somatic Cell Count |
| SNC | Staphylocoque à coagulase négative |
| SCP | Staphylocoque à coagulase positive |
| <i>S. uberis</i> | <i>Streptococcus uberis</i> |
| Th | T helper |
| TLR | Toll Like Receptor |
| TNF α | Facteur de Nécrose Tumoral α |
| % | Pourcentage |

Liste des Tableaux

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Tableau 1</i> : Les Toll-Like Receptors et leurs ligands..... | 6 |
| <i>Tableau 2</i> : Effets des cytokines sur les réponses inflammatoire et immunitaire de la glande mammaire bovine..... | 9 |
| <i>Tableau 3</i> : Types cellulaires rencontrés dans la glande mammaire saine et infectée | 11 |
| <i>Tableau 4</i> : Les immunoglobulines dans le colostrum et le lait du bovin et l'humain..... | 13 |
| <i>Tableau 5</i> : Cellules somatiques du lait, leur origine, rôle et proportions physiologiques..... | 22 |
| <i>Tableau 6</i> : Types cellulaires rencontrés dans la glande mammaire saine et infectée..... | 23 |
| <i>Tableau 7</i> : Comparaison des avantages et inconvénients relatifs aux principales méthodes de quantification du SCC directes et indirectes..... | 24 |
| <i>Tableau 8</i> : Traitement antibiotique des mammites cliniques sans signes généraux en première intention..... | 30 |
| <i>Tableau 9</i> : Exemples d'études reflétant l'impact des bactéries lactiques sur la santé des animaux..... | 34 |
| <i>Tableau 10</i> : Critères d'évaluation de guérison des mamelles..... | 42 |
| <i>Tableau 11</i> : Distribution du symbiotique (SYMBIOVEBA®) sur les quatre lots de vaches en lactation..... | 44 |
| <i>Tableau 12</i> : Evaluation de la qualité du prélèvement.... | 46 |

Tableau 13 : Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot A..... 49

Tableau 14 : Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot B..... 50

Tableau 15 : Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J31, au sein du lot A..... 52

Tableau 16 : Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J31, au sein du lot B..... 53

Tableau 17 : Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J64, au sein du lot A..... 54

Tableau 18 : Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J64, au sein du lot B..... 56

Tableau 19 : Résultats des compactages cellulaires des trois prélèvements concernant les deux groupes 1 et 2..... 59

Tableau 20 : Résultats de CCSI du groupe 1..... 60

Tableau 21 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J0 au sein du groupe 1..... 61

Tableau 22 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J31 au sein du groupe 1..... 62

Tableau 23 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J64 au sein du groupe 1..... 63

Tableau 24 : Résultats de CCSI du groupe 2..... 64

Tableau 25 : diagramme des Quartiles des CCSI à J0 au sein du groupe 2..... 65

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Tableau 26</u> : diagramme des Quartiles des CCSI à J31 au sein du groupe 2..... | 66 |
| <u>Tableau 27</u> : diagramme des Quartiles des CCSI à J64 au sein du groupe 2..... | 67 |
| <u>Tableau 28</u> : Tableau des statistiques descriptives du CCS du lot A, au court du temps..... | 68 |
| <u>Tableau 29</u> : Analyse statistique de la variation des CCSI du lot A..... | 68 |
| <u>Tableau 30</u> : Tableau des statistiques descriptives du CCS du lot C, au court du temps..... | 69 |
| <u>Tableau 31</u> : Analyse statistique de la variation des CCSI du lot C..... | 69 |
| <u>Tableau 32</u> : Situation des CCSI du groupe 1 à J64..... | 69 |
| <u>Tableau 33</u> : Analyse statistique de la variation des CCSI à J64 du groupe 1..... | 70 |
| <u>Tableau 34</u> : Situation des CCSI du groupe 2 à J64..... | 70 |
| <u>Tableau 35</u> : Analyse statistique de la variation des CCSI à J64 du groupe 2..... | 70 |
| <u>Tableau 36</u> : Répartition de guérison à l'échelle de l'animal.... | 71 |

Tableau 37 : Analyse statistique du taux de guérison bactériologique à J64, au sein du groupe 1..... 71

Tableau 38 : sensibilité et spécificité pour trois valeurs seuils possible..... 73

Liste des Figures

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Figure 1</u> : Conformation générale de la mamelle chez la vache. | 1 |
| <u>Figure 2</u> : Schéma général d'un quartier | 2 |
| <u>Figure 3</u> : Schéma de la glande mammaire saine..... | 2 |
| <u>Figure 4</u> : Réponse immune médiée par les Toll-Like Receptors | 7 |
| <u>Figure 5</u> : Transcytose d'une IgA au travers d'une cellule épithéliale grâce au pIgR | 14 |
| <u>Figure 6</u> : Schéma représentatif du développement d'une mammite dans une mamelle infectée..... | 19 |
| <u>Figure 7</u> : Représentation schématique de l'impact des bactéries lactiques sur les cellules épithéliales de l'hôte..... | 38 |
| <u>Figure 8</u> : Fréquences des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot A..... | 49 |
| <u>Figure 9</u> : Fréquences des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot B..... | 51 |
| <u>Figure 10</u> : Fréquences des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J31, au sein du lot A..... | 52 |
| <u>Figure 11</u> : Fréquences des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J31, au sein du lot B..... | 53 |
| <u>Figure 12</u> : Fréquences des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J64, au sein du lot A..... | 55 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Figure 13</u> : Fréquences des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J64, au sein du lot B..... | 56 |
| <u>Figure 14</u> : Résultat des la première bactériologie des 23 cas analysés..... | 57 |
| <u>Figure 15</u> : Répartition des CCS au sein du groupe 1, à J0..... | 61 |
| <u>Figure 16</u> : Répartition des CCS au sein du groupe 1, à J31..... | 62 |
| <u>Figure 17</u> : Répartition des CCS au sein du groupe 1, à J64..... | 63 |
| <u>Figure 18</u> : Répartition des CCSI au sein du groupe 2, à J0..... | 65 |
| <u>Figure 19</u> : Répartition des CCSI au sein du groupe 2, à J31..... | 66 |
| <u>Figure 20</u> : Répartition des CCSI au sein du groupe 2, à J64..... | 67 |

Sommaire

Dédicaces
Remerciements
Résumé
Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures
Introduction

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DE LA MAMELLE

I.1. Structure anatomique et histologique de la glande mammaire

I.2. Fonctionnement de la mamelle

II. LES DÉFENSES IMMUNITAIRES DE LA GLANDE MAMMAIRE

II.1. Immunité innée

A. Le canal du trayon

B. Les protéines de défenses antimicrobiennes non spécifiques

C. Les mécanismes de la réponse innée mammaire

a) Reconnaissance du pathogène

b) Profil cytokinique

- Cytokines pro-inflammatoires

- Cytokines anti-inflammatoires

- Les chimiokines

c) Les cellules de l'immunité innée

II.2. Immunité acquise

III. LES MAMMITES DE LA VACHE LAITIÈRE

III.1. Définition

III.2. Etiologie

A. Bactéries

a) Bactéries majeures

b) Bactéries mineures

B. Levures, Champignons et Algues

III.3. Description clinique des mammites

A. Les mammites cliniques

a) Mammite suraiguë

b) Mammite subaiguë et aiguë

c) Mammite chronique

B. Les mammites sub-cliniques

III.4. Pathogénie des infections mammaires

A. Pénétration des bactéries dans la mamelle

◇ Au cours de la traite

◇ Par la multiplication des germes présents sur le trayon

◇ Par l'introduction de germes par l'être humain

B. Infection du quartier mammaire

C. Guérison ou persistance de l'infection

III.5. Moyens de diagnostic des mammites

A. Identification directe des modifications cellulaires

- B. Identification indirecte des modifications cellulaires
- C. Identification des modifications métaboliques
- D. Identification des germes
- III.6. Traitement et prévention des mammites
 - A. Prophylaxie médicale
 - a) La vaccination
 - B. Prophylaxie sanitaire
 - a) Hygiène et santé des animaux
 - b) Augmentation du nombre de traites par jour
 - C. Traitement
 - a) Les antibiotiques
 - b) La fluidothérapie
 - c) Les anti-inflammatoires
 - d) Autres thérapeutiques
- IV. LES SYMBIOTIQUES
 - IV.1. Généralités
 - IV.2. Composition
 - A. Les Prébiotiques
 - B. Les Probiotiques
 - IV.3. Propriétés des symbiotiques
 - A. Protection des intestins
 - B. Prévention de l'acidose ruminale
 - C. Amélioration de la Production laitière
 - D. Effets bénéfiques contre les infections bactériennes
 - E. Stimulation du système immunitaire
 - a) Effets bénéfiques de l'activité immunomodulatrice
 - b) Effets bénéfiques sur l'immunité humorale
 - c) Effets bénéfiques contre les infections bactériennes
 - d) Effets bénéfiques sur l'intégrité de l'épithélium

CHAPITRE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

- I. OBJECTIF DE L'ÉTUDE
- II. MATÉRIELS ET MÉTHODES
 - II.1. Présentation de l'élevage
 - II.2. La traite
 - II.3. Méthode d'échantillonnage
 - II.4. Méthodes
 - A. Durée de l'étude
 - B. Définition du cas mammite
 - C. Prélèvement
 - a) Moment du prélèvement
 - b) Réalisation du prélèvement
 - c) Conservation et expédition
 - D. Les comptages cellulaires
 - E. L'addition du symbiotique
 - a) L'additif :
 - b) Ajout de l'additif :
 - F. L'examen bactériologique

- a) Ensemencement et isolement
- b) Identification
- G. Collecte des données et analyses statistiques

III. RÉSULTATS

III.1. Répartition des résultats

III.2. Résultats bactériologiques du groupe 1

A. Bactériologie à J0

- a) Lot A
- b) Lot B

B. Bactériologie à J31

- a) Lot A
- b) Lot B

C. Bactériologie à J64

- a) Lot A
- b) Lot B

D. Estimation de la guérison bactériologique des mamelles

- a) Estimation de la guérison tous germes confondus
- b) Estimation de la guérison pour les germes les plus souvent isolés

III.3. Résultats des comptages cellulaires du lait

A. Groupe 1

- a) Résultats des CCSI à J0
- b) Résultats des CCSI à J31
- c) Résultats des CCSI à J64

B. Groupe 2

- a) Résultats des CCSI à J0
- b) Résultats des CCSI à J31
- c) Résultats des CCSI à J64

III.4. Analyse statistique

A. Suivi des comptages cellulaires dans le temps

- a) Groupe 1
- b) Groupe 2

B. Situation des CCSI à J64 : évaluation de l'effet du symbiotique

- a) Groupe 1
- b) Groupe 2

C. Analyses des taux de guérison bactériologique à J64

IV. DISCUSSION

IV. 1. Méthode d'échantillonnage

- A. Choix de la ferme
- B. Choix des bovins à prélever et effectif

IV.2. Outils diagnostiques et critères d'évaluation

- A. Utilisation des CCSI
- B. Validité des résultats des CCS
- C. Méthode d'ensemencement, d'isolement et d'identification

IV.3. Prévalence des mammites subcliniques

IV.4. Analyse bactériologique

- A. Analyse des résultats bactériologiques à J0
- B. Analyse des résultats bactériologiques à J64

IV.5. Impact sur les comptages cellulaires somatiques

- A. Activité curative
- B. Activité préventive

Conclusion
Références bibliographiques
Annexes

Introduction

Les mammites constituent la première cause de pertes économiques pour les élevages de ruminants laitiers avec une facture qui s'élève à plusieurs millions d'euros par an (Rainard et Gilert, 2010). Le coût s'explique par une baisse de la production de lait (Seegers et al., 2003), des problèmes de transformabilité de la matière première (Le Maréchal et al., 2011), la réforme prématurée des animaux atteints de mammites cliniques ou chroniques (Seegers et al., 2003), les coûts de traitements (produits et frais vétérinaires) (Barkema et al., 2006) et les pénalités financières sur la qualité du lait en fonction du comptage des cellules somatiques (CS), sans compter la surcharge de travail pour l'exploitant. De nombreux problèmes sanitaires peuvent aussi en découler de la moindre qualité de la matière première. En effet, la présence de germes dans le lait suite à la traite d'animaux infectés peut entraîner une contamination tout au long de la filière laitière causant notamment des toxi-infections alimentaires (De Buyser et al., 2005).

Les mammites cliniques posent un problème sérieux dans les élevages laitiers mais leur dépistage visuel est facile, alors que le dépistage des infections mammaires subcliniques nécessite le recours au contrôle du taux cellulaire dans le lait, par des méthodes indirectes et/ou des méthodes directes (CCI, TCT), étant donné qu'un diagnostic visuel ne peut pas refléter la présence de telles infections (M'SADAK et al., 2014)

En parallèle, les attentes des consommateurs vis à vis de leur alimentation changent et leurs questionnements sur la qualité de ce que leur offre l'agriculture actuelle ne cessent de s'accroître, et les productions animales ne sont pas épargnées. On connaît la peur qu'a la population devant le risque de résidus d'antibiotiques dans l'alimentation, ainsi que la forte opposition, qui en découle contre l'usage systématique d'antibiotique en élevage. Or, avec la mise en place de traitement antibiotique au tarissement sur les vaches en production laitière est devenue fréquente, et les mammites sont la première cause d'utilisation d'antibiotiques en élevage laitier. Si ce qui est actuellement une nécessité d'élevage, venait à être mis en avant par les médias, la filière lait devrait probablement faire face à une grave crise de confiance.

Ainsi, pour suivre les attentes des consommateurs, il apparaît nécessaire de réduire le nombre de traitements par vache, ce qui signifie bien sûr, de mieux raisonner les traitements mais surtout de diminuer la prévalence des nouvelles infections. Cependant les mammites sont un problème multifactoriel que l'on ne peut résoudre qu'à condition d'agir sur certains des facteurs de risque présents dans l'élevage. C'est pourquoi, mise à part la mise en œuvre l'identification des mécanismes de propagation de l'infection afin de limiter celle-ci, il devient nécessaire de mettre en place des moyens préventifs tels que des additifs alimentaires améliorant les performances zootechniques de la vache ainsi que sa résistance individuelle aux pathogènes.

Les question que l'on peut se poser aujourd'hui est : un additif alimentaire, plus particulièrement un symbiotique, pourrait il avoir un effet bénéfique sur l'immunité locale de la mamelle d'une vache en lactation ? Son effet serait-il accentué lors de mammite ou plutôt sur une mamelle saine ?

Pour répondre à ces questions, quatre parties seront traitées : une première partie permettra de revenir sur l'anatomie de la mamelle et ses moyens de défenses ainsi que les germes qui la menacent, la deuxième sur les méthodes de diagnostic utilisables à l'échelle du troupeau lors d'un problème de mammites, la troisième abordant les différents types d'additifs alimentaires existant pour la vache en se concentrant sur les symbiotiques, et la quatrième sera constituée d'une étude descriptive et d'une analyse statistique des résultats obtenus par le comptage cellulaire et la bactériologie du lait dans un élevage sis dans la Wilaya de Tipaza.

CHAPITRE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DE LA MAMELLE

I.1. Structure anatomique et histologique de la glande mammaire

La glande mammaire (ou pis) de la vache est lourde et volumineuse. Son poids peut chez la vache adulte être supérieur à 50 kilogrammes. La glande mammaire comporte 4 quartiers indépendants les uns des autres. Ils sont en effet séparés par un ligament médian de fixation et par des ligaments latéraux (profonds et superficiels) de support qui les attachent à la paroi abdominale et au bassin.

Les mamelles sont des glandes cutanées spécialisées dont la fonction est de sécréter du lait. La mamelle de la vache est formée de quatre quartiers qui comportent une partie purement glandulaire (Figure 1). Le parenchyme mammaire est constitué de lobes, eux-mêmes divisés en lobules formés d'acini ou d'alvéoles glandulaires. Chaque alvéole est constituée principalement d'une couche monocellulaire (lactocytes) qui est le lieu de synthèse du lait. Les lactocytes entourent la lumière alvéolaire et reposent sur un fin réseau de cellules myoépithéliales (Sereys, 2002).

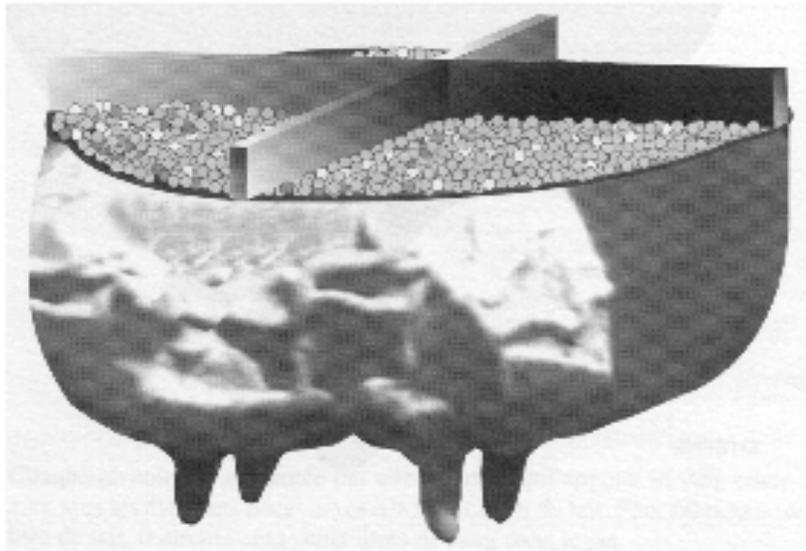


Figure 1 : Conformation générale de la mamelle chez la vache (d'après le cours du Pr. Ch. Hanzen, année 2014-2015)

Sur le bassinnet s'ouvrent de nombreux gros canaux lactifères qui conduisent le lait vers le trayon au fur et à mesure que ces canaux remontent vers le haut de la mamelle, ils se ramifient à la façon des branches et branchettes d'un arbre. Les canaux les plus fins et les canalicules débouchent sur les alvéoles (Monsallier, 1994) (Figure 2 et 3).

Le système lobulo-alvéolaire est englobé dans un tissu, appelé stroma, constitué de fibrocytes, d'adipocytes et de fibres de collagène, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de nerfs.

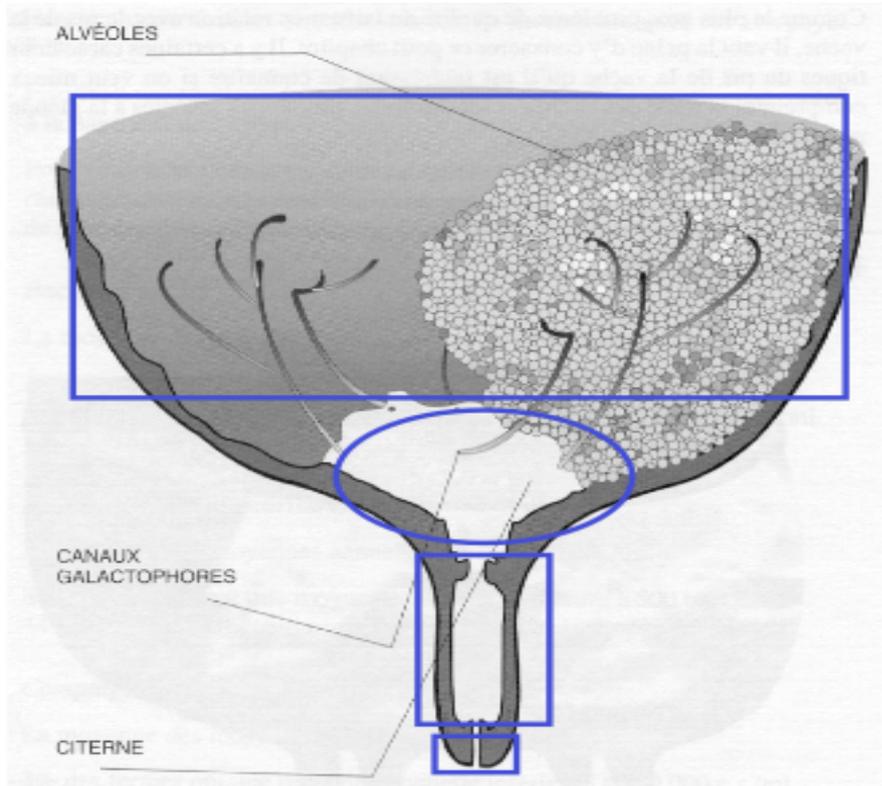


Figure 2 : Schéma général d'un quartier (d'après le cours du Pr. Ch. Hanzen, année 2014-2015)

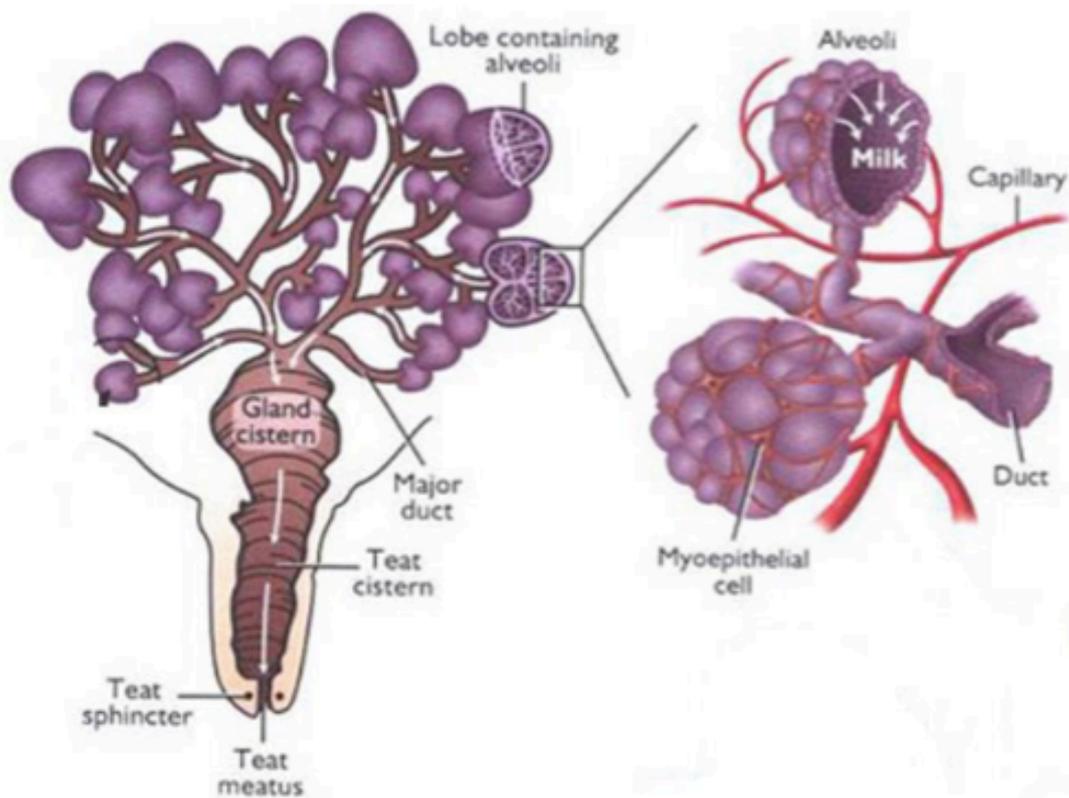


Figure 3 : Schéma de la glande mammaire saine (Gayrard, 2000)

La masse glandulaire épithéliale est une structure transitoire, elle ne se forme qu'au cours de la gestation, elle produit le lait pendant la lactation et elle disparaît après le sevrage ou le tarissement.

I.2. Fonctionnement de la mamelle

La mamelle de la vache laitière forte productrice de lait est un organe pourvu d'une forte vascularisation, puisque ce système de vaisseaux apporte les éléments nécessaires à la formation du lait par les lactocytes.

Les alvéoles mammaires sont de petites usines de lait. Elles travaillent jour et nuit. Elles prennent les éléments nutritifs nécessaires (glucose, acides aminés, acides gras, eau et sels minéraux) du sang pour les transformer en lait qui se collecte à l'intérieur de la lumière alvéolaire (Coullioud P., 1991). Au moment de la traite, les cellules myoépithéliales stimulées par l'ocytocine se contractent pour expulser le lait de la lumière alvéolaire à travers le canal alvéolaire vers les canaux galactophores puis vers le sinus lactifère (Lee C.S., 1980)

II. LES DEFENSES IMMUNITAIRES DE LA GLANDE MAMMAIRE

II.1. Immunité innée

Le mécanisme de la réponse innée de la glande mammaire inclue des barrières physiques comme le sphincter du trayon, des barrières chimiques comme la kératine et la lactoferrine du canal du trayon, et d'avantages de composants propres du système immunitaire comme les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les cellules (NK) Natural Killer (Werling et al., 2006 ; Riollet et al., 2000, cité dans Schukken et al., 2011)

A. Le canal du trayon

Le canal du trayon constitue la première barrière qui s'oppose aux germes microbiens ; Cet effet barrière est lié à trois facteurs :

Le sphincter est constitué par un muscle circulaire élastique forme l'orifice du trayon et empêche toute contamination

Les replis internes constituent la surface interne du canal du trayon qui jouent un rôle mécanique en ralentissant la progression des micro-organismes

La kératine est une substance constituée par une couche de lipides, d'acides et de protéines qui couvre les parois du canal du trayon. Elle a une activité antibactérienne. Car les bactéries qui pénètrent dans le canal du trayon sont adsorbées par la kératine. Pendant la traite, ces bactéries sont éliminées avec la desquamation superficielle de la kératine

B. Les protéines de défenses antimicrobiennes non spécifiques

- La lactoferrine : est une protéine sécrétée par les cellules épithéliales et les polynucléaires neutrophiles mammaires. Cette protéine apparaît en concentration élevée (10 à 80 µg/ml) lors de la période sèche (tarissement) et au cours de la phase aiguë d'une mammite sévère (Barnouin and Chassagne, 1998).

Cette protéine est capable de fixer le fer en présence d'ion bicarbonate, réaction inhibée dans le lait par le citrate (Rainard and Riollot, 2006). Cette protéine jouerait alors un rôle contre les bactéries ayant des besoins élevés en fer comme les colibacilles.

- La lactoperoxydase -Thiocyanate d'hydrogène : ce système paraît être responsable du retard de croissance de certaines souches de streptocoques telles que *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus uberis* (Barnouin and Chassagne, 1998).

- Le lysozyme présent dans le lait est une protéine qui intervient dans la défense de la glande mammaire. C'est une protéine bactéricide qui clive le Peptidoglycane de la paroi des bactéries Gram négatif et des bactéries Gram positif (Rainard and Riollot, 2006).

- Le complément est présent dans le lait d'une glande mammaire saine à un taux bas mais significatif. Si le rôle du complément dans l'initiation de l'inflammation reste incertain, le complément paraît contribuer à la défense de la glande mammaire, quand l'augmentation de la perméabilité vasculaire et épithéliale permet aux composants du complément de gagner le compartiment tissulaire et le lait où il pourra être activé par le contact avec la bactérie et le leucocyte (Rainard and Riollot, 2006)

C. Les mécanismes de la réponse innée mammaire

Les germes pathogènes qui parviennent tout de même à traverser l'extrémité du trayon doivent alors affronter les défenses antibactériennes présentes dans les sécrétions lactées, si ils veulent s'établir dans la glande mammaire. Dans les tissus affectés, la réponse inflammatoire, composante de la réponse précoce de l'immunité innée, va permettre l'augmentation de la perméabilité vasculaire et du flux sanguin. Il en résulte un afflux de cellules et de facteurs solubles indispensables au bon fonctionnement des défenses mammaires. Les propriétés des leucocytes résidents et nouvellement recrutés vont alors jouer un rôle crucial dans l'établissement potentiel de l'infection intra-mammaire (BOUTET P., 2006).

a) Reconnaissance du pathogène

Apercevoir la présence d'un pathogène est la première étape obligatoire de la réponse immune contre les pathogènes invasifs (Schukken et al., 2011).

Le contact entre une bactérie entrant dans la glande mammaire avec les cellules somatiques du lait et avec le revêtement de cellules épithéliales résulte en l'induction du système immunitaire innée à travers l'activation transcriptionnelle des gènes clés de la réponse (Wellnitz and Bruckmaier, 2012).

Le système innée va reconnaître à travers des récepteurs, dits : Pattern Recognition Receptors « PRR », solubles ou présents à la surface des monocytes/macrophages, des neutrophiles, des cellules dendritiques, des polynucléaires, des mastocytes, des cellules Natural Killer et des cellules épithéliales, des motifs moléculaires associés aux pathogènes, dits : Pathogen Associated Molecular Patterns « PAMP ».

Ce système non spécifique de reconnaissance inclus un nombre restreint de récepteurs comparé à la diversité des pathogènes et de leurs motifs moléculaires. Cependant, ces PAMP sont :

- Produits uniquement par les microorganismes et permettent ainsi la distinction entre le soi et le non soi.
- Très conservés et communs aux diverses espèces de microorganismes, ce qui permet au nombre limité de PRR de détecter la présence d'un grand nombre de microbes.
- Et constituent une molécule essentielle pour la survie des microorganismes.

Les 13 différents TLR ou Toll-Like Receptors des mammifères représentent la famille la plus décrite parmi ces PRR (Akira et al., 2006 ; Akira et Takeda, 2004 ; Ozinsky et al., 2000 ; cité dans Schukken et al., 2011).

Certains de ces récepteurs sont transmembranaires et lient les ligands bactériens par leur domaine extracellulaire (Schukken et al., 2011).

Ci-dessous, un tableau des différents TLR identifiés et répertoriés jusqu'à maintenant, ainsi que les différents motifs de pathogènes reconnus par ces derniers (Tableau 1).

Tableau 1 : Les Toll-Like Receptors et leurs ligands (Schukken et al., 2011).

| Receptor | Ligand | Ligand location | Reference |
|------------|-------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| TLR1 | Triacyl lipopeptides | Bacteria and mycobacteria | Takeuchi et al. (2002) |
| | Soluble factors | <i>Neisseria meningitidis</i> | Wyllie et al. (2000) |
| TLR2 | Lipoproteins/lipopeptides | Different bacterial pathogens | Aliprantis et al. (1999) |
| | Peptidoglycan | Gram-positive bacteria | Takeuchi et al. (1999), Schwandner et al. (1999) |
| | Lipoteichoic acid | Gram-positive bacteria | Schwandner et al. (1999) |
| | Lipoarabinomannan | Mycobacteria | Means et al. (1999) |
| | Phenol-soluble modulín | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Hajjar et al. (2001) |
| | Glycoinositol phospholipids | <i>Trypanosoma cruzi</i> | Coelho et al. (2002) |
| | Glycolipids | <i>Treponema maltophilum</i> | Opitz et al. (2001) |
| | Porines | <i>Neisseria</i> | Massari et al. (2002) |
| | Atypic lipopolysaccharides | <i>Leptospira interrogans</i> | Werts et al. (2001) |
| | Atypic lipopolysaccharides | <i>Porphyromonas gingivalis</i> | Hirschfeld et al. (2001) |
| | Zymosan | Fungi | Underhill et al. (1999) |
| | Heat-shock protein 70 | Host cells | Asea et al. (2002) |
| TLR3 | Double-stranded RNA, poly I:C | Viruses | Alexopoulou et al. (2001) |
| TLR4 | Lipopolysaccharide | Gram-negative bacteria | Poltorak et al. (1998) |
| | Taxol | Plants | Kawasaki et al. (2000) |
| | Fusion protein | Respiratory syncytial virus | Kurt-Jones et al. (2000) |
| | Envelope protein | Mouse mammary tumour virus | Rassa et al. (2002) |
| | Heat-shock protein 60 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> | Bulut et al. (2002), Ohashi et al. (2000) |
| | Heat-shock protein 70 | Host cells | Vabulas et al. (2002) |
| | Fibronectin | Host cells | Okamura et al. (2001) |
| | Hyaluronic acid | Host cells | Termeer et al. (2002) |
| | Heparan sulfate | Host cells | Johnson et al. (2002) |
| Fibrinogen | Host cells | Smiley et al. (2001) | |
| TLR5 | Flagellin | Bacteria | Hayashi et al. (2001) |
| TLR6 | Diacyl lipopeptides | <i>Mycoplasma</i> | Takeuchi et al. (2001) |
| | Lipoteichoic acid | Gram-positive bacteria | Schwandner et al. (1999) |
| | Zymosan | Fungi | Ozinsky et al. (2000) |
| TLR7 | Imidazoquinoline | Synthetic compound | Hemmi et al. (2002) |
| | Loxoribine | Synthetic compound | Heil et al. (2003) |
| | Bropirimine | Synthetic compound | Heil et al. (2003) |
| | Single-stranded RNA | Viruses | Heil et al. (2004), Diebold et al. (2004) |
| TLR8 | Imidazoquinoline | Synthetic compound | Jurk et al. (2002) |
| | Single-stranded RNA | Viruses | Heil et al. (2004) |
| TLR9 | Unmethylated CpG DNA | Bacteria and virus | Hemmi et al. (2000) |
| TLR10 | Unknown | Unknown | |
| TLR11 | Unknown | Uropathogenic bacteria | Zhang et al. (2004) |
| | | Profilin-like protein from <i>Toxoplasma gondii</i> | Yarovinsky and Sher (2006) |
| TLR12 | Unknown | Unknown | Mishra et al. (2008) |
| TLR13 | Unknown | Unknown | Mishra et al. (2008) |

Adapted from Akira and Takeda (2004).

L'identification de CD14, TLR2 et TLR4 sur la membrane des globules gras du lait, suggère un rôle direct du parenchyme de la glande mammaire dans la détection de pathogènes (Schukken et al., 2011).

La biopsie du parenchyme de la mamelle lors de mammite à *E. coli* montre une augmentation abondante de l'ARNm des gènes de TLR2 et TLR4 (mais pas TLR9) (Goldammer et al., 2004 ; Stelwagen et al., 2009). Ces récepteurs aux pathogènes sont exprimés sur les cellules épithéliales mammaires (MEC) et une infection induit fortement leur expression (Petzl et al., 2008).

Il est maintenant connu que TLR4 reconnaît le LPS des bactéries Gram négatif (par exemple *E. coli*) et des molécules telles que le fibrinogène, les protéines de choc thermique, et des polypeptides (Lembo et al., 2003) ; Tandis que TLR2 est impliqué dans la reconnaissance de LTA et PGN des bactéries Gram positif (par exemple *S. aureus*) (Takeuchi et al., 2000).

Tous les signaux de transduction après activation des TLR sont connus pour activer éventuellement le facteur NF- κ B (Akira et Takeda, 2004, cité dans Schukken et al., 2011).

L'induction de NF- κ B peut se faire via une voie dépendante de MyD88 (Myeloid Differentiation primary-response protein 88), ou indépendante de celle-ci (Figure 3). Ces facteurs NF- κ B peuvent ensuite entrer dans le noyau et se lier à des promoteurs cibles (Schukken et al., 2011).

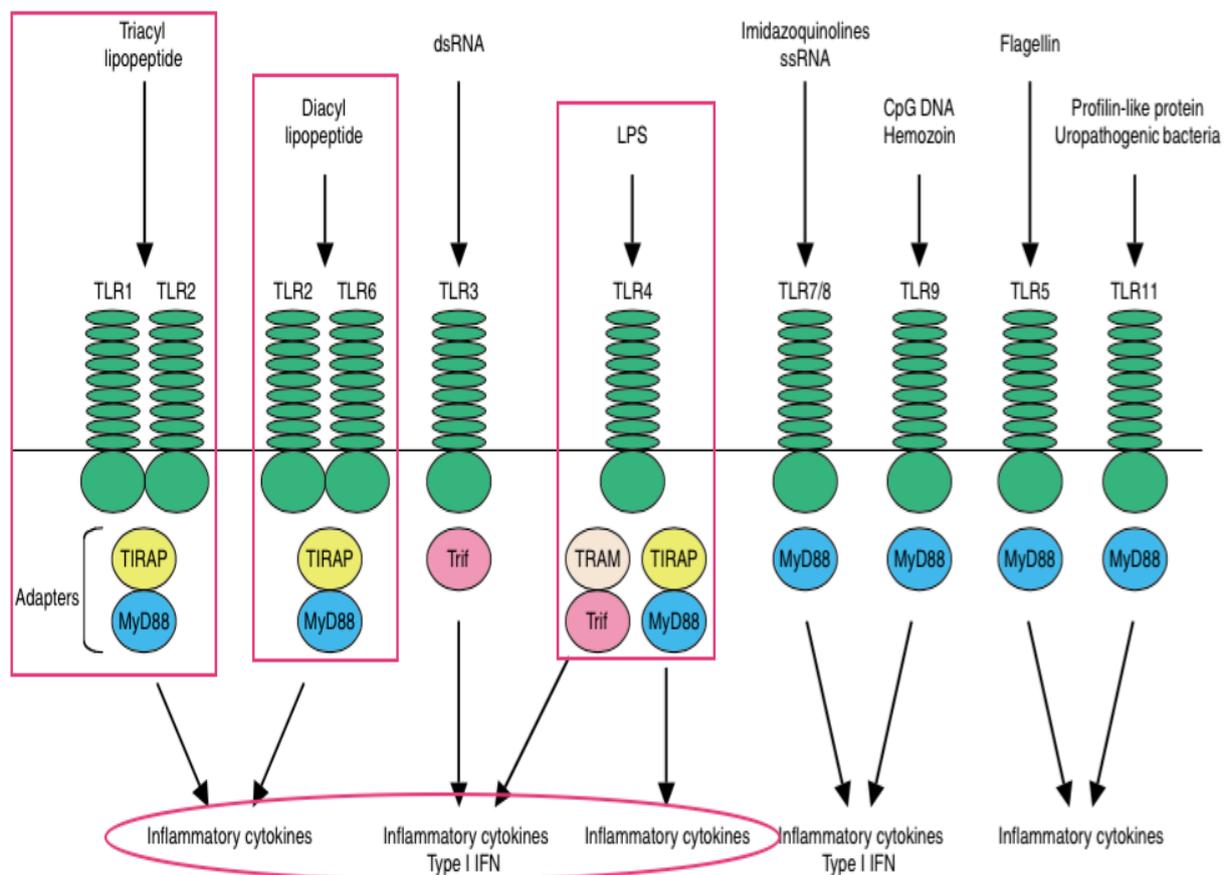


Figure 4 : Réponse immune médiée par les Toll-Like Receptors (Kawai and Akira, 2006) TLR2 en association avec TLR1 ou TLR6 discrimine entre les motifs moléculaires de Triacyl ou Diacyl lipopeptide, respectivement. ; Ces deux associations utilisent MyD88 et TIRAP/MAL comme essentiels adaptateurs. TLR4 reconnaît le Lipopolysaccharide bactérien (LPS), et utilise quatre adaptateurs : MyD88, TIRAP/MAL, Trif et TRAM.

Après la reconnaissance de PAMP par les TLR, une cascade immunitaire innée rapide et complexe est lancée. La clé de ce procédé est la capacité de la MEC et les macrophages présents dans le lait pour déclencher une réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires, tels que le TNF α (Tumor Necrosis Factor), IL-1 β , et l'IL-6, pour recruter des neutrophiles au niveau du parenchyme de la glande mammaire (Oviedo-Boyo et al., 2007, cité dans Stelwagen et al., 2009).

b) Profil Cytokinique

- **Cytokines pro-inflammatoires**

L'expression des cytokines chez les vaches souffrant de mammites a été corrélée à l'activation de NF- κ B. Les effets biologiques induits par le LPS sont principalement médiés par les cytokines TNF α , IL-1 et IL-6, qui sont produits par les phagocytes mononucléaires et connus pour être impliqués dans le choc septique, et par l'IL-8, qui est un agent chimio-attractif pour les PMN et les cytokines d'activation des granulocytes (Schukken et al., 2011)

Le profil exact d'expression de ces composants immunitaires sur-régulés dépend, cependant, de l'agent pathogène causant l'infection, avec des différences claires dans le type de composant immunitaire et le timing de sa régulation entre les différentes espèces bactériennes (Griesbeck-Zilch et al., 2008)

Les cytokines pro-inflammatoires les plus importantes sont le facteur de nécrose tumorale TNF α et l'interleukine IL-1 qui peut être subdivisé en IL-1 cytoplasmique et IL-1 sécrétée. TNF α et IL-1 sont des médiateurs clés des deux réponses immunes, le local et systémique. Ils régulent non seulement l'expression d'un orchestre de gènes de la réponse immunitaire, y compris d'autres cytokines, des enzymes pour la synthèse des eicosanoïdes, et des protéines de phase aiguë, mais aussi des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose. IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire clé qui possède également des propriétés anti-inflammatoires. Les vaches infectées par différentes espèces de pathogènes responsables de mammites répondent avec une forte hausse de l'expression d'ARNm codant pour ces cytokines dans le tissu de la mamelle, ainsi que l'augmentation de l'abondance de cytokines dans le lait (Buitenhuis et al., 2011; Bannerman, 2009; Kauf et al., 2007; Yang et al., 2008; Günther et al., 2010, cité dans Schukken et al., 2011).

Les groupes majeurs de cytokines étudiées comprennent les interleukines (IL), les facteurs stimulateurs de colonies (colony-stimulating factor - CSF), les interférons (IFN) et le TNF (tumor necrosis factor) (Tableau 2) (BOUTET P., 2006).

Tableau 2 : Effets des cytokines sur les réponses inflammatoire et immunitaire de la glande mammaire bovine (BOUTET P., 2006)

| Cytokine | Observation | Référence |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL-1 | Associé à une augmentation de l'afflux de neutrophiles dans les infections à <i>E. coli</i> . Son infusion dans une glande saine augmente le SCC, essentiellement composé de neutrophiles et augmente la température rectale. L'infusion d'IL-1 β dans une glande infectée chroniquement par <i>S. aureus</i> augmente l'afflux de neutrophiles et la production de radicaux oxygénés, sans effet sur la phagocytose. | Riollet <i>et al.</i> , 2000b ; Shuster <i>et al.</i> , 1995 ; 1997 Nickerson <i>et al.</i> , 1993 Daley <i>et al.</i> , 1991 ; 1993 |
| IL-2 | Son infusion dans la glande mammaire augmente le SCC, essentiellement composé de macrophages et de plasmocytes. Son infusion dans une glande infectée par <i>S. aureus</i> augmente le nombre de lymphocytes, neutrophiles, macrophages et le titre en anticorps. Augmente les activités cytotoxiques et bactéricides des lymphocytes. Adjuvant de vaccin efficace. | Nickerson <i>et al.</i> , 1992 ; 1993 ; Torre <i>et al.</i> , 1992 Nickerson <i>et al.</i> , 1989 ; Quiroga <i>et al.</i> , 1993 ; Reddy <i>et al.</i> , 1992 Sordillo <i>et al.</i> , 1991 Pighetti et Sordillo, 1995 |
| IL-6 | Facilite la transition de la réaction inflammatoire d'un afflux de neutrophiles vers celui de monocytes. Participe au développement du choc endotoxinique à <i>E. coli</i> mais est négligeable dans la mammite à <i>S. aureus</i> . | Kaplanski <i>et al.</i> , 2003 Shuster <i>et al.</i> , 1993 ; Riollet <i>et al.</i> , 2001 ; Alluwaimi <i>et al.</i> , 2003 |
| IL-8 | Puissant agent leucotaxique des neutrophiles produit par les macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales. Augmentation de sa concentration lors de mammite à <i>E. coli</i> mais pas de changements significatif dans les infections à <i>S. aureus</i> . Facilite la libération du CD14 soluble à partir du CD14 membranaire. | Matsushima et Oppenheim, 1989 Riollet <i>et al.</i> , 2000b ; 2000c ; Shuster <i>et al.</i> , 1997 ; Alluwaimi <i>et al.</i> , 2001 Lee <i>et al.</i> , 2003 |
| IL-12 | Polarise la réponse immune lymphocytaire vers un phénotype Th-1 ou Th-2 et lie l'immunité innée à l'immunité acquise. Niveau d'expression de l'ARNm augmenté dans une infection expérimentale à <i>S. aureus</i> , mais aucune apparence de polarisation de la réponse immune. | Trinchieri, 1995 Alluwaimi <i>et al.</i> , 2003 ; Riollet <i>et al.</i> , 2001 |
| IFN- γ | Augmente la phagocytose et l'activité bactéricide du neutrophile. Défaut de son activité transcriptionnelle dans la mammite expérimentale à <i>S. aureus</i> mais augmentation de sa concentration dans la mammite à coliformes. Augmente la liaison des IgG, au neutrophile lors de la phagocytose. | Sordillo et Babiuk, 1991 ; Riollet <i>et al.</i> , 2000a Alluwaimi <i>et al.</i> , 2003 ; Hisaeda <i>et al.</i> , 2001 Worku <i>et al.</i> , 1994 |
| TNF- α | Augmente la phase aiguë de la réponse inflammatoire. Augmente la phagocytose et l'activité bactéricide du neutrophile. Augmente l'expression de molécules d'adhésion endothéliale. | Blum <i>et al.</i> , 2000 ; Sordillo et Streicher, 2002 Sordillo et Streicher, 2002 Sordillo et Streicher, 2002 |
| GM-CSF | Augmente les activités chimiotactique et bactéricide du neutrophile. Active la formation de radicaux oxygène par les neutrophiles mais n'a pas d'effet sur leur nombre dans un modèle de mammite à <i>S. aureus</i> . Augmente le nombre et l'activité bactéricide des neutrophiles. Retarde l'apoptose des neutrophiles bovins. | Sordillo <i>et al.</i> , 1992 Daley <i>et al.</i> , 1993 Kehrli <i>et al.</i> , 1991a ; 1991b Boutet <i>et al.</i> , 2004 |

SCC, *somatic cell count* = taux de cellules somatiques du lait

- **Cytokines anti-inflammatoires**

Les cytokines telles que IL-4, IL-10, IL-13, et le facteur de croissance transformant TGF β suppriment la production de cytokines inflammatoires. Ces interleukines proviennent de leucocytes envahissant la mamelle lors de l'infection. Une des interleukines anti-inflammatoires les mieux examinées dans la réponse immunitaire de la mamelle est l'IL-10. Cette interleukine a deux fonctions principales, l'inhibition de la synthèse de cytokines et la réduction des molécules du complexe CMH-II. Cependant, l'IL-10 est également impliqué dans l'absorption des antigènes et la différenciation et la fonction de des lymphocytes T et B (Schukken et al., 2011)

TGF β est une autre cytokine anti-inflammatoire bien connu. Les différents isotypes de TGF β prennent part à de nombreuses activités biologiques communes (Schukken et al., 2011). TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 sont exprimés dans le tissu mammaire (Maier et al., 1991).

Cependant, seulement TGF- β 1 et TGF- β 2 sont retrouvés dans le lait. L'infection mammaire augmente leur expression (Chockalingam et al., 2005; Ginjala and Pakkanen, 1998; Pakkanen, 1998, cité dans Schukken et al., 2011).

Les Interférons forment une famille de cytokines avec une fonction immune modulatrice. En outre, l'IFN γ favorise la différenciation de la voie TH1 et supprime de façon concomitante l'activité des cellules Th2.

- **Les chimiokines**

Les chimiokines sont une classe spécifique de cytokines médiatrices du recrutement de cellules immunitaires effectrices sur le site de l'inflammation. L'examen du transcriptome des MEC après un épisode inflammatoire démontre que ce type de cellule est capable d'exprimer la plupart des chimiokines intervenant lors de la réponse immunitaire dans la mamelle, avec l'exception détectable des protéines inflammatoires des macrophages MIP-1 α (CCL3) et MIP-1 β (CCL4) (Gunther et al., 2009).

c) Les cellules de l'immunité innée

Lorsque les bactéries pénètrent par le sphincter de la mamelle et le canal du trayon, la deuxième ligne de défense est constituée des neutrophiles, des macrophages et des lymphocytes (Oviedo-Boyso et al., 2007).

Le lait contient différents types cellulaires, incluant les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes et un plus faible pourcentage de cellules épithéliales (Lee et al., 1980 ; Sordillo et Nickerson, 1988 ; Östenson et al., 1988, cité dans Boutet et al., 2006)

Selon le statut sain ou infectieux de la glande mammaire, la concentration cellulaire (SCC pour somatic cell count) varie en nombre et en composition (BOUTET P., 2006). Le SCC d'une mamelle saine varie généralement entre 20.000 et 100.000 cellules/ml (Green et al., 2006; Schepers et al., 1997, cité dans Schukken et al., 2011), mais dans les heures qui suivent une infection intramammaire, le SCC augmente jusqu'à plusieurs millions de cellules/ ml de lait (Persson et al., 1992, cité dans Boutet et al, 2006). Les quartiers mammaires dont la numération des cellules est basses ont tendance à répondre moins efficacement pour une infection intramammaire (Wellnitz et al., 2010) et montrent également une incidence plus élevée de mammite clinique (Peeler et al., 2003).

De manière plus globale, le SCC d'une mamelle saine est inférieur à 200.000 cellules/ml, et au delà, c'est un signe d'infection (Tableau 3).

Tableau 3 : Types cellulaires rencontrés dans la glande mammaire saine et infectée (BOUTET P., 2006)

| | SCC (cellules/ml de lait) | Composition cellulaire (%) | | | |
|------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| | | Macrophages | Neutrophiles | Lymphocytes | Cellules épithéliales |
| Quartier sain | < 200.000 | 66-88 ¹ | 0-11 ¹ | 10-27 ¹ | 0-7 ¹ |
| | | 35 ^{2,3} | 26-34 ^{2,3} | 18-24 ^{2,3} | 12-15 ^{2,3} |
| Quartier infecté | > 200.000 | 9-32 ^{1,3} | 50-95 ^{1,3} | 14-24 ¹ | 0-9 ^{1,3} |
| | | | | 1-2 ³ | |

SCC, somatic cell count = taux de cellules somatiques du lait

¹ D'après Lee et al., 1980 ; Concha et al., 1986 ; Miller et al., 1991 ; Riollet et al., 2000

² D'après Miller et al., 1991

³ D'après Boutet et al., 2003

Les monocytes constituent 2 à 7 % des leucocytes sanguins bovins (Jain, 1986, cité dans Boutet et al., 2006). Ces monocytes circulant dans le sang, mûrent dans les tissus pour devenir des macrophages qui sont des cellules vouées à la phagocytose et à la dégradation des pathogènes et des cellules endommagées. Ils jouent également le rôle de cellule présentatrice d'antigène par le biais des molécules de classe II du CMH.

Les macrophages représentent le type cellulaire prédominant dans le lait et les tissus d'une glande mammaire saine, et leurs fonctions primaires sont la phagocytose et la digestion intracellulaire de microorganismes, mais également le retrait des globules gras du lait lors de la période d'involution mammaire (Outteridge et Lee, 1981, cité dans Boutet et al., 2006). Par ailleurs, les macrophages mammaires agissent comme initiateurs de la réponse inflammatoire. Ainsi les macrophages mammaires sont capables de libérer des chimiokines, telles que l'interleukine (IL)-8, des métabolites de l'acide arachidonique, et le platelet-activating factor. Ces facteurs augmentent fortement la réponse inflammatoire locale et, avec des composants du complément comme le facteur C5a, vont attirer les leucocytes au site inflammatoire (Sordillo and Streicher, 2002).

Dans le sang bovin, 15 à 45 % des leucocytes sont des polymorphonucléaires neutrophiles (Jain, 1986, cité dans Boutet et al., 2006). Il existe un apport constant de neutrophiles dans la glande mammaire normalement stérile ; Et par ce fait, les neutrophiles sont normalement retrouvés dans le lait. Par ailleurs, suite à l'initiation de la cascade inflammatoire, les neutrophiles sont les premières cellules à migrer du sang vers le site inflammatoire. Une fois au site infectieux, les neutrophiles phagocytent et tuent les bactéries ingérées grâce à un processus appelé « flambée oxydative ». Après avoir ingérer et tuer la bactérie, les neutrophiles vont mourir selon un phénomène bien régulé, appelé apoptose ou mort cellulaire programmée (BOUTET P., 2006).

Mis à part son rôle dans la reconnaissance du pathogène, l'épithélium mammaire joue aussi un rôle actif dans la défense de l'hôte et synthétise plusieurs facteurs de la réponse immune, comme la Lactoferrine (Sanchez et al., 1992), la β -défensine (Swanson et al., 2004) et la Lipopolysaccharide-Binding Protein (miles, 2004, cité dans Stelwagen et al., 2009). En plus, les préparations de membranes entourant les globules gras du lait secrété par les MEC, qui proviennent de la membrane apicale de la MEC, contiennent de nombreux peptides, protéines et lipides impliqués dans la défense de l'hôte (Sprong et al., 2001). Les composants clés de la

membrane des globules gras du lait, tels que la xanthine oxydase et les sphingolipides, ont une activité antibactérienne contre une variété de bactéries (Hancock et al., 2002).

II.2. Immunité acquise

Elle est menée par l'activité des lymphocytes B et T, qui est spécifique de l'antigène. Au cours de l'infection bactérienne de la glande mammaire bovine, un grand nombre de leucocytes migrent dans le pis, ce qui entraîne la création d'une réponse de l'hôte contre l'agent pathogène. Actuellement, les populations de leucocytes spécifiques médiatrices de cette réponse immunitaire ne sont pas bien définies. Des marqueurs de surface cellulaire sont utilisés pour identifier les populations de cellules spécifiques indiquées dans la réponse immunitaire mammaire (Schukken et al., 2011).

Les lymphocytes T peuvent être classés en lymphocytes T $\alpha\beta$, qui comprennent les lymphocytes CD4 + (lymphocytes T auxiliaires) et les CD8 + (T cytotoxique), ainsi que les cellules T $\gamma\delta$ (Schukken et al., 2011). Dans les sécrétions mammaires, les Lymphocytes représentaient 10-27% des cellules pendant la lactation, mais pas de cellules plasmatiques retrouvées (Lee et al., 1980, cité dans Rainard and Riollet, 2006).

Les concentrations de lymphocytes sont élevées dans les sécrétions de mamelles involuées mais diminuent à un nombre très faible au cours de la semaine précédant le vêlage (McDonald and Anderson, 1981) ou au vêlage (Jensen and Eberhart, 1981). Dans des sécrétions mammaires normales, au moins deux fois plus de lymphocytes T expriment le récepteur $\alpha\beta$ que le récepteur $\gamma\delta$, les CD8+ sont prédominantes, et affichent le phénotype de cellules mémoires (Soltys and Quinn, 1999). Dans les tissus mammaires et les sécrétions lactées saines, le rapport CD4: CD8 est donc < 1 , contrairement au sang où le rapport est > 1 (Park et al., 1992 ; Taylor et al., 1994, cité dans Boutet et al., 2006). Le rapport CD4:CD8 dans les sécrétions mam- maires devient > 1 lors du tarissement, reste > 1 lors de la période sèche et redevient < 1 juste avant le part (Asai et al., 1998, cité dans Boutet et al., 2006).

Il est maintenant clairement établi que les cellules CD8+ peuvent exercer une fonction cytotoxique ou une fonction suppressive (Inoue et al., 1993). Les cellules T cytotoxiques reconnaissent les cellules présentant des peptides d'antigènes étrangers à leurs surfaces par le biais du CMH de classe I, et les cellules T suppressives contrôlent et modulent la réponse immune. Une étude indique que les lymphocytes CD8+ isolés directement après la parturition sont du type suppresseur, alors que ceux isolés en milieu ou en fin de lactation sont plu- tôt du type cytotoxique. La circulation préférentielle des lymphocytes CD8+ suppresseurs dans les tissus et les sécrétions mammaires pourrait être responsable de la moindre capacité de réponse des leucocytes locaux, comparés à ceux provenant de la circulation sanguine (Sordillo et al., 1997, cité dans Boutet et al., 2006). Comme pour les cellules T CD4+, les deux sous-populations de cellules CD8+ expriment différentes cytokines : IL- 4, IL-5 et IL-10 ont été associées au phénotype suppresseur (Inoue et al., 1993), et IFN- γ au phénotype cytotoxique (Shafer-Weaver and Sordillo, 1997). Dans des quartiers atteints d'infection chronique à *S. aureus*, une étude a montré que les lymphocytes T CD8+ étaient recrutés en plus grand nombre que les CD4+ et que l'expression de l'ARNm de l'IL- 10 était augmentée dans les cellules isolées de lait infecté. Ceci suggère que le profil des lymphocytes CD8+ retrouvés dans les quartiers infectés par *S. aureus* est bien de type suppresseur (Riollet et al., 2001).

Les lymphocytes B ont pour rôle primaire de produire des anticorps contre les organismes pathogènes et utilisent leurs récepteurs pour reconnaître des antigènes spécifiques. Ils internalisent, traitent et présentent aux lymphocytes T-helper l'antigène associé au CMH de classe II. Suite à cette présentation, les lymphocytes T sécrètent des cytokines, telles que IL-2, IL-4, IL-6 et IL- 10 (Riollet et al., 2000a, cité dans Boutet et al., 2006), ce qui provoque la

prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, producteurs d'anticorps ou de cellules mémoires (Sordillo et al., 1997, cité dans Boutet et al., 2006). A la différence des lymphocytes T, le pourcentage de lymphocytes B reste constant tout au long de la lactation (Shafer-Weaver et al., 1996, cité dans Boutet et al., 2006) et leur proportion n'augmente pas dans le lait lors d'infection (Riollet et al., 2001).

Le rôle primaire des plasmocytes est de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, qui sont en fait une forme soluble du récepteur du lymphocyte B. Les anticorps sont les principaux composants du système immunitaire acquis présents dans le colostrum et le lait (Stelwagen et al., 2009). Quatre classes d'immunoglobulines (Ig) influencent les défenses de la glande mammaire lors de mammite bactérienne : IgG1, IgG2, IgA et IgM (Sordillo et al., 1997, cité dans Boutet et al., 2006). Contrairement à d'autres espèces, IgG est le type prédominant dans le colostrum et le lait de vache, et non IgA (Kehrli et Harp, 2001, cité dans Boutet et al., 2006).

En revanche, IgA et IgM sont présents à des concentrations beaucoup plus réduites dans le colostrum et le lait bovin (tableau 4). Le pourcentage des différentes classes d'immunoglobulines du colostrum et du lait, est différent entre les espèces; IgA est l'immunoglobuline prédominante dans les sécrétions mammaires humaines (Tableau 4) (Stelwagen et al., 2009).

Tableau 4 : Les immunoglobulines dans le colostrum et le lait du bovin et l'humain (Stelwagen et al., 2009).

| Species | Immunoglobulin | Concentration, mg/mL | | % of total immunoglobulins | |
|---------|------------------|----------------------|------|----------------------------|------|
| | | Colostrum | Milk | Colostrum | Milk |
| Bovine | IgG ₁ | 47.60 | 0.59 | 81.0 | 73.0 |
| | IgG ₂ | 2.90 | 0.02 | 5.0 | 2.5 |
| | IgA | 3.90 | 0.14 | 7.0 | 18.0 |
| | IgM | 4.20 | 0.05 | 7.0 | 6.5 |
| Human | IgG | 0.43 | 0.04 | 2.0 | 3.0 |
| | IgA | 17.35 | 1.00 | 90.0 | 87.0 |
| | IgM | 1.59 | 0.10 | 8.0 | 10.0 |

¹From Butler (1973).

La glande mammaire bovine joue un rôle actif dans la régulation de la concentration des différentes immunoglobulines présentes dans le colostrum et le lait, bien que l'épithélium mammaire lui-même ne synthétise pas d'immunoglobulines (Stelwagen et al., 2009). Tandis qu'une petite quantité des immunoglobulines peut arriver au colostrum et au lait à partir du sérum sanguin par voie paracellulaire à la suite de "fuites" aux jonctions intercellulaires serrées (Lacy-Hulbert et al., 1999, cité dans Stelwagen et al., 2009), la grande majorité des immunoglobulines entre via une voie collective intracellulaire médiée par un récepteur spécifique. Ces immunoglobulines peuvent être dérivées du sang ou produites in situ par les cellules plasmatiques intramammaires. La présence d'un récepteur IgG spécifiques (récepteur Fc néonatal) dans la membrane des cellules épithéliales mammaires, a été rapportée pour plusieurs mammifères et marsupiaux euthériens (Adamski et al., 2000). Récemment, une étude a montré que ce récepteur joue un rôle actif dans le transport des IgG dans la glande mammaire bovine lors de lactation (Mayer et al., 2005). Les IgA trouvés dans le colostrum bovin et dans le lait sont produits par les cellules plasmatiques intramammaires résidentes (Stelwagen et al., 2009). Ce trafic de cellules plasmatiques dans la glande mammaire par le sang, dont le recrutement est médiée par des chimiokines produites localement (Wilson and

Butcher, 2004). La transcytose de l'IgA au travers de la MEC est facilitée par le récepteur d'immunoglobuline polymérique (pIgR) exprimée sur l'épithélium de la muqueuse. Sur le pôle apical de la MEC, pIgR est clivé et l'IgA est libéré dans la lumière alvéolaire avec une partie de pIgR, le composant sécrétoire (Apodaca et al., 1994).

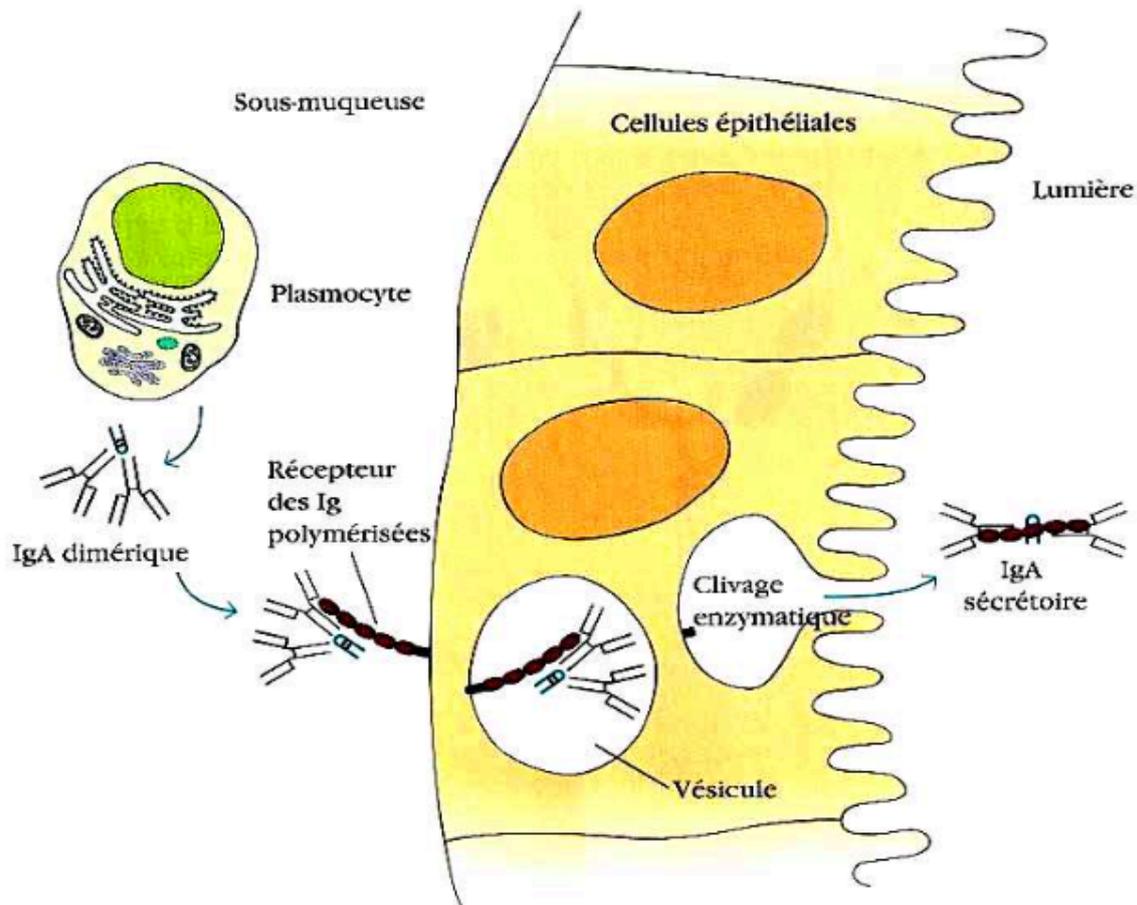


Figure 5 : Transcytose d'une IgA au travers d'une cellule épithéliale grâce au pIgR (schéma à partir du cours du Pr. Henri Jean Boulouis, 2014)

L'expression et la régulation des récepteurs impliqués dans le transport mammaire des IgG et IgA chez les ruminants semblent être réglementés par des changements endocriniens au moment de la parturition (Rincheval-Arnold et al., 2002).

Le polypeptide SC fortement glycosylé est un autre facteur immunitaire présent dans le colostrum et le lait, et qui interagit avec le système immunitaire adaptatif. Composant sécrétoire dérivé d'une partie du récepteur IgA qui, non seulement améliore la fonctionnalité de l'IgA lorsqu'il est fixé à lui (Phalipon et al., 2002), mais peut avoir des propriétés protectrices directes lui-même (Stelwagen et al., 2009).

III. LES MAMMITES DE LA VACHE LAITIÈRE

III.1. Définition

La mammite bovine est une inflammation d'un ou plusieurs quartiers de la mamelle de la vache. Elle est généralement septique et provoquée la plupart du temps par une infection bactérienne. Des mammites aseptiques existent cependant, elles sont rares et provoquées par des traumatismes locaux, des toxiques ou des désordres physiologiques (Rémy 2010) Dans le langage courant, le terme « mammite » désigne donc les infections intra-mammaires bactériennes mais d'autres agents pathogènes peuvent occasionner des infections de la mamelle comme des levures ou des algues (ANGOUJARD, 2015).

Elle apparait sous forme sub-clinique ou clinique et sa gravité (subaiguë, aigue ou chronique) dépend de l'intensité des signes cliniques (PIRARD, 2014).

Dans la suite de ce travail, nous allons surtout nous concentrer sur les mammites sub-cliniques et sur leur fréquence dans un troupeau laitier.

III.2. Etiologie

Mis à part les traumatismes locaux, les toxiques ou les désordres physiologiques qui peuvent rarement provoquer des mammites, la cause principale de ces dernières est d'ordre septique. La contamination a lieu par voie galactogène par le canal du trayon à l'exception des quelques bactéries pouvant pénétrer par voie hématogène (les mycoplasmes, les salmonelles, *Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium paratuberculosis*).

A. Bactéries

La majorité des mammites sont d'origine bactérienne. Il est décrit plus de 200 espèces bactériennes différentes provoquant des mammites chez les bovins dans la littérature scientifique.

Les bactéries sont classées dans les catégories poly- ou mono-clonale suivant le nombre de souches d'une même espèce présente dans l'élevage. Une espèce bactérienne est qualifiée de poly- ou multi-clonale si de nombreuses souches de cette espèce sont présentes au sein d'un même troupeau. A l'inverse, une espèce bactérienne est dite mono-clonale si une seule souche est présente au sein d'un même troupeau (ANGOUJARD, 2015).

a) Bactéries majeures

Les pathogènes majeurs sont les bactéries responsables des mammites cliniques et subcliniques, et sont le plus couramment isolées. Ils regroupent les coques Gram positifs (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*...) et les entérocoques, plus rares (*Enterococcus faecalis*...). Aujourd'hui on constate la prédominance de trois pathogènes majeurs qui sont par ordre décroissant *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (BIDAUD O et al., 2010; BOSQUET et al., 2005; JEAN BARROT DEBREIL, 2008). Dans une étude française sur 618 prélèvements de lait pour analyse bactériologique entre novembre 2005 et juillet 2007, 70 % des isolats appartiennent à seulement quatre espèces bactériennes (dont les *Staphylococcus coagulase négatifs* qui sont des pathogènes mineurs, *Streptococcus uberis*

représentant 25 % des isolats, *Escherichia coli* : 18 % et *Staphylococcus aureus* : 13 % (BIDAUD O et al., 2010). Mais d'autres bactéries peuvent être isolées comme *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, des mycoplasmes et des bactéries anaérobies.

b) Bactéries mineures

Les pathogènes mineurs ne sont normalement qu'exceptionnellement responsables de mammites cliniques mais plutôt responsables d'infections subcliniques. Ce sont surtout les *Staphylococcus* coagulase négatifs (*Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*...) (BEN HASSEN et al., 2003). Longtemps considéré comme pathogènes mineurs comme décrit dans cette classification traditionnelle, ils sont devenus des pathogènes majeurs responsables de mammites cliniques et chroniques (JEAN BARROT DEBREIL, 2008; TAPONEN et al., 2006), avec de fortes inflammations du quartier ainsi que des mammites subcliniques. Ils représentent 14 % des isolats de l'étude précédemment citée, et seraient responsables de 20 % des mammites bovines en France, d'après TAPONEN *et collaborateurs*. Ils sont prédominants dans les isolats réalisés au sein de la clinique vétérinaire de Gavray dans la Manche, de mai 2007 à janvier 2008, représentant 32 % des 118 bactériologies réalisées et 33 % dans l'étude de DUREL *et al.* . Les staphylocoques coagulase négatifs sont des germes de la flore cutanée normale. La source d'infection est en général un défaut d'hygiène au moment de la traite, où ils colonisent le canal du trayon à la faveur d'une blessure. La pathogénie est encore mal connue (DUREL et al., 2003). Ces germes sont en général plus prévalents sur les primipares. La colonisation de la mamelle des primipares s'est réalisée bien avant le vêlage (JEAN BARROT DEBREIL, 2008).

Lors d'infections mammaires, les vétérinaires sont surtout confrontés à quelques espèces bactériennes. Les différentes études de terrain sur l'étiologie des mammites bovines, tous montrent la prédominance des *Staphylococcus* coagulase négatif, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Streptococcus dysgalactiae* et *agalactiae* (JEAN BARROT DEBREIL, 2008)

Mais cette dichotomie entre pathogènes majeurs et pathogènes mineurs tend actuellement à être remise en cause devant la part croissante des isolements de staphylocoques à coagulase négative dans les laits de mammites cliniques (MYLLYS et al., 1994)

B. Levures, Champignons et Algues

Les levures (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*), champignons (*Aspergillus fumigatus*) et algues (*Prototheca zopfii*) responsables de mammites sont des agents pathogènes mineurs. Ils représentaient moins de 2% des isolats (BIDAUD O et al., 2010). Ce sont des agents naturellement présents dans l'environnement, ils sont présents sur les plantes, dans la terre et l'eau. L'humidité est un facteur favorisant leur développement. Les sources de contamination sont souvent des litières humides et/ou moisies, ce qui peut arriver lorsque la paille est stockée à l'extérieur des bâtiments.

Les mammites à levure apparaissent lorsqu'un certain nombre de vaches se couchent dans le couloir en cas de stabulation à logette, ou lors de la traite si les trayons ne sont pas essuyés avant l'application des gobelets-trayeurs (BLOWEY and EDMONDSON, 2010)

Levures et champignons entraînent des mammites cliniques de sévérité moyenne avec des quartiers durs, chauds, œdématiés et la présence de caillots de lait lors des premiers jets. L'hyperthermie présente est particulièrement élevée lors d'infection à levure (*Candida spp*). Une guérison spontanée est observée dans la majorité des cas en 2 à 4 semaines (CRAWSHAW et al., 2005).

Les algues (*Prototheca zopfii*) provoquent des mammites subcliniques ou cliniques aiguës avec une forte augmentation des taux cellulaires et une importante baisse de la production laitière.

Les antibiotiques sont totalement inefficaces sur les levures, les champignons et les algues, leur utilisation est donc inutile voire délétère puisque cela conduit souvent à une persistance et une aggravation de la mammité, aboutissant à la chronicité de celle-ci. A l'arrêt des traitements antibiotiques, une amélioration clinique est même souvent constatée (RÉMY, 2010).

III.3. Description clinique des mammites

A. Les mammites cliniques

Une mammité clinique se caractérise par une modification de la sécrétion de la glande. La quantité et l'aspect du lait changent reflétant une perturbation des fonctions de sécrétion.

En plus de ces symptômes fonctionnels on peut observer les manifestations classiques de l'inflammation : rougeur, chaleur, douleur, et tuméfaction de la glande. On parle alors de mammité aiguë. Si le quartier se sclérose et s'atrophie on parle de mammité chronique. Dans certains cas on observe également des symptômes généraux de type fièvre, abattement, anorexie, etc., liés à l'endotoxémie induite par l'infection. Ce type de mammité est qualifié de suraiguë.

a) Mammité suraiguë

Elle se caractérise par des signes locaux très importants (sécrétion modifiée, souvent d'aspect séreux, hémorragique, ou purulent, voire interrompue par la douleur), d'apparition brutale et d'évolution rapide. L'état général est fortement altéré, et on observe généralement une évolution vers la mort en l'absence de traitement. On distingue deux types de mammites suraiguës : la mammité paraplégique où la vache 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 ; et la mammité gangreneuse où l'inflammation du quartier infecté est très importante et conduit à la nécrose de celui-ci, après apparition d'un sillon disjoncteur. Avant de tomber le quartier apparaît froid et généralement d'aspect bleuté. La sécrétion est généralement rare, nauséabonde, et d'aspect séro-hémorragique. L'évolution conduit à la mort en l'absence de traitement.

b) Mammité subaiguë et aiguë

La sécrétion est modifiée, on observe un lait plus ou moins séreux, avec présence de grumeaux qui caractérisent ce type de mammites. Les symptômes généraux sont absents (mammité subaiguë) à très faibles (mammité aiguë). En l'absence de traitement ce type d'infection évolue généralement à la chronicité.

c) Mammite chronique

Faisant généralement suite à une mammite aiguë, elle se caractérise par des symptômes locaux discrets et une évolution lente vers l'atrophie du quartier infecté. La sécrétion n'est souvent modifiée qu'en début de traite. L'évolution en l'absence de traitement est lente et conduit au tarissement du quartier.

B. Les mammites sub-cliniques

Elle est par définition asymptomatique, la sécrétion est macroscopiquement normale : seul un comptage des cellules somatiques du lait où une bactériologie permet de déterminer la présence ou l'absence d'infection. 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.

Les germes responsables sont essentiellement Gram positifs, mais on peut aussi rencontrer des mammites subcliniques à entérobactéries. Elles peuvent résulter d'une infection primaire ou être secondaires à une mammite aiguë non totalement guérie bactériologiquement. Elles sont beaucoup plus fréquentes que les infections cliniques, plus insidieuses car difficilement détectables (JEAN BARROT DEBREIL, 2008)

La mammite subclinique est caractérisée par l'absence de symptômes visibles. Les mammites subcliniques notamment celles à *Staphylococcus aureus* peuvent évoluer vers une mammite chronique, à savoir, une infection persistante ou latente qui peut resurgir à l'état clinique en fonction du temps et de l'environnement. Chez les bovins, 80 % des infections persistent pendant la lactation en cours, voire pendant le tarissement (Rainard and Poutrel, 1988)

III.4. Pathogénie des infections mammaires

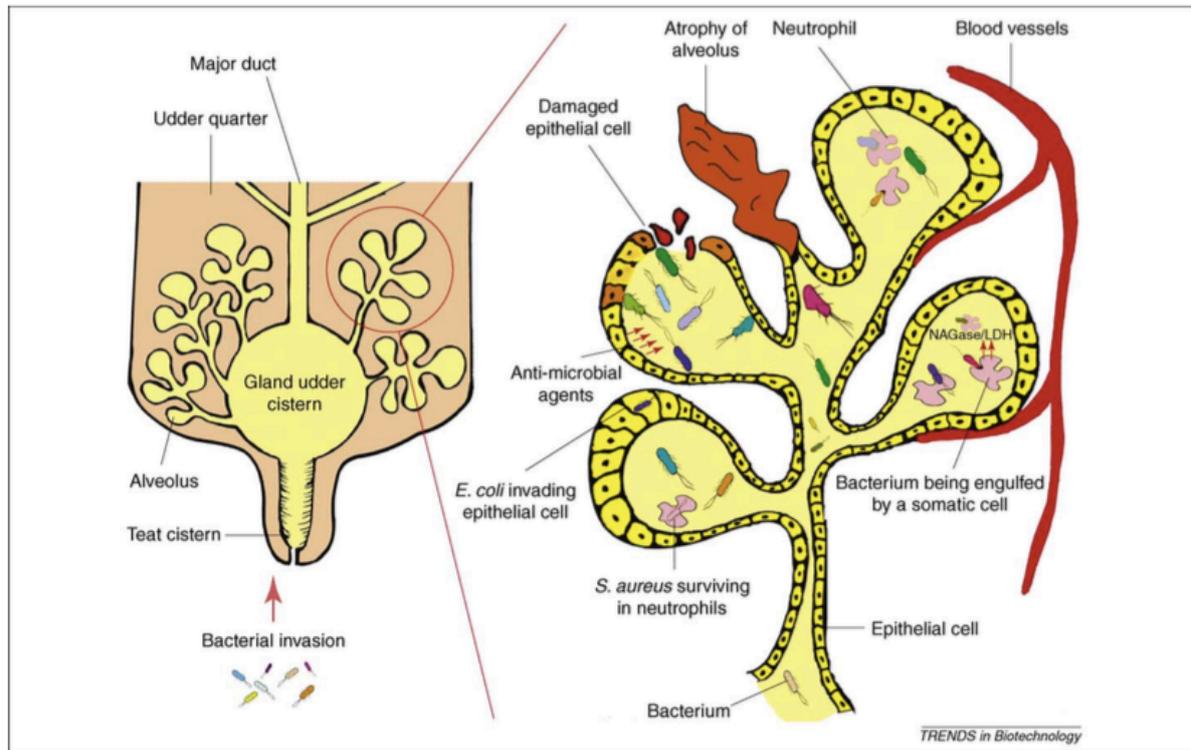


Figure 6 : Schéma représentatif du développement d'une mammite dans une mamelle infectée (Viguié et al., 2009)

Les micro-organismes environnementaux et contagieux envahissent la mamelle par le trayon. Ils se multiplient alors dans la mamelle où ils sont attaqués par les neutrophiles tout en endommageant les cellules épithéliales qui tapissent les alvéoles, avec une libération conséquente d'enzymes comme la NAGase et LDH. Les cellules épithéliales secrètent aussi des composants antimicrobiens. Un dommage tissulaire considérable est observé une fois que les cellules immunitaires effectrices commencent à combattre les pathogènes envahisseurs (Viguié et al., 2009) (Figure 6).

A. Pénétration des bactéries dans la mamelle

A part le cas particulier des mammites tuberculeuses et brucelliques d'origine hématogène, les germes pathogènes pénètrent généralement dans le quartier par le canal du trayon. Celui-ci constitue une première barrière contre la colonisation de la mamelle : le sphincter à la base du canal assure l'étanchéité entre la mamelle et le milieu extérieur. Les cellules kératinisées de la muqueuse se desquament régulièrement, participant à l'élimination des germes en début de traite. Ainsi la pénétration des germes se réalise au moment où le sphincter est ouvert, durant la traite et surtout en fin de traite (le sphincter reste ouvert environ une demi heure après la traite), mais aussi à l'approche du vêlage, ou au tarissement où le sphincter laisse suinter voire couler un peu de lait par la pression de celui-ci. La pénétration des bactéries se produit suivant trois possibilités :

◇ **Au cours de la traite**

● **Par le phénomène d'impact**

Une entrée d'air se réalise au niveau des manchons trayeurs provoque une baisse du niveau de vide dans la griffe et un reflux de lait sous forme de brouillard, vers les autres manchons où le niveau de vide est plus élevé. Le lait se dépose sur les trayons et peut même pénétrer le canal. Ce lait peut être contaminé par des germes d'un quartier malade ou par la présence de ceux-ci dans les manchons (JEAN BARROT DEBREIL, 2008) .

● **Par le phénomène de traite humide ou Reverse Flow** C'est le retour du lait qui vient d'être traité vers le trayon en raison d'un mauvais réglage des phases de massage de la machine à traiter (LABBÉ, 2007).

◇ **Par la multiplication des germes présents sur le trayon**

Ces germes profitent de l'ouverture du trayon en post-traite pour pénétrer le canal. Les lésions du trayon et du sphincter (verruge, gerçure, blessure, éversion du sphincter) favorisant la multiplication des germes. Un contact précoce entre le trayon et l'environnement (pâture, litière, etc...) est aussi un facteur prédisposant l'infection du canal par des pathogènes après la traite (BORN et al., 2006).

◇ **Par l'introduction de germes par l'être humain**

Que ce soit par l'éleveur ou le vétérinaire, l'introduction dans le sinus lactifère de germes est réalisée par la mise en place de traitement intra-mammaire ou de sondage du canal du trayon de manière non adéquate (défaut d'hygiène). Après cette étape, les bactéries se retrouvent dans le lait intra-mammaire. C'est le site infectieux obligatoire pour tous les types de mammites (JEAN BARROT DEBREIL, 2008).

B. Infection du quartier mammaire

Lors de chaque traite, une évacuation du lait contribue à l'élimination des bactéries qui ont pu pénétrer le quartier. Le lait joue un rôle de véhicule et de milieu nutritif pour les germes. Ceux-ci peuvent entre chaque traite envahir l'ensemble des canaux galactophores. Les bactéries qui ont la capacité d'adhérer à la surface des épithéliums, ne seront pas chassés par la traite. Cette propriété est probablement une condition nécessaire pour la colonisation de la mamelle de manière plus profonde et sa persistance dans le quartier (TAPONEN et al., 2006). Il est possible que certains germes aient une capacité de croissance telle qu'il ne soit pas nécessaire pour eux d'avoir des facteurs d'adhésion pour produire tout de même une infection. La multiplication bactérienne engendre la production d'enzymes, de toxines qui sont responsables des lésions du tissu sécrétoire et de la modification qualitative du lait produit. Les défenses immunitaires se mettent en place plus ou moins rapidement suivant l'animal et la nature de l'infection. Une mamelle saine ne renferme que peu de cellules immunitaires. Ce sont surtout des macrophages. Lors d'infection, la lésion des tissus mammaires provoque l'afflux de polynucléaires neutrophiles sanguins par diapédèse. Ils deviennent l'espèce cellulaire majoritaire dans le lait. Ce sont eux qui provoquent l'augmentation des taux cellulaires constatée dans le lait de mammite avec l'augmentation des cellules épithéliales desquamées, des lymphocytes et des macrophages. L'afflux massif des polynucléaires est responsable de l'apparition de caillots de fibrine et des grumeaux dans le lait de mammite. La mamelle possède entre autre, une auto-défense par la sécrétion de lactoferrines, le lysozyme, et le système lacto-péroxydase-thiocyanate-péroxydase dans le lait, qui limite la fixation des

agents pathogènes sur les cellules épithéliales et leur multiplication (JEAN BARROT DEBREIL, 2008).

C. Guérison ou persistance de l'infection

Suivant les pouvoirs pathogènes de la bactérie et l'efficacité des défenses immunitaires, l'infection mammaire peut évoluer vers une guérison spontanée ou vers l'extension dans le cas de mammite clinique. Certaines bactéries, après adhésion à la surface des cellules épithéliales, peuvent y pénétrer et s'y multiplier. Cette localisation intra-cellulaire est associée à des infections de type chroniques et récurrentes (BOSQUET et al., 2005). Certaines souches de *Staphylococcus aureus* en pénétrant dans les cellules épithéliales, sont capables de provoquer une apoptose (phénomène sous contrôle normalement hormonal qui se produit en fin de lactation, occasionnant une réduction de la production laitière). D'après LAFONT *et al.*, MIDDLETON *et al.* ont montré que lors d'infection expérimentale par *Staphylococcus aureus*, la production lactée chute de manière significative par rapport à des vaches saines (JEAN BARROT DEBREIL, 2008). D'autres souches de staphylocoques sont connus pour résister à la bactéricidie des lysosomes, des macrophages et des polynucléaires et peuvent même s'y multiplier. L'action des adhésines, exotoxines, invasines des bactéries associées au passage massif des polynucléaires, provoque la désorganisation des liaisons inter-cellulaires épithéliales et autorise la pénétration de l'agent pathogène dans le parenchyme mammaire, et peut même atteindre les voies lymphatiques, sanguines et provoquer une septicémie. Lors de localisation dans le parenchyme, il se produit une augmentation du tissu inter-alvéolaire au détriment des alvéoles producteurs de lait (BOSQUET et al., 2005). Un tissu fibreux réactionnel et cicatriciel se met en place pour circonscrire le foyer infectieux. Le tissu croît avec l'ancienneté de l'infection, formant des nodules durs dans le quartier, qui sont palpables. La pénétration intra-cellulaire dans le parenchyme mammaire est signe de chronicité. L'apparition de fibrose détermine une incurabilité de l'infection, l'agent est quasi intouchable dans les micro abcès du parenchyme.

Lorsqu'un équilibre s'établit entre multiplication et persistance du germe et les défenses de la mamelle, on observe des mammites subcliniques sans symptôme. Dès que cet équilibre est rompu, l'expression clinique reprend. L'évolution clinique d'une mammite dépend de la nature des bactéries en cause et du statut immunitaire du bovin (JEAN BARROT DEBREIL, 2008).

III.5. Moyens de diagnostic des mammites

La mammites clinique se diagnostique surtout par l'observation des signes cliniques généraux et locaux associés. Pour ce faire, l'éjection des premiers jets ou encore la palpation systématique des quartiers suspects constituent des gestes classiquement pratiqués pour déceler des modifications du lait ou de la mamelle (THERON et al., 2010). Le recours à une caméra thermique pour détecter l'augmentation de la température de la peau du pis a également été proposé (Viguiet et al., 2009). Il est par contre, beaucoup moins facile mais très important de détecter les stades précoces de la mammites surtout si elle se manifeste de manière subclinique. Les méthodes envisageables sont de nature diverse (Viguiet et al., 2009). Les unes visent à identifier de manière directe ou indirecte les modifications cellulaires de la mammites, les autres visant à en identifier les conséquences métaboliques (conductivité, biomarqueurs tels les enzymes...) ou encore les facteurs responsables à savoir l'agent pathogène.

A. Identification directe des modifications cellulaires

Le lait contient différents types cellulaires, incluant les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes et un plus faible pourcentage de cellules épithéliales (Lee *et al.*, 1980 ; Sordillo et Nickerson, 1988 ; Östenson *et al.*, 1988; cité par Boutet, 2006)

Seuls les leucocytes font varier significativement la concentration et sont le signe d'une infection.

Depuis (ALEXANDRE, 2005), le tableau suivant résume les proportions physiologiques des composants cellulaires du lait:

Tableau 5 : Cellules somatiques du lait, leur origine, rôle et proportions physiologiques (complété d'après LE PAGE ; Cité par Alexandre, 2005)

| CELLULES SOMATIQUES | ORIGINE | ROLE | POURCENTAGE |
|--------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------|
| Cellules épithéliales | Erosion du tissu glandulaire | Aucun | 0-7 |
| Polynucléaires neutrophiles (PNN) | Sang | +++ Phagocytose des bactéries | 0-11 |
| Lymphocytes | | Mobilisation des PNN Phagocytose des débris cellulaires | 10-27 |
| Macrophages | | Favorise le contact des bactéries avec les lymphocytes | 66-88 |
| Eosinophiles | Sang | | rare |
| Diverses (cellules kératinisées, hématies) | | | rare |

Le comptage de cellules somatiques est dit SCC pour *Somatic Cell Count* ou CCS pour Concentration Cellulaire Somatique, et varie en nombre et composition selon le statut sain ou malade de la mamelle.

Depuis Boutet et al., le tableau suivant récapitule les proportions de types cellulaires présents dans le lait selon le taux de SCC de ce dernier.

Tableau 6 : Types cellulaires rencontrés dans la glande mammaire saine et infectée (Boutet et al., 2006)

| | SCC (cellules/ml de lait) | Composition cellulaire (%) | | | |
|------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| | | Macrophages | Neutrophiles | Lymphocytes | Cellules épithéliales |
| Quartier sain | < 200.000 | 66-88 ¹ | 0-11 ¹ | 10-27 ¹ | 0-7 ¹ |
| | | 35 ^{2,3} | 26-34 ^{2,3} | 18-24 ^{2,3} | 12-15 ^{2,3} |
| Quartier infecté | > 200.000 | 9-32 ^{1,3} | 50-95 ^{1,3} | 14-24 ¹ | 0-9 ^{1,3} |
| | | | | 1-2 ³ | |

SCC, somatic cell count = taux de cellules somatiques du lait

¹ D'après Lee et al., 1980 ; Concha et al., 1986 ; Miller et al., 1991 ; Riollet et al., 2000

² D'après Miller et al., 1991

³ D'après Boutet et al., 2003

Seuls les leucocytes font varier significativement la concentration et sont le signe d'une infection (ANGOUJARD, 2015).

Il est acquis dans la littérature que le SCC d'un quartier sain, sans croissance bactérienne, est inférieur à 100 x 10 cells/mL tandis que celui d'un quartier très probablement infecté est supérieur à 200 x 10 cells/mL (Djarbri et al., 2002 ; Hillerton, 1999 ; Piepers et al., 2007)

Le comptage cellulaire peut se faire en pratique sur le lait chaque quartier mammaire à part, sur le lait de mélange des quatre quartiers d'une vache ou bien sur le lait de Tank.

La concentration cellulaire somatique individuelle (CCSI) est réalisée sur le mélange de lait des quatre quartiers, le taux cellulaire du quartier infecté est donc dilué par les quartiers sains. De même, une CCSI élevée peut persister après la guérison bactériologique.

Lorsqu'un quartier est infecté subcliniquement par une bactérie de type contagieux, le résultat du CCSI est compris entre 200 000 et plus de 10 000 000 cell/mL (Risco et Melendez, 2011). En conclusion, si une CCSI élevée permet de suspecter une infection, une CCSI basse ne permet pas de conclure à une absence d'infection.

En pratique le choix de la valeur seuil à utiliser pour ce type de test dépend du but du test et des conséquences sanitaires et économiques pour le troupeau des inévitables faux négatifs et faux positifs. Par exemple dans les cas d'évaluation de la guérison bactériologique d'une mammite après traitement, on privilégiera un test avec une grande sensibilité, de façon à laisser passer le moins possible de vaches encore infectées mais avec un CCQ faible (faux négatif). On utilisera dans ce cas une valeur seuil plus faible, tout en sachant que l'on aura beaucoup plus de faux positifs. A l'inverse, si l'éleveur ne raisonne que d'un point de vue économique il aura peut être intérêt, compte tenu des délais d'attente lait après traitement, à utiliser un test peu sensible mais très spécifique de manière à ne traiter que les vaches effectivement infectées, donc choisir une valeur seuil plus élevée. Il apparaît ici la nécessité de faire une évaluation économique des conséquences des faux négatifs et faux positifs pour l'élevage. Cette approche économique sort du cadre de notre étude.

Selon Orlandini et Van den Bijgaart, (2011), la méthode de référence en matière de SCC est le comptage microscopique direct des cellules somatiques (DMSCC). Le DMSCC est basé

sur le comptage des cellules nucléées après coloration, au moyen d'un microscope optique ou plus classiquement maintenant par fluorocytométrie électronique (Orlandini et Van den Bijgaart, 2011). Il existe deux types de fluorocytométrie électronique, la « disc cytometry » et la « flow cytometry ». Dans le premier cas, un volume défini de l'échantillon mélangé à un tampon et un colorant est étalé sur la tranche d'un disque vertical. Dans le second il est poussé dans un capillaire. Chaque particule colorée observée par le microscope à fluorescence émet une pulsion électrique comptabilisée par l'appareil. Ce système de mesure est repris comme gold standard par diverses études sur le comptage des cellules somatiques comme par exemple Araujo et al., (2012). A titre d'exemples de systèmes utilisant la fluorocytométrie, citons le Fossomatic 5000® (Foss Electric, Hillerød, Denmark) ou encore un modèle portable moins couteux comme le Delaval Cell Counter®(DCC) (Delaval nv). Les spectres de mesure se situent respectivement entre 0 et 10 x 10⁶ cells/mL pour le Fossomatic 5000 et entre 10 x 10 et 4 x 10⁶ cells/mL pour le DCC. Le colorant utilisé dans le cas du Fossomatic, est l'ethidium bromide tandis que pour le DCC, c'est du propidium iodide qui est utilisé afin de colorer l'ADN nucléaire (Viguiet et al., 2009).

Tableau 7: Comparaison des avantages et inconvénients relatifs aux principales méthodes de quantification du SCC directes et indirectes (Sources : ORLANDINI and VAN DEN BIJGAART, 2011; Viguiet et al., 2009; depuis Pirard, 2014)

| | Avantages | Inconvénients |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DMSCC | - Standardisé (ISO 13366-1IIDF 148-1) | - Apparence visuelle variable des plages à comptabiliser - Subjectivité humaine substantielle - Chronophage - Fastidieux -Précision perfectible |
| Fossomatic® | - Standardisé (ISO 13366-2IIDF 148-2) - Rapide (jusqu'à 500 échantillons/h) - Automatisé- Bonne précision - Coût plus faible si beaucoup d'analyses | - Coût important à l'achat - Complexité d'utilisation |
| DCC® | - Rapide et facile à utiliser.- Assez précis (Se 86%, Sp 82%). - Automatisé- Rapide- Utilisable sur le terrain. | - Coût assez élevé à l'achat (~2700€) et à l'analyse pour un appareil portable (~2,3€/test). |
| Ekomilk Scan® | - Utilisable sur le terrain.- Rapide.- Automatisé- Coût faible (0,03€ - 0,05€/test). | - Aucune publication sur la précision |
| CMT | - Coût faible (~0,05€/tests si 2mL par test). - Rapide et facile à utiliser.- Utilisable sur le terrain. | - Grande subjectivité- Faible Se (estimation du SCC) |

Se : Sensibilité ; Sp : spécificité ; DMSCC : direct microscopic somatic cell count ; DCC : DeLaval Cell counter ; CMT : California Mastitis Test ; SCC : Somatic cell count.

B. Identification indirecte des modifications cellulaires

Le California Mastitis Test (CMT) est la plus ancienne et la plus connue des méthodes indirectes d'estimation du SCC (Schalm et Noorlander, 1957). Ce test est réalisé en ajoutant au lait un détergent qui provoque une réaction de gélification du mélange dans le cas d'un lait mammitique. Le principe théorique du CMT repose sur le phénomène de la lyse des cellules somatiques lorsqu'elles sont exposées à un détergeant. Whyte et al. (2005) expliquent que, une fois l'ADN et les histones exposés, le gel se forme par liaisons ioniques entre les histones chargées positivement et les têtes de molécules détergentes chargées négativement, ainsi que par la liaison entre elles des queues hydrophobes des molécules détergentes. La viscosité du complexe obtenu étant proportionnelle à la quantité de matériel nucléaire libéré, elle peut être corrélée au SCC (Viguié et al., 2009). Le tableau II reprend les différents grades et les taux cellulaires associés utilisés pour interpréter les résultats du CMT.

Diverses tentatives d'automatisation du CMT ont été développées sans pour autant pouvoir les utiliser « on line » c'est-à-dire en cours de traite (WHYTE et al., 2005). L'Ekomilk Scan® (BULTEH 2000 Ltd.) constitue un exemple d'automate utilisable au chevet de l'animal (cowside test). Il utilise un agent tensio-actif sous forme de poudre. Celle-ci doit être remise en solution dans de l'eau distillée avant d'être mélangée au lait. L'analyseur mesure ensuite le temps de transit du mélange au travers d'un simple capillaire au moyen d'un capteur afin d'évaluer le SCC. L'appareil, notifie à la fois le temps d'écoulement (« flow time ») et le nombre de cellules estimé à partir de ce temps. La plage de dénombrement cellulaire de la machine s'étendant essentiellement de 90 à 2 200 x10⁶ cells/mL

L'intégration du principe du CMT aux outils de détection « on line » a été envisagée par Whyte et al. en 2005. Ceux-ci concluent cependant que la réaction de gélification de ce test est complexe et difficile à contrôler ou même à quantifier. L'utilisation on line du principe du CMT peut donc, selon eux être développée sous réserve de comprendre clairement quelles en sont les variables afin de pouvoir les contrôler.

C. Identification des modifications métaboliques

Des enzymes telles que la N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) augmentent significativement en phase inflammatoire et sont connues comme étant des indicateurs précoces de mammites (Welbeck et al. 2011). La NAGase est une enzyme lysosomiale intracellulaire libérée dans le lait par les neutrophiles durant la phagocytose et la lyse des cellules, ainsi que par certaines cellules épithéliales endommagées (Kitchen et al., 1984). Selon Pyörälä (2003) l'activité de la NAGase est non seulement étroitement corrélée au SCC mais aussi que son utilisation comme indicateur de la mammitite, notamment de l'infection intramammaire (Kitchen, 1981 ; Mattila et al., 1986), est supportée par une littérature abondante. Le développement, par Pemberton et al.(2001) de capteurs électrochimiques capables de détecter la NAGase via sa capacité à transformer le 1-naphthyl N-acetyl- β -D-glucosaminidase en 1-naphthol représente une promesse d'amélioration significative des systèmes de détection « on-line » des mammites (Viguié et al., 2009). Plusieurs autres enzymes comme différentes lipases estérases, phosphatases, ou encore la lactate déshydrogénase (LDH), sont reconnues comme étant augmentées lors de la mammitite et peuvent potentiellement être associées à la détection de la pathologie (Kitchen, 1981). Cependant, aucune évidence ne permet d'assurer leur utilité en tant que test de dépistage pour la mammitite subclinique (Pyörälä, 2003).

La réaction inflammatoire aigue provoque la libération d'un grand nombre de protéines synthétisées par le foie. Elles sont appelées « acute phase proteins » (APP) et augmentent

significativement dans le lait lors de de la phase aigüe de l'inflammation de la glande mammaire (Pannen et Robotham, 1995 ; Raynes, 1994). Chez la vache, les APP les plus sensibles sont l'haptoglobine (Hp) et le serum amyloid A (SAA). Plusieurs travaux récents ont cherché à mettre les APP en évidence dans le lait de vache. Ainsi que l'Hp et le SAA sont significativement corrélés avec la présence d'infection intra-mammaire (IMI) (Eckersall et al., 2001 ; Grönlund et al., 2003). Eckersall et al., (2001) plaident pour une très bonne validité diagnostique de leur détection dans le lait quant à la recherche de mise en évidence de la mammite. Cette étude montre que les cut-off de 0.02 mg/mL et de 0.55 µg/mL pour l'Hp et le SAA respectivement donnent une spécificité parfaite (100%) et de très bonnes sensibilités (86% et 93% respectivement).

La revue de Viguier et al. (2009) notifie les avancées des techniques de protéomiques, comme l'électrophorèse sur gel bidimensionnelle (2D-GE) et la spectroscopie de masse (MS). Celles-ci ont mené à l'identification de nouvelles protéines présentes dans le lait mammiteux et qui pourraient servir de nouveaux biomarqueurs. Il s'agit de protéines dites chaperonnes ayant un rôle dans le reconnaissance des pathogènes (Smolenski. et al., 2007), de protéines sanguines telles que la sérotransferrine ou l'albumine sérique (Hogarth et al, 2004), de protéines neutrophiliques impliquées dans la réponse immune (Lippolis et Reinhardt, 2005), etc. Cependant les méthodes permettant l'utilisation de ces nouveaux biomarqueurs potentiels comme indicateurs diagnostiques de la mammite reste encore à investiguer (Viguier et al. 2009).

Lorsque le tissu mammaire est endommagé, il en résulte une diminution de sa capacité de biosynthèse, y compris celle du lactose. Il est en effet bien établi que la concentration du lactose décroît clairement durant l'inflammation et pourrait donc être utilisée comme marqueurs (Pyörälä, 2003). Un argument positif pour l'utilisation du lactose dans la détection des mammites réside dans la disponibilité accrue en matière de méthodes d'analyse. Un cut of de 4,7% a même été proposé (Hamann, 2002 ; Hamann et Krömker, 1997). Cependant, de plus amples études sont vraisemblablement nécessaires avant de pouvoir utiliser le lactose en tant qu'indicateur pour le screening de la mammite (Pyörälä, 2003).

La mesure des modifications de la conductivité électrique du lait (EC) est la méthode la plus répandue des techniques de détection automatique de la mammite au niveau des robots de traite (Mottram T. et al., 2007). Elle reflète les changements de concentration en ions (sodium, potassium, chlore, calcium, magnésium) résultant de phénomène infectieux. Cependant, bien qu'elle soit un indicateur précieux, elle ne constitue pas encore un outil suffisamment sensible et fiable pour poser un diagnostic conclusif de mammite (Viguier et al., 2009). Des améliorations ont été proposées. Elles consistent à recourir à des systèmes multi sensoriels appelés « electronic tongues » disposant d'une quinzaine de capteurs chimiques, capables de détecter les changements de concentration en ions de chlore, potassium et sodium relargués dans le lait au cours de processus de la mammite en plus des cations et anions inorganiques comme organiques. Dans cette étude, le système multi sensoriel évalué fourni une sensibilité de 93% et une spécificité de 96% lorsqu'il s'agit de discriminer un lait sain d'un lait mammiteux (Mottram et al., 2007).

D. Identification des germes

Les techniques de culture bactériennes classiques représentent la méthode standard par excellence pour le diagnostic des agents pathogènes responsables et la mise en évidence de la mammite (Viguier et al., 2009 ; Sargeant et al. 2001). Cependant ces méthodes sont laborieuses, très couteuses et prennent du temps. C'est pourquoi d'autres tests, tels que le CMT, sont les bienvenus afin de pouvoir préalablement sélectionner les quartiers atteints. Lorsque la culture bactérienne n'est pas concluante, alors qu'un traitement spécifique du ou

des pathogène(s) incriminé(s) est nécessaire, la polymérase chain reaction (PCR) a aussi toute son utilité. En effet, le délai d'attente des résultats de la culture est long (72 à 96 heures nécessaire en Belgique) et l'on sait que 27 à 50% des échantillons analysés se révèlent négatifs (RAO, 2013-2014).

III.5. Traitement et prévention des mammites

A. Prophylaxie médicale

a) La vaccination

La vaccination a pour objectif de protéger l'animal vacciné avec trois axes : diminuer la sévérité des signes cliniques, réduire le nombre de cas et baisser les comptages des cellules somatiques individuels (CCSI).

Un des vaccins ayant l'AMM dans plusieurs pays européens est le Starvac® du laboratoire Hipra. Ce vaccin est composé de deux valences : l'une est constituée d'une souche d'*E. coli*, et l'autre d'une souche de *S. aureus*.

Les études européennes sur le sujet ont des résultats différents. L'efficacité du vaccin contre *S. aureus* dépend des caractéristiques de l'élevage et de la conduite de celui-ci (Schukken et al., 2014). March et al., (2010) dans leur étude pour l'obtention de l'AMM du vaccin ont constaté une diminution du nombre de mammites à entérobactéries, à *S. aureus* et à SCN, une baisse du nombre de traitements utilisés dans les lots vaccinés ainsi que des CCSI inférieures bien que élevées par rapport à la norme (328 000 cell/mL) (ANGOUJARD, 2015). Sérieys, (2011) a également observé une diminution des CCSI mais uniquement pour les vaches multipares.

Wilson et al., 2007 ont constaté une baisse de la sévérité des symptômes locaux et généraux des mammites à entérobactéries grâce à la vaccination (ANGOUJARD, 2015).

La vaccination est un moyen de lutte contre les entérobactéries et les staphylocoques. Elle doit être toujours associée à une très bonne conduite d'élevage avec une bonne gestion des facteurs de risques et une bonne détection des mammites.

B. Prophylaxie sanitaire

a) Hygiène et santé des animaux

L'hygiène de la traite et des bâtiments est une composante importante de la lutte contre les mammites. Les principaux facteurs de risque de l'élevage identifiés sont à prendre en compte dans le plan de lutte. Il convient de diminuer leur impact voire de les supprimer si cela est possible.

La santé des animaux est un facteur important dans la lutte contre les mammites. Une surveillance particulière doit être apportée aux animaux en mauvais état général ou ayant une autre maladie. Les autres maladies prédisposent aux mammites par une action mécanique comme la fièvre de lait qui induit un relâchement du sphincter, par une baisse de l'immunité telles les métrites et les acétonémies, ou parce qu'elles modifient le comportement de l'animal comme les boiteries qui augmentent le temps de couchage (Durel et al., 2011).

b) Augmentation du nombre de traites par jour

La traite permet l'évacuation du lait et avec celui-ci d'une partie des bactéries, des toxines et des médiateurs de l'inflammation. L'augmentation du nombre de traites par jour pourrait en théorie contribuer à la guérison d'une mammite.

La réalisation d'une traite plus fréquente est déconseillée lors de mammites dues aux streptocoques environnementaux. Les vaches traitées via des traites fréquentes seules ou via l'association d'une antibiothérapie intra-mammaire et des traites fréquentes avaient des taux de guérison clinique et microbiologique inférieurs à ceux des vaches témoins (Krömker et al., 2010). La traite fréquente augmente la contagion et accroît le temps de guérison (Roberson et al., 2004).

C. Traitement

a) Les antibiotiques

Le plan de traitement proposé par le vétérinaire praticien se base sur le modèle épidémiologique du troupeau établi à partir des documents de l'élevage et d'un sondage bactériologique. Il permet de choisir l'antibiotique à privilégier en première intention, excepté pour les mammites cliniques accompagnées de signes généraux où la gravité de la situation autorise l'utilisation d'antibiothérapie large spectre en première intention quelque soit le modèle épidémiologique du troupeau.

Le traitement des mammites cliniques accompagnées de signes généraux débute par la gestion du choc via la fluidothérapie, la correction des troubles électrolytiques éventuels et l'administration d'un anti-inflammatoire (AINS de préférence). Le traitement antibiotique se fait par voie diathélique (= intra-mammaire) avec un spectre large Gram – et Gram +, et générale pour lutter contre les infections secondaires à la bactériémie. Les mammites cliniques avec signes généraux nécessitent un traitement de première intention le plus efficace possible afin d'éviter l'évolution vers la septicémie et la mort de l'animal (ANGOUJARD, 2015).

Pour l'antibiotique par voie diathélique, Bosquet *et al.*, 2013 recommandent une association large spectre Gram + et Gram – de type β -lactamine – aminoside, amoxicilline – acide clavulanique ou bacitracine – néomycine. Le traitement par voie générale cible les Gram – afin de lutter contre les conséquences de la bactériémie avec des fluoroquinolones, du sulfamide – triméthoprimine, des aminosides ou de la colistine (Bosquet *et al.*, 2013).

Les mammites cliniques non accompagnées de signes généraux sont souvent des infections récentes et de localisation parenchymateuse superficielle. Bosquet *et al.*, (2013) recommandent l'utilisation de la voie diathélique en première intention. La voie générale est justifiée seulement lors de congestion importante du quartier, qui restreint la bonne diffusion de l'antibiotique intra- mammaire ou lors de mammite subclinique précédemment détectée qui devient clinique.

Le choix des antibiotiques se fait sur la base du modèle épidémiologique et des bactéries suspectées (Tableau8). Lorsque les bactéries Gram – sont majoritairement suspectées, Bosquet *et al.*, 2013 privilégient les associations d'antibiotiques pour obtenir un large spectre d'action telle l'association bacitracine - néomycine. Le choix d'antibiotiques est le même lorsque le modèle épidémiologique est mixte ou indéterminé. En cas de suspicion principale de bactéries Gram +, les antibiotiques sont ciblés avec un spectre d'action principalement Gram +.

Tableau 8: Traitement antibiotique des mammites cliniques sans signes généraux en première intention (d'après Bosquet *et al.*, 2013)

| Modèle épidémiologique | Mixte, indéterminé | Environnemental | | Contagieux | |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| | | > 20 % de Gram - | < 20 % de Gram - | < 20 % de SCP+ | > 20 % de SCP + |
| Spectre d'activité | Large Gram + et Gram - | Restreint Streptocoques et SCP - | | Gram + (Streptocoques, SCP + et SCP -) | |
| Voie d'administration | Diathélique (+ générale si congestion, ancienneté) | | | | |
| Choix des antibiotiques par voie diathélique | β -lactamine – aminoside, amoxicilline – acide clavulanique, bacitracine – néomycine | β -lactamines (benzylpénicilline, pénéthamate) | | Pénicilline M, Céphalosporines de 1ere et 2ème génération, Lincosamides | |
| Choix des antibiotiques par voie générale | Macrolides, β -lactamines (pénéthamate) | β -lactamines (pénéthamate) | | Macrolides | |

Le traitement des mammites subcliniques se fait au tarissement et à de rares exceptions durant la lactation. Le taux de guérison des mammites subcliniques durant la lactation est de 50 % en moyenne contre 70 à 80 % au tarissement. Le coût important de ce traitement en matière de médicaments et surtout de pertes de lait est un critère majeur de décision. Un traitement en lactation permet de diminuer les CCSI et la concentration en bactéries dans le lait. Le choix des animaux à traiter est restreint pour que l'opération soit rentable. Il s'agit de vaches en première ou deuxième lactation dans les 3 premiers mois de cette lactation et ayant un CCSI $\geq 1\ 500\ 000$ cells/mL sans lésions fibreuses du quartier (Bosquet *et al.*, 2013). Le traitement sera à base de prilimycine par voie diathélique contre les bactéries Gram +, à base de gentamicine et de cloxacilline par voie diathélique ou de pénéthamate par voie générale pour une action à large spectre. Un traitement de seconde intention serait trop coûteux.

b) La fluidothérapie

Lors de déshydratation et surtout de choc, la fluidothérapie est la base du traitement de réanimation. L'état de choc est provoqué lors de mammites par la libération d'endotoxines par les agents pathogènes comme les entérobactéries ou par des exotoxines produites par les staphylocoques, les streptocoques, les clostridies et *Trueperella pyogenes* (Le Page *et al.*, 2014).

Les mammites dues à des entérobactéries comme *E. coli* induisent une hypocalcémie. Une complémentation calcique est à réaliser par voie orale. En effet, le calcium peut se révéler toxique pour le fonctionnement du cœur lorsqu'il est injecté par voie parentérale (Le Page *et al.*, 2014).

c) Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (ou « corticoïdes) inhibent la phospholipase A2 qui transforme les phospholipides en acide arachidonique précurseur des molécules pro-inflammatoires comme les prostaglandines.

Le recours aux AIS est controversé. Ils seraient intéressants dans le traitement des mammites endotoxiques pour améliorer la guérison mais favoriseraient des infections cliniques chez les vaches ayant une mammite subclinique à staphylocoques *via* la baisse de l'immunité qu'ils peuvent induire (Le Page *et al.*, 2014).

L'ensemble des AINS a un effet positif sur les signes cliniques de l'inflammation : flunixin, ketoprofène, carprofène, acide tolfénamique (Le Page *et al.*, 2014). Le carprofène améliore l'état général des animaux par son action antipyrétique et la restauration des contractions ruminales (Vangroenweghe *et al.*, 2005).

d) Autres thérapeutiques

En agriculture biologique, l'utilisation d'antibiotiques est très limitée et les éleveurs doivent utiliser des stratégies alternatives telles que l'homéopathie, l'acupuncture, l'utilisation de plantes, de vitamines, de produits à base de lactosérum, d'argile, d'ozone (Loken, 2001 ; Ruegg, 2009). Cependant, peu d'études scientifiques solides viennent soutenir et démontrer de réels effets bénéfiques pour la santé de l'hôte vis-à-vis des mammites. D'autres études seront nécessaires pour déterminer le potentiel de telles méthodes.

Les essais réalisés sur le terrain ont permis le traitement de 100 mammites cliniques par injection intra-mammaire de 10 ml de préparation à base d'huiles essentielles. Une formulation à base d'huile de *Thymus satureoides*, *Rosmarinus verbenone* et *Laurus nobilis*

(1,5% chacun dans de l'huile de tournesol) a été testée sur 55 mammites. Les 45 autres ont été traitées par *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus verbenone* seulement (6% chacun, en solution huileuse ou en suspension aqueuse). Le taux de guérison, comparable quel que soit le médicament testé, est de l'ordre de 40 % des cas seulement (Lefevre et al., 2008).

L'utilisation de bactéries lactiques a également été testée, que ce soit pour leurs bactériocines, telle que la Lacticin 3147 (Crispie et al., 2005) ou la nisine (Cao et al., 2007; Sears et al., 1992; Wu et al., 2007) ou pour leur action inhibitrice envers *S. aureus*, en prévention ou en traitement (Crispie et al., 2008; Klostermann et al., 2008). Ces résultats ont montré que l'utilisation de souches de bactéries lactiques, notamment *Lactococcus lactis* DPC3147 comme traitement présentait une efficacité équivalente à celle d'un cocktail d'antibiotiques classiquement utilisé (Crispie et al., 2008). Cet effet bénéfique sur la santé est majoritairement attribué à la capacité d'immunomodulation des bactéries lactiques. A noter que des études d'innocuité ont été réalisées afin de prouver que l'injection intramammaire de souches de bactéries lactiques n'induisait pas de modification physiologique de la glande mammaire (Frola et al., 2012).

IV. LES SYMBIOTIQUES

IV.1. Généralités

Les symbiotiques sont des additifs alimentaires qui se présentent comme une forme de synergie entre des bactéries probiotiques et des nutriments prébiotiques. Le fait qu'un probiotique ne pourrait pas vivre pendant longtemps dans le tube digestif sans son aliment prébiotique, donne lieu la fonction principale des symbiotiques qui est de prolonger cette vie. En effet, cette source alimentaire qui est les symbiotiques procure au probiotiques un moyen de défense et d'adaptation aux différents facteurs présents dans le système digestif tel l'oxygène, le pH bas, et la température. De plus, le prébiotique fournissant un environnement favorable à la prospérité du probiotique, cette population de bactéries amies est préservée.

Les études récentes poussent à favoriser une forme de synergie entre les prébiotiques et les probiotiques, après avoir conclu que le concours et la coordination des avantages de ces prébiotiques et probiotiques augmentent le nombre de bactéries bénéfiques dans le système digestif. Ces dernières années témoignent d'un élargissement sans précédent de l'intérêt que porte les chercheurs scientifiques aux études sur les symbiotiques, cet intérêt demeure encore plus impressionnant lorsqu'il s'agit de l'application des symbiotiques dans le traitement des maladies. L'admission d'un aliment symbiotique mène à une modulation de l'activité métabolique des intestins, sans modification de la biostructure de ces derniers (Kolida and Gibson, 2011)

IV.2. Composition

A. Les Prébiotiques

L'Organisation Mondiale de la Santé affirme que les prébiotiques sont des substances non digestibles, qui en stimulant la croissance ou l'activité des bactéries endogènes, entraînent un effet bénéfique sur l'organisme hôte. La nature nous offre divers sources de prébiotiques qu'on retrouve dans les aliments : fruits, légumes et céréales. Les exemples les plus communs parmi ces sources sont l'asperge, l'ail, les germes de blé, l'avoine, et l'orge. A ces sources naturelles se rajoutent les oligosaccharides classés comme prébiotiques, ces derniers rentrent dans la préparation de l'aliment, et parmi eux on peut citer : les fibres de nature gommeuse, fructo-oligosaccharides, inulines, isomalto-oligosaccharides (Gibson et al., 2011)

B. Les Probiotiques

Les probiotiques

La notion de micro-organismes bénéfiques est née de la découverte et de l'étude de la microflore indigène de l'humain, en particulier du microbiote intestinal, et de son rôle majeur dans la physiologie et la santé de l'hôte. Le concept de probiotique, bien que ce terme n'ait été introduit qu'une cinquantaine d'années plus tard, remonte ainsi au début du XXe siècle. Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte au-delà du simple apport nutritionnel (FAO–WHO 2001). Ces micro-organismes appartiennent le plus souvent aux bactéries lactiques, notamment au genre *Lactobacillus*, ou *Bifidobacterium*. Les effets exercés par chaque probiotique sont spécifiques des souches sélectionnées et peuvent difficilement être extrapolés aux souches de la même (sous-) espèce ou à d'autres probiotiques. Un probiotique est donc un microorganisme qui doit obligatoirement être administré vivant afin d'exercer son effet dans la zone ciblée et présenter une parfaite innocuité (Bouchard, 2013).

* *Les bactéries lactiques*

Les bactéries lactiques constituent un groupe hétérogène de bactéries (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*...) qui ont pour principal trait commun, la capacité de produire de l'acide lactique comme produit final de fermentation des sucres. Longtemps exploitées pour leurs propriétés techno-fonctionnelles, notamment dans la conception de produits alimentaires fermentés, elles sont aujourd'hui de plus en plus étudiées pour leurs effets probiotiques en santé humaine et animale. En plus de l'effet santé, chez l'animal, cette supplémentation a aussi pour but d'améliorer la croissance (efficacité alimentaire, gain de poids, production de lait) (Bouchard, 2013).

Le Tableau 19 ci-dessous, résume différentes études reflétant l'effet des bactéries lactiques sur la santé animale.

Tableau 9 : Exemples d'études reflétant l'impact des bactéries lactiques sur la santé des animaux (Bouchard, 2013)

| Animal | Strains | Tests | Beneficial effects | References |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Pigs and Sows | <i>Lactobacillus farminis</i> 3699 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 3698 | <i>in vitro</i> | Inhibition of adhesion, dissemination and viability of <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> and <i>Brachyspira pilosicoli</i> | Bernardeau et al., 2009 |
| | <i>Lactobacillus casei</i> | <i>in vivo</i> | Enhance meat productivity, intestinal fermentation and colonization of the gastro-intestinal tractus | Ohashi et al., 2004 Kritas and Morrison, 2007 |
| | <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> | <i>in vivo</i> | Decrease <i>Salmonella</i> portage in gastro-intestinal tractus | Casey et al., 2004 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> EK13 | <i>in vivo</i> | Decrease of <i>E. coli</i> bacterial count in faeces. Reduce cholesterol and enhance total seric protein | Stompfora et al., 2006 |
| | <i>Bifidobacterium lactis</i> B12 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG | <i>in vivo</i> | Human bacterial probiotics have competitive exclusion against pigs entero-pathogens | Collado et al., 2007 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB10415 | <i>in vivo</i> | Probiotics strains reduce diarrhea associated to pathogens and antibiotics use and reduce the virulence expression of <i>E. coli</i> | Taras et al., 2006 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> SF68 | <i>in vivo</i> | Reduce cytotoxicity mediated by <i>E. coli</i> during intestinal infections | Scharek et al., 2005 |
| | <i>Bifidobacterium</i> sp <i>Lactobacillus</i> sp | <i>in vivo</i> | Probiotics enhance positive flora implantation after birth et reduce intensity and severity of enterocolitis | Siggers et al., 2008 |
| Poultry | <i>Lactobacillus</i> spp | <i>in vivo</i> | Enhance meat and eggs productivity. Reduce mortality and nutriments absorption | Torres-Rodriguez et al., 2007 Yoruk et al., 2004 Yamawaki et al., 2013 |
| | <i>Pediococcus acidilactici</i> | <i>in vivo</i> | Enhance resistance to coccidiosis by enhancing humoral immunity of host | Lee et al., 2007 Tewari et al., 2011 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 | <i>in vivo</i> | Increased the weight gain, the conversion rate and the size of the villi in the ileum | Samli et al., 2007 |
| | <i>Lactobacillus johnsonii</i> F19785 | <i>in vivo</i> | Control endemic necrotic enteritis caused by <i>Clostridium perfringens</i> reducing economic losses and the use of antibiotic | La Ragione et al., 2004 |
| | <i>Lactobacillus</i> sp | <i>in vivo</i> | Decrease <i>Salmonella</i> Enteridis colonization in chicks | Higgins et al., 2008 Chen et al., 2012 |
| Dairy cattle | <i>Lactobacillus</i> sp <i>Bifidobacterium</i> sp <i>Streptococcus</i> sp | <i>in vivo</i> <i>in vitro / vivo</i> | Decrease diarrhea, improved weight gain, reducing health costs. Reduce gastrointestinal and urogenital pathogens colonization | Al-Dobaib et al., 2009 Krehbiel et al., 2003 Otero et al., 2008 |
| | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>in vivo</i> | Elimination of the pathogen in the mammary gland by stimulating the immune system of the host | Klostermann et al., 2008 Crispie et al., 2008 |
| | <i>Lactobacillus casei</i> | <i>in vitro</i> | Reduction of adhesion and internalization of <i>S. aureus</i> into bovine mammary epithelial cells | Bouchard et al., 2013 |
| | <i>Lactobacillus casei</i> OLL2768 | <i>in vivo</i> | <i>Lactobacillus casei</i> can act as an immunobiotics to reduce the proinflammatory response during <i>E. coli</i> intestinal infections | Takanashi et al., 2013 |
| Small ruminant | <i>Lactobacillus</i> sp <i>Streptococcus</i> sp | <i>in vivo</i> | Reduction of intestinal carriage of <i>E. coli</i> O157H7, improves food intake and weight | Lema et al., 2001 |

IV.3. Propriétés des symbiotiques

Les symbiotiques sont l'association d'un probiotique et d'un prébiotique spécifique. Le but est de fournir au probiotique un substrat utilisable dans le côlon pour augmenter sa persistance, sa survie et donc les concentrations lumineales de bactéries vivantes.

Les probiotiques sont des suppléments nutritionnels composés de micro-organismes vivants (essentiellement lactobacilles et/ou bifidobactéries) qui exercent une action bénéfique sur l'hôte qui les ingère.

Les prébiotiques sont des substances capables d'exercer des effets bénéfiques chez l'homme en stimulant la croissance et/ou l'activité de certaines bactéries de la flore colique autrement des probiotiques.

Etant donné que le symbiotique est une association probiotique-prébiotique visant une potentialisation d'action de l'un et de l'autre, et que les prébiotiques sont des substances dont le but principal est de stimuler la croissance et/ou l'activité des probiotiques, alors cette partie portant sur les propriétés des symbiotiques va surtout contenir celles des probiotiques, leurs composants actifs.

Les probiotiques ont des effets sur les performances des animaux et leur santé notamment par une action anti diarrhéique, par l'inhibition des bactéries indésirables, la neutralisation des produits toxiques, l'amélioration de la digestibilité et la stimulation des mécanismes immunitaires. Les mammites, les métrites et les diarrhées sont les maladies les plus communes aux animaux d'élevages. Elles peuvent affecter la productivité mais aussi la fertilité des animaux. La majorité des études sur les probiotiques portent sur l'écosystème intestinal ou vaginal chez l'Homme. Très peu d'études mettent en évidence les mécanismes impliqués dans le potentiel inhibiteur des bactéries lactiques probiotiques chez l'animal. Leur usage est, pour l'heure, essentiellement ciblé sur le tube digestif de l'hôte. Cependant depuis quelques années l'usage de probiotiques dans d'autres écosystèmes (vaginal, mammaire) est évalué ouvrant de nouvelles possibilités thérapeutiques (contre les métrites ou les mammites) (Bouchard, 2013)

A. Protection des intestins

La flore intestinale participe activement au renforcement du système immunitaire, Les bactéries probiotiques peuvent altérer la perméabilité de la muqueuse intestinale, sont en charge de piloter la production des cellules immunitaires qui vont naviguer dans tout le corps jusqu'au système respiratoire même. De plus, elles luttent contre l'augmentation de la charge des bactéries pathogènes et préviennent les infections virales. La production de l'acide lactique par ces probiotiques crée un environnement acide désavantageux aux pathogènes. En outre, la production des Bactériocines par quelques souches de probiotiques inhibe la croissance des souches similaires ou proches de ces souches bactériennes (Nocek, 2002)

B. Prévention de l'acidose ruminale

Chez la vache laitière, les bactéries probiotiques sont recommandées dans des situations de déséquilibre microbien, en l'occurrence au début de la lactation avec le changement brutal de la ration alimentaire assez riche en aliments concentrés et très fermentescibles, ce qui

engendre une baisse du pH ruminal. La plupart des expériences sur la prévention des acidoses par les probiotiques ont montré une stabilisation du pH (Nocek, 2002), (Greening et al. 1991) ont utilisé des bactéries utilisatrices de lactate (*Megasphaera elsdenii*) qui ont diminué l'acide lactique ruminal et donc diminution du pH ruminal.

C. Amélioration de la Production laitière

En général, une augmentation de 0.75 à 2 kg lait/jour a été observée. Cependant, l'effet sur la composition varie d'un cas à l'autre. Dans une publication récente, L'administration de symbiotique a entraîné une augmentation de produits de fermentation et de la matière grasse. (Chiquette et al., 2008).

D. Effets bénéfiques contre les infections bactériennes

Au niveau d'un écosystème, comme l'écosystème intestinal ou vaginal, les pathogènes sont confrontés à des environnements hostiles. Ces environnements incluent des activités physiologiques comme la production d'acides biliaires, d'acides organiques ou encore de peptides antimicrobiens. L'ensemble de ces conditions environnementales créent des obstacles aux pathogènes. Ces derniers élaborent des stratégies de survie et d'échappement, notamment par l'internalisation dans les cellules de l'hôte. Certains des agents pathogènes les plus importants sont des pathogènes intracellulaires (obligatoires ou facultatifs ; par exemple *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*). Leur capacité à envahir les cellules hôtes est une étape clé dans le processus d'infection et ou dans leur persistance dans les tissus de l'hôte. L'invasion des tissus de l'hôte repose majoritairement sur l'interaction entre des substances extracellulaires de la bactérie avec des molécules complémentaires présentes à la surface de l'épithélium. La capacité des BL à empêcher l'invasion de pathogènes est donc souvent testée, en particulier contre les agents pathogènes intestinaux.

Au niveau de l'écosystème vaginal, de nombreux agents pathogènes sont intracellulaires (ex. *Mycoplasma genitalium*, *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *E. coli* uropathogène). Dans la littérature scientifique, il existe de nombreuses références sur les probiotiques vaginaux. Cependant, il n'y a presque pas de rapports sur la capacité de ces probiotiques vaginaux à interférer avec l'invasion de pathogènes dans les cellules épithéliales de l'hôte. Spurbeck et Arvidson ont adapté un modèle de culture cellulaire *in vitro* pour examiner les effets de souches de lactobacilles sur les interactions gonococciques avec les cellules épithéliales endométriales. Dans ce travail, ils ont noté que la précolonisation des cellules en culture avec des lactobacilles (*L. jensenii*, *L. gasseri* ATCC33323 ou ATCC9857) entraîne une inhibition de l'invasion gonococcique de cellules épithéliales de plus de 60 %. Cette inhibition s'est avérée être indépendante des mécanismes d'adhésion (Spurbeck et Arvidson, 2008).

Les probiotiques affectent positivement l'hôte en améliorant la balance de la flore intestinale (Fuller, 1989). Les probiotiques permettent de créer des conditions défavorables pour le développement des flores pathogènes (Mauntzairis et al. 2007) et à l'inverse favorisent les microorganismes bénéfiques, qui améliorent à leur tour la santé de l'hôte. De nombreuses souches de lactobacilles présentent un effet protecteur pour l'organisme hôte contre une variété d'entéropathogènes incluant *Salmonella* (Gill et al. 2001), *L.monocytogenes* (Waard et al. 2002) et *E. coli* (Medellin-Pena et Griffith, 2009).

Ces effets protecteurs sont conférés par la maturation des cellules du système immunitaire permettant une élimination plus efficace du pathogène (Bouchard, 2013).

E. Stimulation du système immunitaire

Parmi les allégations santé conférées aux souches probiotiques, les propriétés d'immunomodulation des bactéries lactiques sont souvent mises en avant. Ces allégations suscitent de grands intérêts suite au lien établi entre l'altération de la microflore de l'hôte, les maladies autoimmunes et l'émergence des allergies. De nombreuses études relatent le rôle crucial du microbiote dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte et la maturation du système immunitaire chez l'enfant (Martin et al., 2004 ; Ouwehand et al., 2002 ; Reid G., 1999). En théorie, la régulation immunitaire se traduit par une homéostasie entre les activités immunitaires humorale et cellulaire, des cellules Th1, Th2 et Th17 qui jouent un rôle central dans le mécanisme de régulation immunitaire. Les lymphocytes Th1 sont responsables de l'immunité cellulaire, ils participent à l'élimination des pathogènes intracellulaire, grâce à l'interféron- γ . Ils activent les lymphocytes T CD8, les cellules NK et les macrophages. Les lymphocytes Th2 sont responsables de l'immunité humorale. Ils vont aider les lymphocytes B à produire des anticorps (IgM, IgE, IgA). Les anticorps ne peuvent être actifs que sur les pathogènes extracellulaires. Les lymphocytes T régulateurs vont arrêter la réponse immunitaire. Les lymphocytes Th17 sont décrits comme étant des Lymphocytes T régulateurs naturels, produits dans le thymus, et des Lymphocytes T régulateurs induits en périphérie. Ils agissent par des contacts cellule-cellule et surtout en produisant des cytokines inhibitrices dont l'IL-10. Chez des individus sains, l'ensemble du système immunitaire est maintenu en homéostasie cependant un déséquilibre entre les acteurs du système immunitaire peut engendrer des maladies. Ces immuno-pathologies peuvent être indépendantes d'une flore microbienne, cependant de nombreux cas de maladies inflammatoires (du tube digestif notamment) font état d'un déséquilibre de la flore microbienne associée à l'organe touché. Les approches basées sur l'utilisation des probiotiques sont aujourd'hui proposées comme une alternative d'immunothérapie tant en utilisation préventive que curative lors d'anomalies ou pathologies immunologiques. Selon la littérature, les probiotiques, grâce à leurs composants intra et/ou extracellulaires, sont capables d'influencer le système immunitaire par contact avec les cellules immunocompétentes mais aussi par interaction avec les épithéliums de l'hôte, qui vont alors modifier la réponse immunitaire de l'organisme (Figure 7). On parle alors de capacités immunomodulatrices des probiotiques dont certaines souches peuvent, par exemple, être pro ou anti inflammatoires, augmentant la résistance aux infections et réduisant aussi les risques d'allergie (Ceslovas et al., 2005). Chez les animaux sains, la supplémentation en probiotique stimule une réponse immunitaire non spécifique et renforce l'immunité de la muqueuse (Ceslovas et al., 2005; Cetin et al., 2005; Scharek et al., 2007).

L'amélioration de la protection immunitaire des muqueuses est souvent corrélée avec la propriété des bactéries lactiques à améliorer l'intégrité de l'épithélium mais aussi à favoriser le transport de protéines et l'absorption de glucose intestinal (Loderman et al., 2006). Plusieurs exemples montrent ces effets directement *in vivo*, notamment chez les modèles souris où l'immunomodulation des souches a permis de réduire la sévérité des infections à *E. coli* O157:H7 grâce à l'amélioration de l'immunité humorale et cellulaire. D'autres études ont montré qu'en application intramammaire, l'activité immunomodulatrice de la souche de *L. lactis* DPC3147 a permis un taux de guérison équivalent à celui d'un traitement antibiotique au cours d'une mammite bovine (Crispie et al., 2008). L'effet bénéfique de cette infusion intra-mammaire a été étudié *in vivo* et il a été montré que la souche sélectionnée

stimule la réponse immunitaire (en particulier l'IL-1 b et l'expression du gène IL-8) dans la glande mammaire favorisant l'élimination du pathogène (Beecher et al., 2009).

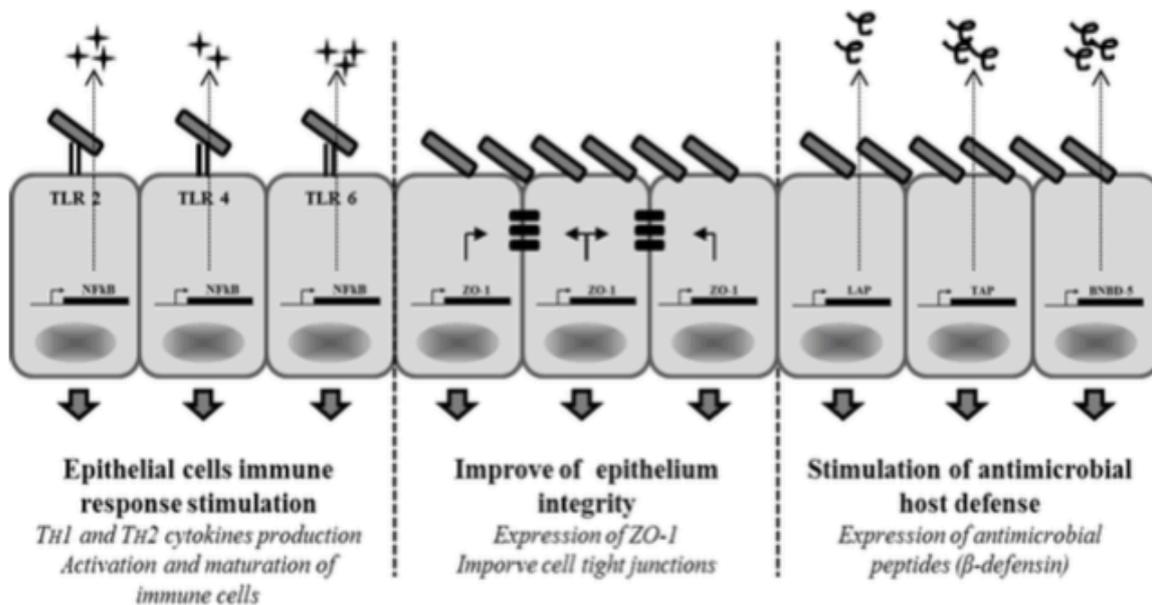


Figure 7 : Représentation schématique de l'impact des bactéries lactiques sur les cellules épithéliales de l'hôte (Bouchard, 2013).

a) Effets bénéfiques de l'activité immunomodulatrice

L'immunité innée constitue non seulement la première ligne de défense de l'organisme mais elle joue aussi un rôle crucial dans le développement de la réponse adaptative. Dans un modèle murin, plusieurs souches de *Lactobacillus* améliorent l'immunité innée et adaptative par l'activation de la maturation des cellules dendritiques (Christensen et al., 2002). Les lactobacilles peuvent aussi stimuler la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules professionnelles notamment le « tumor necrosis factor alpha » ($TNF\alpha$), l'interféron gamma ($IFN\gamma$) et l'interleukine 12 ($IL12$) assurant un maintien de l'homéostasie immunitaire (Cross et al., 2002 ; Maassen et al., 2000 ; Nagafuchi et al., 1999 ; Perdigon et al., 1999 ; 2002) (Figure 6).

b) Effets bénéfiques sur l'immunité humorale

La première ligne de défense adaptative au niveau des muqueuses est la présence de tissus lymphoïdes associés à l'intestin. Ces tissus forment des « plaques de Peyers » où les microorganismes pathogènes interagissent avec les cellules spécialisées du système immunitaire et induisent une réponse mucoale (Mac Donal et al., 2003). Les lactobacilles peuvent induire une réponse locale ou systémique par l'activation des cellules dendritiques qui stimulent le relargage de cytokines pro-inflammatoires et la synthèse d'Immunoglobuline A dans la lumière intestinale (Mohamadzadeh et al., 2005; Vinderola et al., 2006). Il a ainsi été montré que les lactobacilles modulent l'immunité de la muqueuse intestinale, l'expression de cytokines, la maturation des cellules immunitaires et la prolifération lymphocytaire (Drakes et al., 2004).

c) Effets bénéfiques contre les infections bactériennes

Les probiotiques affectent positivement l'hôte en améliorant la balance de la flore intestinale (Fuller et al., 1989). Les probiotiques permettent de créer des conditions défavorables pour le développement des flores pathogènes (Mauntzairis et al., 2007) et à l'inverse favorisent les microorganismes bénéfiques, qui améliorent à leur tour la santé de l'hôte. De nombreuses souches de lactobacilles présentent un effet protecteur pour l'organisme hôte contre une variété d'entéropathogènes incluant Salmonella (Gill et al., 2001), *C. difficile* (Billes et al., 1995), *L. monocytogenes* (deWaard et al., 2002) et *E. coli* (Medellin-Pena et Griffith, 2009). Ces effets protecteurs sont conférés par la maturation des cellules du système immunitaire permettant une élimination plus efficace du pathogène.

Un autre système de défense est la production de peptides antimicrobiens. Les peptides antimicrobiens sont majoritairement produits par les granulocytes, les monocytes, les macrophages, les plaquettes et cellules épithéliales (figure 17). Chez les bovins, des dizaines de ces peptides ont été décrits comme les β -défensines (BNBD), le « Lingual Antimicrobial Peptide » (LAP) ou le « Tracheal Antimicrobial Peptide » (TAP) (Rainard et Riollet, 2006 ; Selsted et al., 1993 ; Yount et al., 1999 ; Stolzenberg et al., 1997 ; Alva-Murillo et al., 2012). Plusieurs β -défensines sont produites dans la glande mammaire saine (LAP, TAP et BNBD3). Les défensines ont une activité antibactérienne puissante contre *S. aureus* et *E. coli* in vitro (Selsted et al., 1993). Lors de mammites staphylococciques, il a été montré une augmentation de l'expression de l'ARNm de la β -défensin 5 de la glande mammaire. Dans la glande mammaire, le rôle de protection de ces peptides reste cependant à documenter. Quelques études in vitro ont ainsi identifié que des acides gras à courte chaîne ont la capacité de stimuler la production de peptides antimicrobiens dans la glande mammaire et d'induire une diminution de l'internalisation de *S. aureus* dans les tissus de l'hôte (Ochoa-Zarzosa et al., 2009 ; Alva-Murillo et al., 2012).

d) Effets bénéfiques sur l'intégrité de l'épithélium

Une barrière épithéliale intacte est essentielle afin d'empêcher la pénétration d'antigènes dans la lumière intestinale ou mammaire par exemple (Mac Cormick et al., 2003). La barrière épithéliale est composée de la membrane cellulaire apicale et des jonctions serrées intercellulaires. Le zonula occludens (ZO)-1, est une des protéines de jonction serrées les plus importantes. Elle agit comme un lien avec le cytosquelette et d'autres protéines des jonctions serrées. La perturbation de la barrière épithéliale mène à une augmentation de la perméabilité et permet la pénétration des antigènes qui induisent une inflammation. Plusieurs bactéries pathogènes peuvent envahir les cellules épithéliales et détruire les jonctions cellulaires (Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). Les probiotiques ont démontrés leurs capacités à protéger la fonction de barrière épithéliale mais les mécanismes impliqués ne sont pas bien compris. Le prétraitement de cellules épithéliales par des souches de *Lactobacillus* empêche notamment la perte d'intégrité de la barrière induite par les pathogènes notamment en augmentant l'expression de la protéines ZO-1 (Johnson-Henry et al., 2008 ; Parassol, et al., 2005 ; Sherman et al., 2005) (figure 7).

CHAPITRE 2 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Objectif de l'étude :

Les mammites bovines représentent un coût économique et sanitaire important pour la production laitière dans le monde. La prévention et le traitement des mammites reposent essentiellement sur l'usage d'antibiotiques qui affectent négativement la qualité de lait et dont l'efficacité est limitée. En outre l'usage d'antibiotiques pour contrôler les mammites contribue au risque de dissémination de l'antibio-résistance. Ce qui nous conduit à se poser diverses questions sur le type de prise en charge des cas de mammites et de ce fait établir plusieurs objectifs à notre étude :

- Il est d'abord question de faire un état des lieux des infections mammaires subcliniques et leur prévalence dans le troupeau de la ferme Ibrahim dans la Wilaya de Tipaza par le biais de la mesure des concentrations des cellules somatiques individuelles (CCSI)
- Identifier la nature des germes responsables des mammites subcliniques et d'évaluer leur fréquence. Le but est d'observer l'évolution de la bactériologie après mise en place d'un additif alimentaire de type symbiotique dans l'élevage visant à améliorer les performances zootechniques du troupeau et de ce fait avoir un effet soit curatif soit préventif vis à vis des mammites subcliniques.
- Ensuite, fournir des données sur le nombre et l'évolution des CCSI selon le type de bactérie responsable d'infection, ainsi que de la prise ou non de l'additif.

Tous les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés au sein de deux structures :

- Ferme Ibrahim à Tipaza
- Laboratoire de Microbiologie, EHS Salim Zemirli-El Harrach

II. Matériels et Méthodes

II.1. Présentation de l'élevage

L'élevage est situé à Sidi Rached dans la Wilaya de Tipaza. Il est voué à la production laitière et comporte 150 vaches dont la moyenne de production laitière sur 7 jours est de 1497.5 Litres par vache soit 78000 Litres par vache par an.

Les vaches de cet élevage sont de race Fleckvieh importées d'Autriche. Elles vivent en stabulation libre dans un bâtiment à ventilation naturelle, le sol est équipé d'un tapis de couchage, le nettoyage est réalisé par un racleur automatique 3 fois / jour.

II.2. La traite

La traite est effectuée 2 fois/ jour par une machine de traite automatique 2x5.

Protocole de traite :

- nettoyage soigné des trayons à la main s'ils sont très sales
- élimination des premiers jets, le plus souvent dans un bol à fond noir, la détection des mammites cliniques est donc bonne
- pré-trempage des trayons dans un produit détergent, moussant et désinfectant
- attente de 30 secondes
- pose des manchons trayeurs
- décrochage automatique

Il n'y a pas d'ordre de traite. Les vaches à mammites sont traitées au pot grâce aux deux griffes supplémentaires. Toutes les opérations de traite sont effectuées par le technicien de la ferme.

II.3. Méthode d'échantillonnage

Une présélection a eu lieu sur toutes les vaches du troupeau en phase de lactation, et ainsi les critères d'exclusion sont :

- Un traitement antibiotique local ou général
- Vache avec maladie intercurrente
- Vaches au cours du tarissement

Au final, notre expérimentation a concerné 68 vaches en lactation dont 45 a qui nous avons administrés le symbiotique à raison de une fois par mois à partir du premier prélèvement de lait; Ce qui représente un taux d'échantillonnage d'environ 87% pour les vaches en lactation (qui sont de 78 vaches au sein de la ferme Ibrahim), et d'environ 45% pour la totalité des vaches de cet élevage dont l'effectif est de 150.

II.4. Méthodes

A. Durée de l'étude

Cette étude a débuté en Février 2017 pour prendre fin en Mai 2017 ; Elle couvre donc une durée de 4 mois.

B. Définition du cas mammite et critères d'évaluation de la guérison

Dans notre plan expérimental, l'unité utilisée est la mamelle. Un cas de mammite est défini comme une mamelle qui présente un taux cellulaire supérieure ou égale au seuil (S) de guérison ou de non infection qui est de 200.000 cellules/ml de lait (Boutet et al., 2006).

Chaque cas de mammite subclinique ainsi défini est alors le point de départ d'acheminement des prélèvements pour la bactériologie.

L'évaluation de la guérison des vaches s'effectue à l'aide des CCSI par rapport au seuil (S) comme détaillé sur le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Critères d'évaluation de guérison des mamelles

| CCSI À J0 | CCSI à J64 | Evaluation |
|-----------|------------|--------------------|
| $\geq S$ | $\geq S$ | Non guéri |
| $\geq S$ | $< S$ | Guérison apparente |
| $< S$ | $< S$ | Restant sain |
| $< S$ | $\geq S$ | Infection |

La guérison bactériologique des mamelles quant à elle, implique simplement l'absence de germes dans l'échantillon de lait analysé à J64.

C. Le dispositif expérimental

a) Prélèvements

- **Moment du prélèvement**

L'évolution des mammites subcliniques a été suivi sur le plan microbiologique et cellulaire par le prélèvement de 3 échantillons de lait dans le temps à intervalle d'environ 1 mois entre les différents prélèvements ; Soit au Jour 0 (où le comptage cellulaire permet de définir les lots de vaches) puis au Jour 31 et finalement au Jour 64.

Les prélèvements de lait ont été effectués :

- Sur les 68 vaches choisies pour cette étude, ceci afin d'effectuer dans un premier temps le comptage des cellules somatiques et ainsi déterminer les mamelles infectées. Ce premier prélèvement constitue le point de départ de l'étude de l'infection de la mamelle et a été réalisé le 19/02/2017. Les prélèvements dont le taux cellulaire atteint ou dépasse la barre des 200.000 cellules/ml sont acheminés au laboratoire et soumis à un examen bactériologique. Le volume prélevé est de 20 millilitres environ.

- Chaque mamelle est à nouveau prélevée pour réaliser un comptage cellulaire et une analyse bactériologique; Ceci a été réalisé 1 mois environ après le premier prélèvement soit le 21/03/2017.

- Enfin un dernier prélèvement est effectué le 23/04/2017 (encore 1 mois après le 2ème prélèvement) pour réaliser un dernier comptage cellulaire et un examen bactériologique afin

d'estimer l'effet de l'additif symbiotique sur les performances des vaches laitières et par conséquent leur résistance aux pathogènes.

- **Réalisation du prélèvement**

La valeur de l'examen bactériologique du lait de mammites dépend en grande partie de la qualité du prélèvement, qui dépend de la technique de l'opérateur. Notre technique de prélèvement suit les recommandations de MIALOT (MIALOT, 1983) :

- Lavage des mains.
- Lavage et séchage des trayons.
- Désinfection de l'extrémité du trayon à l'aide d'un coton imbibé d'alcool à 70°.
- Elimination du premier jet de lait.
- On saisit le flacon à prélèvement entre le pouce et les doigts de la main droite et on retourne le flacon de façon à diriger le bouchon vers le bas.
- On dévisse le bouchon de la main gauche et on le porte entre l'index et le majeur de la main droite. Tube et bouchon ont alors leurs ouvertures dirigées vers le bas afin d'éviter toute contamination.
- On saisit alors le trayon de la main gauche, on le ramène en position horizontale et on trait dans le flacon incliné un peu plus de 10 millilitre de lait.
- On referme le flacon avant de le redresser.
- On identifie aussitôt le flacon avec la date, et le numéro de la vache.

Lorsque l'on prélève plusieurs quartiers, on respecte un ordre de prélèvement inverse de l'ordre de désinfection, afin d'éviter de toucher un trayon non prélevé avant de le prélever. Dans notre étude, nous avons suivis cette méthode sauf que nous avons collectés les jets de chaque quartier de la même mamelle dans un même flacon stérile (Annexe 1)

L'analyse sur les laits de mélange conduit à une perte d'information, mais ce choix a été guidé essentiellement pour des raisons de coût. Par ailleurs, notre objectif étant de réaliser l'expérimentation d'un symbiotique et pas seulement un diagnostic microbiologique des mammites, nous avons opté pour une simplification du protocole d'analyse.

- **Conservation et expédition**

Les prélèvements sont gardés à une température de 4°C et expédiés au laboratoire dans les 4-5 heures qui suivent les prélèvements.

b) L'addition du symbiotique

- **L'additif :**

L'additif utilisé dans cette étude est le SYMBIOVEBA® (Marque déposée de MARCOPOLO Environnemental Group) (Annexe 3) qui est un additif alimentaire purement biologique à usage vétérinaire, permettant à l'animal après administration par voie orale de :

- Rééquilibrer le PH du rumen
- Améliorer ses performances zootechniques (augmentation de la production laitière)
- Prévenir les troubles digestifs
- Renforcer son système immunitaire
- Et maintenir le bon état général de l'animal.

La production et la commercialisation du produit ont lieu en conformité avec les exigences de la norme Européenne ISO 9001 version 2000, les directives CEE relatives à l'amélioration de la santé et le bien être de l'animal.

La composition de ce produit est la suivante :

Plantes médicinales (TARAXACUM OFFICINALIS, ZINGIBER OFFICINALIS), Probiotiques (Lactobacillus & de Saccharomyces Cervicie), enzymes, extraits végétaux et eau, obtenu avec un procédé exclusif MESEN Patented.

• **Ajout de l'additif :**

L'addition du symbiotique à l'alimentation des vaches s'est faite au hasard à :

- 2/3 des vaches dont le taux cellulaire est ≥ 200.000 cellules/ml
- Et 2/3 des vaches dont le taux cellulaire est inférieur à 200.000 cellules/ml

Ceci une fois par mois, se conformant ainsi à la posologie décrite de ce symbiotique, et donc une fois après les deux premiers prélèvements :

- J0 juste après le premier prélèvement de lait effectué et la réalisation du premier comptage cellulaire.
- Et J31 après le deuxième prélèvement

De ce fait, nous avons divisés notre effectif d'essai au hasard en 4 lots, afin de bien mettre en évidence l'effet du symbiotique sur la résistance aux infections mammaires dans les différentes situations.

Tableau 11 : Distribution du symbiotique (SYMBIOVEBA®) sur les 4 lots de vaches en lactation.

| Groupe | SSC | Lot | Traitement | Nombre de vaches |
|--------|--------------------------|------------|-------------|------------------|
| 1 | SCC \geq 200.000cls/ml | A (Test) | Symbiotique | 15 |
| | | B (Témoin) | Aucun | 8 |
| 2 | SCC < 200.000cls/ml | C (Test) | Symbiotique | 30 |
| | | D (Témoin) | Aucun | 15 |

Suite à cette répartition, nous avons donc constitués deux groupes au sein de cet essai :

- Etude de **l'effet curatif** du symbiotique au sein du **groupe 1** atteint de mammite initialement et divisé en lots Test (A) et Témoin (B)
- Etude de **l'effet préventif** du symbiotique au sein du **groupe 2** indemne de mammite initialement et divisé en lots Test (C) et Témoin (D)

c) Les comptages cellulaires

Ils sont effectués sur place à la ferme IBRAHIM, grâce à un appareil DeLaval Cell Counter® (Annexe 2) ; Il s'agit d'un appareil portable avec écran LCD rétro-éclairé et muni d'un clavier, qui est capable d'effectuer des comptages cellulaires sur des échantillons de lait. Le comptage est réalisé par la méthode opto-fluoro-électronique ; la lecture se fait à l'aide d'une cassette contenant un réactif. Ce réactif rend les cellules dans le lait fluorescentes permettant ainsi à l'appareil photo numérique du DCC de compter chacune des cellules une par une.

Les avantages et inconvénients du DCC sont détaillés dans le Chapitre 1 (III.5 Moyens de diagnostic des mammites)

***Technique :** On prélève par aspiration à l'aide d'une petite cassette une quantité de lait prédéfinie. On introduit la cassette dans l'appareil et le comptage s'effectue automatiquement. Au bout de quelques minutes, on peut lire la valeur du comptage cellulaire de l'échantillon (Annexe 2)

Les résultats obtenus sont affichés à l'écran du compteur. L'unité de mesure est le nombre de cellules /millilitre de lait (Cl/mL).

Les comptages cellulaires ont été réalisés durant les 3 prélèvements succincts et sur les 2 groupes constitués.

d) L'examen bactériologique

Réalisé au sein du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Salim Zemirli et ceci sur tous les prélèvements qui constituent le groupe 1 et au cours des 3 différents prélèvements.

- **Ensemencement et isolement**

A l'arrivée du prélèvement au laboratoire on ensemence une gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton par un inoculum de 50 à 60 µL de lait (Annexe 5). Ce milieu permet d'isoler la majorité des espèces bactériennes potentiellement responsables de mammites. Le milieu est ensuite placé à l'étuve à 35°C. Deux lectures sont réalisées respectivement à 24 et à 48 heures, certaines colonies ne devenant visibles qu'après 36 à 48 heures d'incubation.

En parallèle, on met en culture 1ml de lait dans un bouillon d'enrichissement cœur cervelle (Annexe 6). Ce bouillon servira si la lecture à 24 heures de la gélose Columbia s'avère négative. Ce bouillon est intéressant pour la détection des Entérobactéries qui sont inhibées par la lactoferrine du lait, l'isolement direct pouvant alors se révéler faussement négatif.

Lors de la première lecture à 24 heures, tous les types de colonies isolés sont repiqués sur une gélose Columbia de façon à obtenir une culture pure. En l'absence de croissance bactérienne visible, on repique le bouillon d'enrichissement sur une gélose Columbia au sang de mouton à 5 %.

Lors de la deuxième lecture à 48 heures, on observe l'isolement direct et la culture après enrichissement. Si on observe de nouveaux types de colonies, ils sont isolés comme précédemment.

A ce stade, la lecture de l'isolement direct terminée, on peut conclure sur la qualité du prélèvement. Tout isolement de plus de deux types de colonies doit être considéré comme contaminé. Dans notre étude nous considérons que les prélèvements avec deux types de colonies sont des infections bi-microbiennes.

Tableau 12 : Evaluation de la qualité du prélèvement (d'après COFRAC/CNEVA*)

| Nombre de types de colonies isolées | Conclusion |
|-------------------------------------|-------------------------------------------|
| 0 | Prélèvement stérile |
| 1 | Prélèvement correct |
| 2 | Contamination ou infection bi-microbienne |
| >2 | Contamination du prélèvement |

* : COFRAC/CNEVA 1996 : Pr 116/00BA 140/00, Isolement et identification des principaux germes de mammites des ruminants.

Lorsque l'isolement direct met en évidence un germe, on ne tient pas compte de l'enrichissement.

De même, dans notre étude nous considérerons comme douteux, tout résultat où aucune culture n'a été obtenue directement et où la bactérie isolée après enrichissement n'est pas une entérobactérie. Lorsqu'il n'y avait pas de culture à l'isolement direct et qu'une entérobactérie a été isolée après enrichissement, cette bactérie a été considérée comme étant responsable de la mammite. Il convient d'apporter cette précision, car le LIDAL de Seynod nous fournit toujours les résultats couplés de l'isolement direct et de l'enrichissement (NOIRETERRE, 2006). Ces résultats nécessitent une interprétation.

• Identification

L'identification du genre est effectuée par l'aspect de colonies sur gélose, la réalisation d'une coloration de Gram (Annexe 7), ainsi que la recherche de catalase (Annexe 8) pour les bactéries à Gram + et de l'oxydase (Annexe 9) pour les bactéries à Gram -.

Les Staphylocoques apparaissent ainsi comme des coques, à Gram + et catalase +. Le facteur d'affinité pour le fibrinogène ou « clumping factor » ou coagulase liée (Annexe 10), est recherché par un test rapide sur lame. La coagulase libre n'est pas détectée par ce test. A l'issue de ce test tous les germes produisant une coagulase liée sont identifiés comme *S. aureus*. Si le germe est β -hémolytique et que la recherche de la coagulase liée soit négative, la coagulase libre est recherchée par un test en tube. A l'issue de ce deuxième test, les germes répondant positivement sont définitivement identifiés comme *S. aureus*.

Tous les autres germes sont qualifiés de SCN (staphylocoques à coagulase négative). Les SCN sont alors identifiés par l'étude de 20 caractères métaboliques, fermentaires, ADH sur des galeries Api Staph® de BIOMERIEUX. Il est certain que ce schéma de détermination qualifie de *S. aureus* des staphylocoques à coagulase positive non aureus (*S. intermedius*, certaines souches de *S. hyicus*...). De plus, certains SCP ne sont pas détectés. Ainsi tous les staphylocoques coagulase positive seront identifiés comme *S. aureus* dans la suite de l'étude. L'identification des SCN au niveau de l'espèce grâce aux galeries Api Staph® est peu fiable car on utilise qu'un nombre très limité de tests (BES et al 1999).

Les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont identifiés comme des coques à Gram +, catalase - et oxydase -. On repique ensuite les colonies sur gélose par inondation. Puis l'espèce bactérienne est déterminée par la galerie Api20 Strep® qui explore 20 propriétés enzymatiques et de fermentation des germes.

Les Entérobactéries sont identifiées comme des bacilles à Gram -, catalase + et oxydase -. Ensuite l'identification du genre et de l'espèce bactérienne est réalisé grâce à la galerie Api20E®.

Pseudomonas aeruginosa est identifiée par la présence de pigments bleu-vert, une coloration de Gram négative, un test catalase +, la présence d'une oxydase. L'utilisation de la galerie Api20NE® permet de confirmer l'espèce (Annexe 12).

Les Corynébactéries sont identifiées comme des bacilles irréguliers à Gram+. Ensuite on utilise la galerie ApiCoryne®.

E. Collecte des données et analyses statistiques

Les données sont collectées sous la forme d'un tableau Excel®, qui répertorie pour chaque cas de mammite :

- le numéro d'identification de la vache, son âge, numéro du vêlage, jour de lactation, et quantité de lait produite les 7 derniers jours avant chaque prélèvement.
- les dates des 3 prélèvements (J0, J31, et J64).
- le résultat de la première bactériologie à J0 ainsi que les deux bactériologies de contrôle à J31 et J64 concernant le Groupe 1.
- les résultats des 3 comptages cellulaires à J0, J31, et J64 pour les 2 groupes 1 et 2.

L'étude présentée ici est dans un premier temps descriptive.

Les médianes de comptages cellulaires obtenues sont analysées au cours du temps à l'aide d'un test non paramétrique de Friedman au sein des deux groupes 1 et 2 séparés.

Puis les moyennes des CCSI obtenues à J64 sont comparées à l'aide d'un test non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Les analyses statistiques ont été menées grâce au logiciel statistique SPSS, et le seuil de signification est fixé à 5%.

Puis un test de χ^2 d'indépendance a été appliqué sur des tableaux de contingences des résultats de la bactériologie à J64 des deux lots A et B du groupe 1 afin de vérifier l'absence ou la présence de lien statistique entre les deux distributions.

III. Résultats

III.1. Répartition des résultats

Pendant les 4 mois de l'étude, 43 cas de mammites subcliniques ont été détectés par comptage cellulaire au sein du **groupe 1** et ont fait l'objet d'examen bactériologique ; Ils sont répartis comme suit :

- Au 1er prélèvement, 23 prélèvements positifs au SCC ont été acheminés au laboratoire
- Au 2ème prélèvement, 12 prélèvements positifs et 11 négatifs au SCC ont été acheminés au laboratoire
- Au 3^{ème} et dernier, 8 prélèvements positifs et 15 négatifs au SCC ont été acheminés au laboratoire

De ce fait, *les analyses bactériologiques* dans notre étude ne vont concerner que les prélèvements des vaches du **groupe 1**.

En ce qui concerne *les comptages cellulaires*, ils ont concernés tous les échantillons aux 3 prélèvements (J0, J31, et J64) des deux **groupes 1 et 2**.

Nous allons dans une première partie exposer les résultats bactériologiques du groupe 1 et les comptages cellulaires des deux groupes dans une seconde partie.

II.2. Résultats bactériologiques du groupe 1

Parmi les 69 prélèvements étudiés, 26 (37,68%) se sont révélés bactériologiquement négatifs et 43 (62,31%) quartiers sont infectés. 38 prélèvements (55,07%) ont permis l'isolement d'un seul germe et 31 cas d'association (44,92%) de deux ou trois germes. La prévalence réelle des mamelles atteintes d'infections mammaires en fin d'expérimentation donc à J64 est de 34,78% (8 cas positifs sur 23).

A. Bactériologie à J0

Comme nous l'avons déjà précisé, sur les 68 vaches prélevées au J0, 23 prélèvements se sont révélés au comptage cellulaire supérieurs ou égales à 200.000 Cls/mL et ont alors fait l'objet d'un examen bactériologique. Ces 23 vaches vont alors constituer le **Groupe 1**.

Parmi ces 23 prélèvements, 6 sont mono-bactériens et 17 bi-bactériens, soit 26,08% et 73,91% respectivement.

À partir du J0, ce groupe a été divisé en 2 lots : A (Test) et B (Témoin), et qui feront l'objet d'examen bactériologiques à J31 et J64.

a) Lot A

Le tableau ci-dessous fournit les résultats de la bactériologie du prélèvement à J0 c'est à dire les différents germes isolés à cette occasion et leurs fréquences.

Tableau 13: Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot A.

| Germe isolé | Nombre d'isolement | % |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|
| Acinetobacter baumannii | 1 | 3,85 |
| Citrobacter braaki | 0 | - |
| Citrobacter freundii | 0 | - |
| Escherichia coli | 6 | 23,08 |
| Enterobacter aerogenes | 1 | 3,85 |
| Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae | 1 | 3,85 |
| Panteoa spp | 2 | 7,69 |
| Panteoa spp2 | 1 | 3,85 |
| SNC | 9 | 34,62 |
| Serratia marcescens | 0 | - |
| Serratia odorifera | 1 | 3,85 |
| Staphylococcus aureus | 2 | 7,69 |
| Stenotrphomonas maltophilia | 2 | 7,69 |
| Total | 26 | 100,00% |

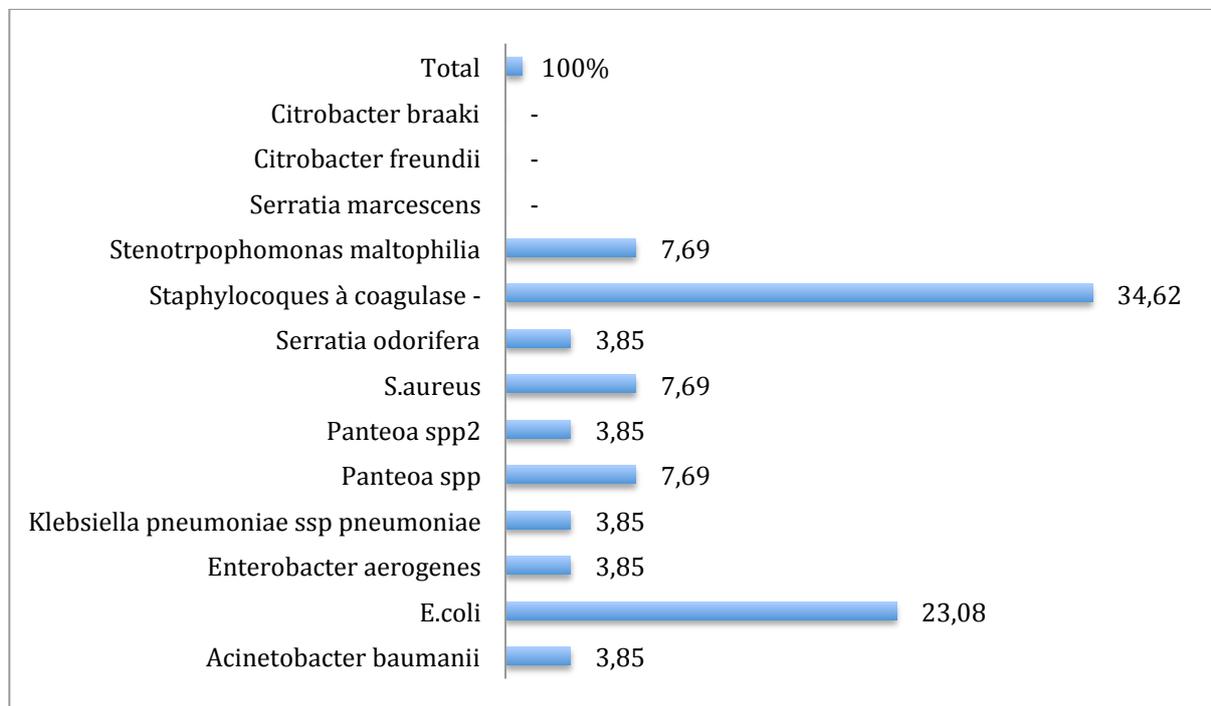


Figure 8: Fréquence des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot A.

Le groupe des Staphylocoques à coagulase négative est le type le plus souvent isolé (34,62%), ensuite vient Escherichia coli (23,08%). Ensuite arrivent Staphylococcus aureus, Stenotrophomonas maltophilia et Panteoa spp avec 7,69% de présence. Enfin on ne note qu'aucune espèce Streptococcus n'est isolée à cette étape.

Compte tenu de ces résultats le modèle épidémiologique dans l'élevage est plutôt le modèle mixte associant mammites d'environnement et mammites contagieuses par la présence d'agents pathogènes différents ; Les *SNC* et les entérobactéries représentent 57,7 % des isollements.

Enfin 11 échantillons contenaient 2 espèces bactériennes en association :

- SNC et E.coli
- SNC et Panteoa spp
- SNC et E.coli
- SNC et E.coli
- SNC et Serratia odorifera
- SNC et Panteoa spp2
- S.aureus et E.coli
- S.aureus et E.coli
- SNC et Acinetobacter baumannii
- SNC et Stenotrophomonas maltophilia
- SNC et Stenotrophomonas maltophilia

b) Lot B

Tableau 14: Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot B.

| Germe isolé | Nombre d'isolement | % |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|
| Acinetobacter baumannii | 0 | - |
| E.coli | 1 | 7,14 |
| Enterobacter aerogenes | 0 | - |
| Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae | 0 | - |
| Panteoa spp | 1 | 7,14 |
| Panteoa spp2 | 0 | - |
| S.aureus | 4 | 28,57 |
| Serratia odorifera | 1 | 7,14 |
| Staphylocoques à coagulase - | 3 | 21,43 |
| Stenotrphomonas maltophilia | 3 | 21,43 |
| Serratia marcescens | 0 | - |
| Citrobacter freundii | 1 | 7,14 |
| Citrobacter braaki | 0 | - |
| Total | 14 | 100,00% |

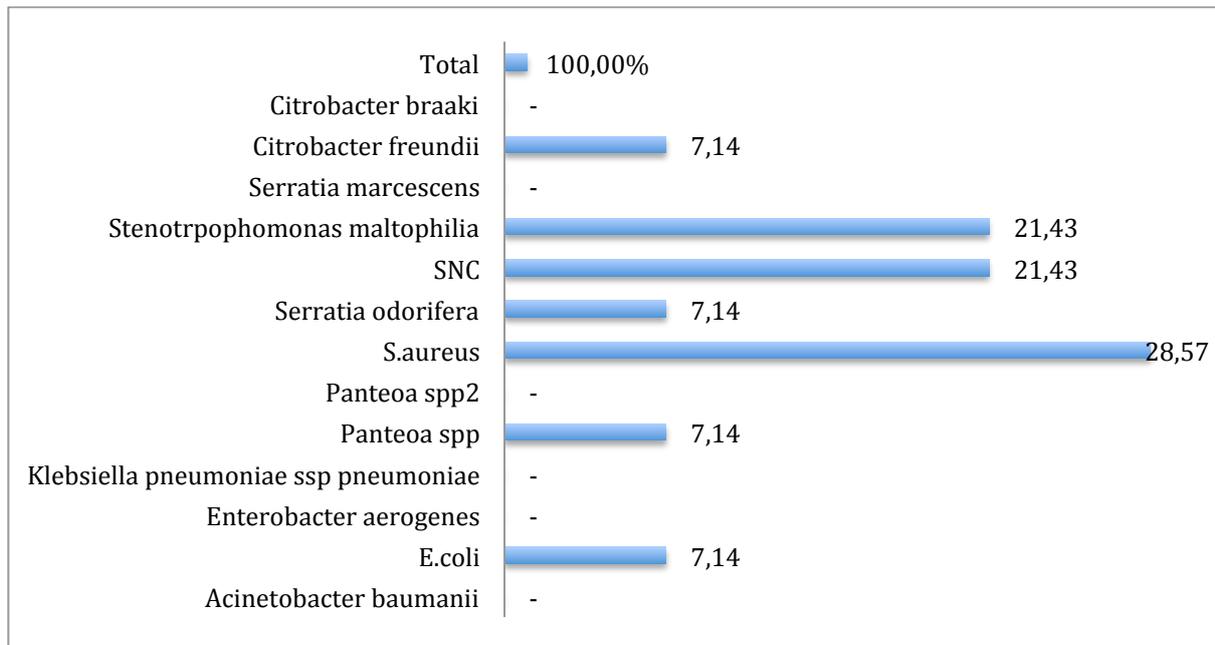


Figure 9: Fréquence des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J0, au sein du lot B.

Le *Staphylococcus aureus* est le germe le plus souvent isolé avec 28,57% ; Puis arrivent le groupe des Staphylocoques à coagulase négative et *Stenotrophomonas maltophilia* qui sont isolés à 21,43% respectivement. Enfin on ne note l'isolement d'aucune espèce *Streptococcus* à cette étape.

Enfin six échantillons contenaient 2 espèces bactériennes en association :

- SNC et *Stenotrophomonas maltophilia*
- S.aureus et E.coli
- SNC et *Serratia odorifera*
- S.aureus et *Stenotrophomonas maltophilia*
- S.aureus et *Citrobacter freundii*
- SNC et *Stenotrophomonas maltophilia*

B. Bactériologie à J31

La bactériologie a été réalisée aux 23 prélèvements initialement inclus dans le groupe1, et 12 seulement se révèlent positifs au J31 :

- 7 positifs du lot A sur 15 initialement et donc une baisse de la prévalence des cas d'infection bactérienne de 53,34%.
- 5 positifs du lot B sur 8 initialement, ce qui fait une baisse de prévalence des cas d'infection de 37,5%.

a) Lot A

Le tableau et la figure ci-dessous montrent les germes isolés et leurs fréquences à J31.

Tableau 15: Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, de mammites subcliniques à J31, au sein du lot A.

| Germe isolé | Nombre d'isolement | % |
|--------------------------------------|--------------------|---------|
| Acinetobacter baumannii | 1 | 10,00 |
| Citrobacter braaki | 0 | - |
| Citrobacter freundii | 1 | 10,00 |
| Escherichia coli | 0 | - |
| Enterobacter aerogenes | 2 | 20,00 |
| Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae | 1 | 10,00 |
| Panteoa spp | 0 | - |
| Panteoa spp2 | 1 | 10,00 |
| SNC | 0 | - |
| Serratia marcescens | 0 | - |
| Serratia odorifera | 0 | - |
| Staphylococcus aureus | 4 | 40,00 |
| Stenotrphomonas maltophilia | 0 | - |
| Total | 10 | 100,00% |

A cette étape, le S.aureus est le germe le plus isolés avec 40% ; Puis le suit Enterobacter aerogenes avec 20% de fréquence d'isolement.

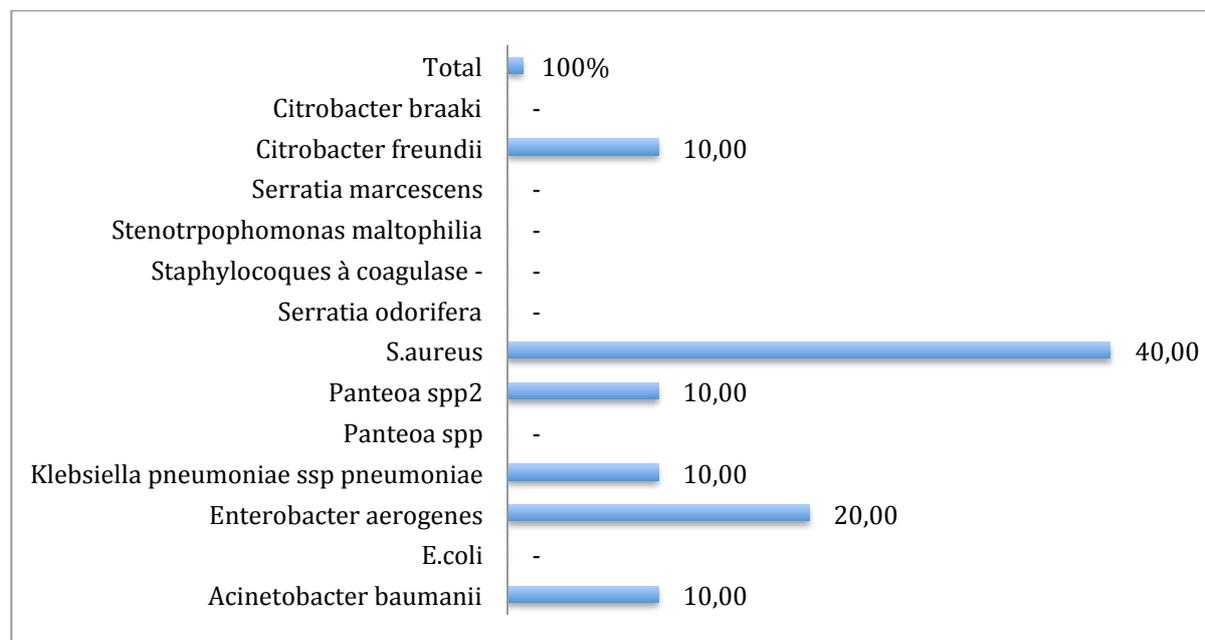


Figure 10: Fréquence des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J31, au sein du lot A.

Les associations de germes rencontrées sont :

- Staphylococcus aureus et Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae
- Staphylococcus aureus et Serratia odorifera
- Staphylococcus aureus et Pantoea spp 2 et Serratia marcescens
- Staphylococcus aureus et Stenotrophomonas maltophilia
- Staphylococcus aureus et Citrobacter freundii et Enterobacter aerogenes
- Staphylococcus aureus et Stenotrophomonas maltophilia

a) Lot B

Tableau 16: Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, de mammites subcliniques à J31, au sein du lot B.

| Germe isolé | Nombre d'isolement | % |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|
| Acinetobacter baumannii | 0 | - |
| E.coli | 0 | - |
| Enterobacter aerogenes | 0 | - |
| Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae | 0 | - |
| Panteoa spp | 0 | - |
| Panteoa spp2 | 0 | - |
| S.aureus | 3 | 33,33 |
| Serratia odorifera | 1 | 11,11 |
| Staphylocoques à coagulase - | 0 | - |
| Stenotrphomonas maltophilia | 4 | 44,44 |
| Serratia marcescens | 0 | - |
| Citrobacter freundii | 1 | 11,11 |
| Citrobacter braaki | 0 | - |
| Total | 9 | 100,00% |

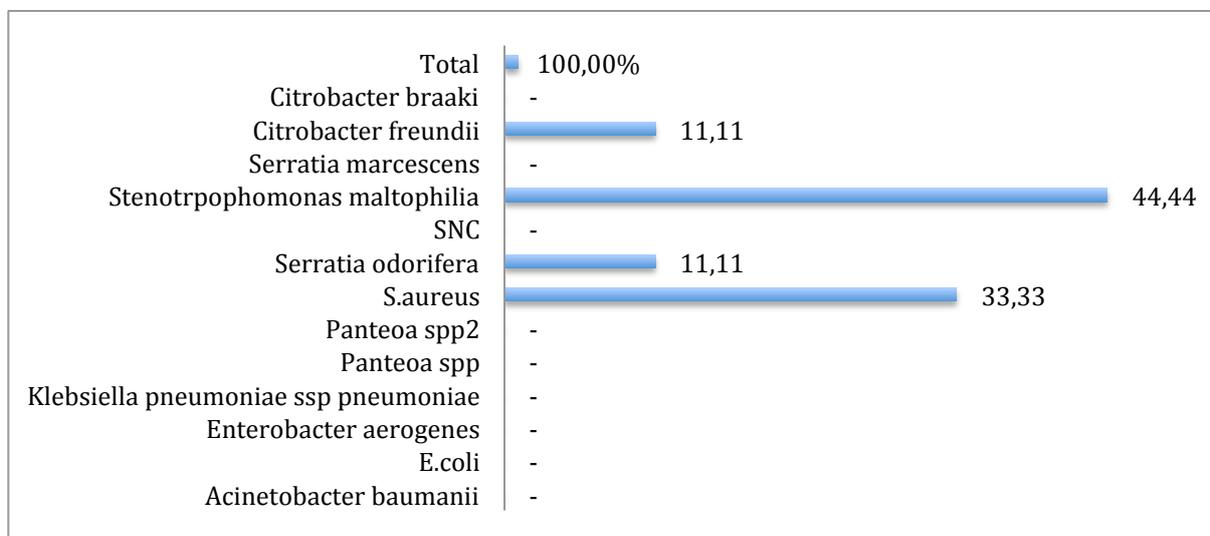


Figure 11: Fréquence des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J31, au sein du Lot B.

AJ31, *Stenotrophomonas maltophilia* est le germe le plus souvent isolé avec un pourcentage de 44,44% ; Puis arrive le *S.aureus* avec 33,33%. *Serratia odorifera* et *Citrobacter freundii* sont isolés à une fréquence de 11,11%.

Les associations bactériennes observées dans le lot B à J31, sont :

- *S.aureus/Serratia odorifera*
- *S.aureus/Stenotrophomonas maltophilia*
- *Stenotrophomonas maltophilia/Citrobacter freundii*
- *S.aureus/Stenotrophomonas maltophilia*

C. Bactériologie à J64

La bactériologie a été réalisée aux 23 prélèvements initialement inclus dans le groupe 1, et 8 seulement se révèlent positifs au J64 : 5 positifs du lot A et 3 positifs du lot B

a) Lot A

Le tableau 15 et la figure 12 montrent les germes isolés et leurs fréquences à J64.

Tableau 17: Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, de mammites subcliniques à J64, au sein du lot A.

| Germe isolé | Nombre d'isolement | % |
|---------------------------------------------|--------------------|---------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 | 14,29 |
| <i>Citrobacter braaki</i> | 1 | 14,29 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 14,29 |
| <i>Escherichia coli</i> | 0 | - |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 0 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i> | 1 | 14,29 |
| <i>Pantoea spp</i> | 0 | - |
| <i>Pantoea spp2</i> | 0 | - |
| SNC | 0 | - |
| <i>Serratia marcescens</i> | 0 | - |
| <i>Serratia odorifera</i> | 0 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0 | - |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 3 | 42,86 |
| Total | 7 | 100,00% |

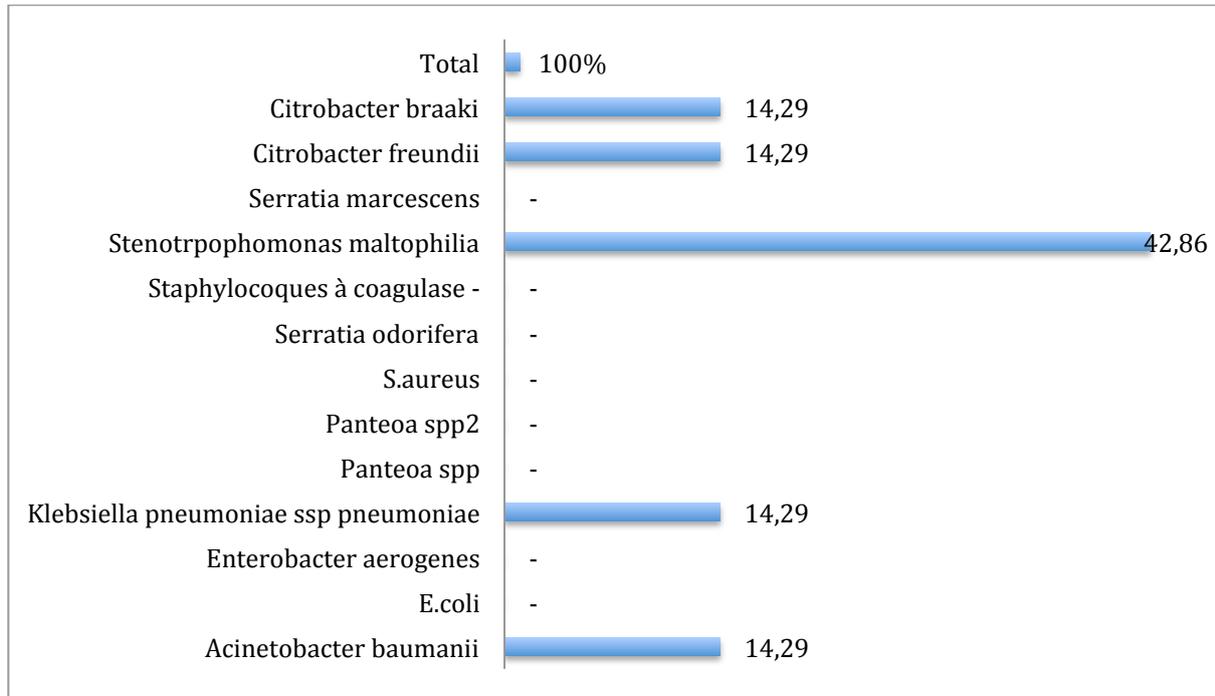


Figure 12: Fréquence des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J64, au sein du lot A.

Stenotrophomonas maltophilia est le germe le plus souvent isolé avec 42,86% de fréquence d'isolement ; Puis arrivent Acinetobacter baumannii, Citrobacter braaki, Citrobacter freundii et Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae avec 14,29% respectivement.

Les germes isolés en association sont :

- Stenotrophomonas maltophilia et Serratia odorifera
- Citrobacter braakii et Stenotrophomonas maltophilia et Acinetobacter baumannii
- Stenotrophomonas maltophilia et Acinetobacter baumannii
- Stenotrophomonas maltophilia et Citrobacter freundii

b) Lot B

Tableau 18: Répartition des différents germes isolés seuls ou en association, de mammites subcliniques à J64, au sein du lot B.

| Germe isolé | Nombre d'isolement | % |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|
| Acinetobacter baumannii | 1 | 20,00 |
| E.coli | 0 | - |
| Enterobacter aerogenes | 0 | - |
| Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae | 0 | - |
| Panteoa spp | 0 | - |
| Panteoa spp2 | 0 | - |
| S.aureus | 0 | - |
| Serratia odorifera | 1 | 20,00 |
| Staphylocoques à coagulase - | 0 | - |
| Stenotrophomonas maltophilia | 3 | 60,00 |
| Serratia marcescens | 0 | - |
| Citrobacter freundii | 0 | - |
| Citrobacter braaki | 0 | - |
| Total | 5 | 100,00% |

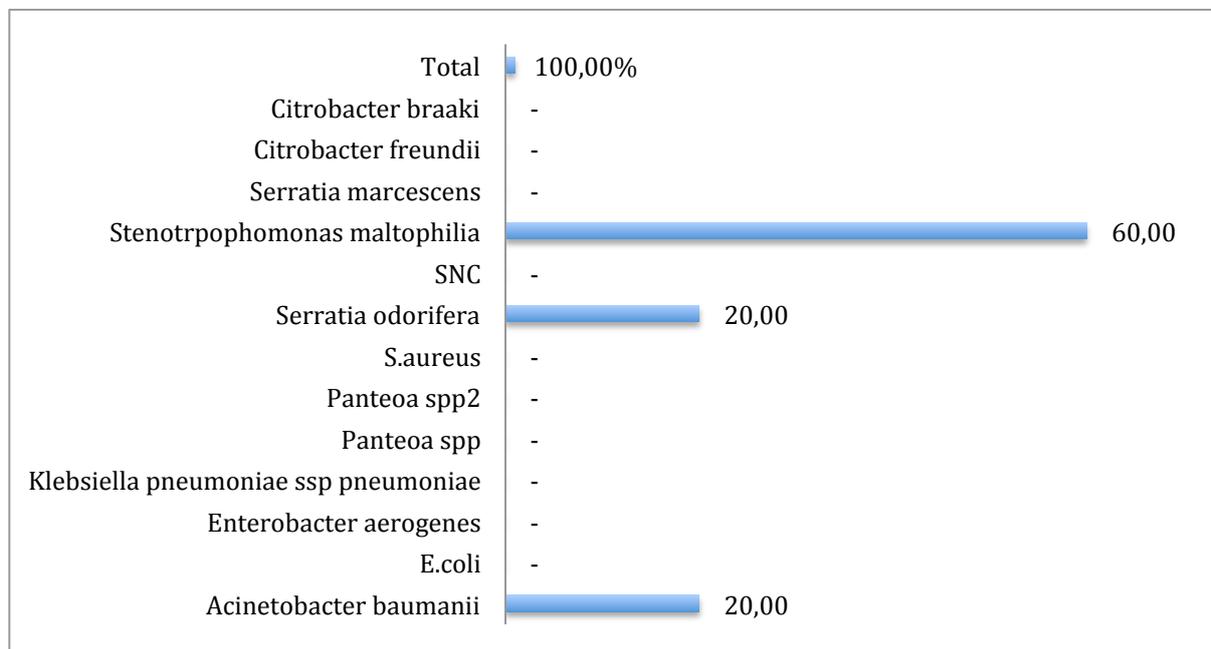


Figure 13: Fréquence des différents germes isolés seuls ou en association, lors de mammites subcliniques à J64, au sein du lot B.

Stenotrophomonas maltophilia est le plus fréquemment isolé avec 60%, Puis Serratia odorifera et Acinetobacter baumannii avec 20% respectivement.

Les germes isolés en association sont :

- Stenotrophomonas maltophilia/Serratia odorifera
- Stenotrophomonas maltophilia
- Stenotrophomonas maltophilia/Acinetobacter baumannii

D. Estimation de la guérison bactériologique des mamelles

On utilise pour faire cette estimation les 23 cas de mammites subcliniques pour lesquels on dispose des trois bactériologies et des comptages cellulaires.

Pour classer les cas en guéri/non guéri nous avons considéré trois cas de figure :

- Si la bactériologie à J64 est stérile, quel que soit le résultat de la première bactériologie la mamelle est considéré comme guéri bactériologiquement.
- Si le résultat de la bactériologie est le même à J31 et J64 qu'à J0, le quartier est non guéri, l'infection est persistante.
- Si le germe isolé à J31 et/ou J64 est différent du germe isolé à J0, le quartier est qualifié de non guéri, il y a eu une nouvelle infection.

La figure ci-dessous indique les fréquences des germes isolés à la première bactériologie pour les 23 cas analysés.

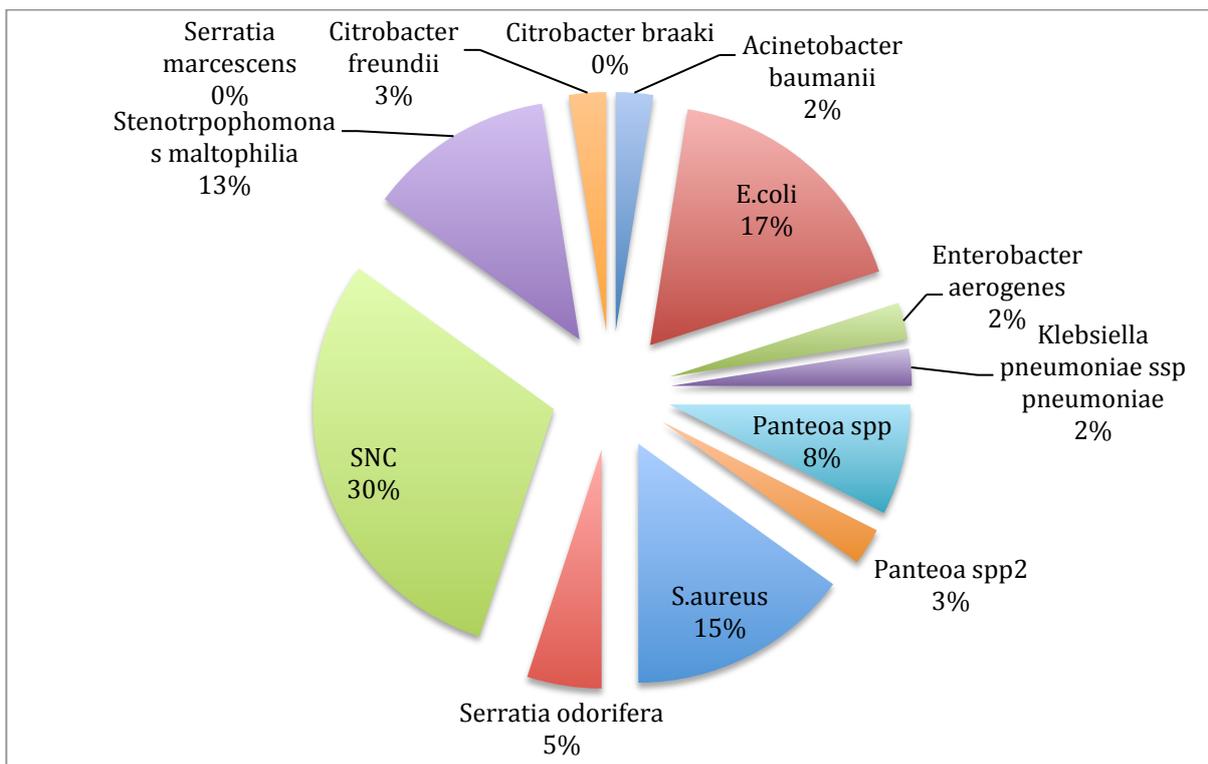


Figure 14: Résultat de la première bactériologie des 23 cas analysés.

a) Estimation de la guérison tous germes confondus

• **Lot A**

Pour les 15 cas de mammite initiaux à J0, ont été observés à J64:

- 10 guérisons
- 2 infections persistantes
- 3 nouvelles infections

On obtient donc un taux de guérison bactériologique 64 jours après la mammite de 66,66 %. Le taux de persistance des infections est de 13,33 %. Le taux de nouvelles infections entre les J64 et J0 est de 20%.

• **Lot B**

Pour les 8 cas de mammite initiaux, ont été observés à J64 :

- 5 guérisons
- 2 infections persistantes
- 1 nouvelle infection

On obtient donc un taux de guérison bactériologique 64 jours après la mammite de 62,5 %. Le taux de persistance des infections est de 25 %. Le taux de nouvelles infections entre les J64 et J0 est de 12,5%.

b) Estimation de la guérison pour les germes les plus souvent isolés

• **Lot A**

- **Staphylocoques à coagulase négative**

Neuf cas ont été analysés. Le taux de guérison bactériologique est de 100 %.

- **Escherichia coli**

Les cinq cas d'infection initiale par *E. coli* ont été analysés. Sur les cinq cas, le taux de guérison bactériologique est de 100 %.

- **Staphylococcus aureus**

Deux cas ont été analysés. Le taux de guérison bactériologique est de 100%.

- **Stenotrophomonas maltophilia**

Deux cas d'infection initiale par ce germe ont été analysés et ont révélés un taux de guérison de 100%. Trois nouvelles infections ont été constatées à J64.

- **Lot B**

- Staphylocoques à coagulase négative

Trois cas ont été analysés. Le taux de guérison bactériologique est de 100 %.

- Escherichia coli

Le seul cas d'infection initiale par *E. coli* a été analysé. Le taux de guérison bactériologique est de 100 %.

- Staphylococcus aureus

Quatre cas ont été analysés. Sur les quatre cas, le taux de guérison bactériologique est de 100%.

- Stenotrophomonas maltophilia

Trois cas d'infection initiale par ce germe ont été analysés et ont révélés un taux de persistance de l'infection de 100%, donc un taux de guérison de 0%.

III.3. Résultats des comptages cellulaires du lait

Les Concentrations Cellulaires Somatiques Individuelles (CCSI) mesurées à trois prélèvements successifs (J0, J31, et J64), sur les deux groupes 1 et 2 sont représentées ci-dessous dans le tableau 18.

Tableau 19: Résultats des comptages cellulaires individuels des trois prélèvements, concernant les deux groupes 1 et 2

| | J0 | J31 | J64 | Total |
|-----------------------------------|-----------|------------|------------|--------------|
| N SCC ≥200.000cls/ml | 23 | 12 | 8 | 43 |
| (%) SCC ≥ 200.000cls/ml | 53,48% | 27,90% | 18,60% | 100% |
| N SCC < 200.000 cls/ml | 45 | 56 | 60 | 161 |
| (%) SCC < 200.000cls/ml | 27,95% | 34,78% | 37,26% | 100% |

N : nombre, SCC : Concentrations des Cellules Somatiques du lait (Somatic Cell Count), (%) : Pourcentage

A. Groupe 1

Ci-dessous le tableau des résultats des concentration des cellules somatiques individuelles des deux lots A et B du groupe 1 ; Les cases colorées en gris correspondent aux CCSI \geq au seuil S

Tableau 20 : Résultats des CCSI du groupe 1

| Lot | Numéro de l'animal | CCSI à J0 | CCSI à J31 | CCSI à J64 |
|-------|--------------------|-----------|------------|------------|
| Lot A | 29 | 235000 | 375000 | 180000 |
| | 50 | 200000 | 5000 | 2000 |
| | 34 | 201000 | 8000 | 4000 |
| | 63 | 209000 | 13000 | 6000 |
| | 91 | 210000 | 18000 | 30000 |
| | 139 | 210000 | 21000 | 31000 |
| | 73 | 212000 | 35000 | 40000 |
| | 6 | 236000 | 36000 | 43000 |
| | 162 | 240000 | 37000 | 47000 |
| | 17 | 250000 | 40000 | 50000 |
| | 51 | 265000 | 59000 | 58000 |
| | 45 | 270000 | 143000 | 64000 |
| | 24 | 282000 | 180000 | 128000 |
| | 8 | 308000 | 209000 | 147000 |
| | 47 | 310000 | 244000 | 189000 |
| Lot B | 70 | 236000 | 421000 | 319000 |
| | 89 | 135000 | 8000 | 6000 |
| | 53 | 201000 | 269000 | 43000 |
| | 22 | 270000 | 18000 | 189000 |
| | 20 | 308000 | 491000 | 684000 |
| | 65 | 282000 | 244000 | 231000 |
| | 19 | 446000 | 180000 | 50000 |
| | 134 | 381000 | 143000 | 64000 |

a) Résultats des CCSI à J0

Initialement à J0, les deux lots du Groupe 1 avaient une CCSI supérieure ou égale à 200.000 Cls/mL

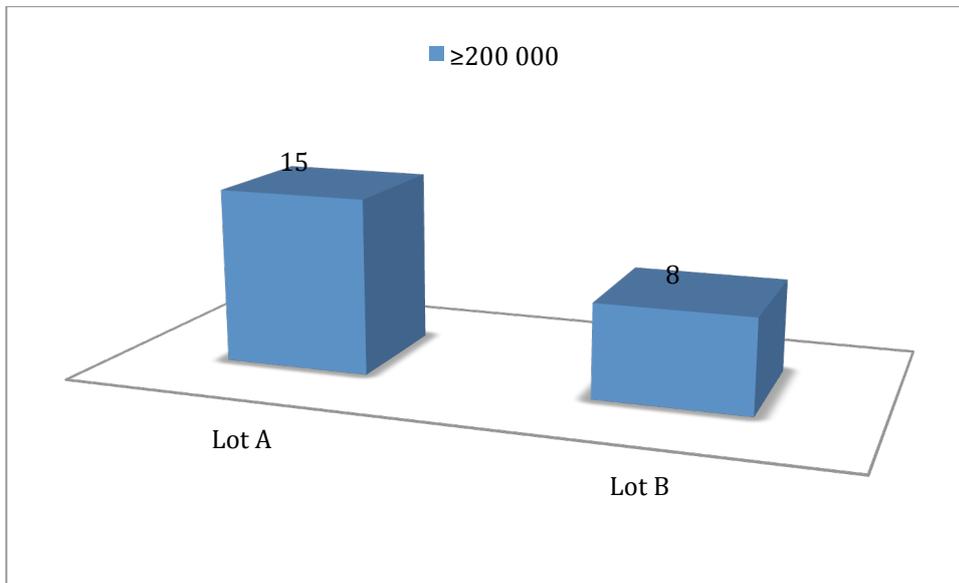


Figure 15: Répartition des CCSI au sein du groupe 1, à J0.

Tableau 21 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J0, au sein du groupe 1

| Variables | CCSI* du lot A | CCSI* du lot B |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| Q1 (premier quartile) | 209 000 | 209 750 |
| Q2 (médiane) | 236 000 | 276 000 |
| Q3 (troisième quartile) | 270 000 | 362 750 |
| Q3-Q1 (Ecart interquartile) | 61 000 | 153 000 |

* : Cls/mL

Le diagramme des quartiles de la distribution des CCSI (Tableau 19) montre que 75 % des échantillons (Q3) ont des CCSI < 270.000 Cls/mL et des CCSI < 362.750 Cls/mL au sein des lot A et B respectivement ; ainsi 25 % des échantillons (Q1) ont des CCSI < 209.000 Cls/mL et des CCSI < 209.750 Cls/mL dans les lots A et B respectivement.

La médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot A est de 236.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane ; Et la médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot B est de 276.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane.

Les valeurs observées de l'écart interquartile (Q3-Q1) des lots A et B sont respectivement de 61.000 et 153.000 Cls/mL.

b) Résultats des CCSI à J31

À **J31**, les proportions ne sont plus les mêmes qu'à J0 ; Au sein des deux lots A et B, il y'a passage de 8 et 4 CCSI respectivement, sous le seuil des 200.000 Cls/mL (sous le seuil du cas mammite)

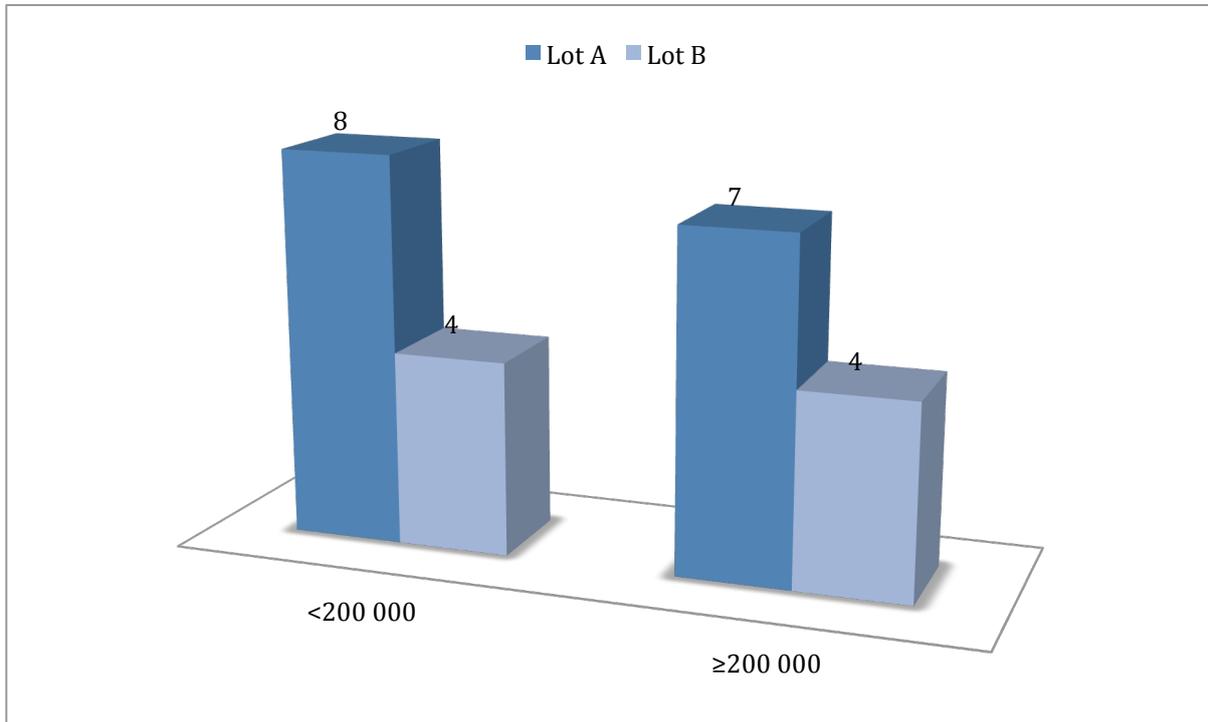


Figure 16: Répartition des CCSI au sein du groupe 1, à J31.

Le diagramme des quartiles de la distribution des CCSI (Tableau 20) montre que 75 % des échantillons (Q3) ont des CCSI < 180.000 Cls/mL et des CCSI < 383.00 Cls/mL au sein des lot A et B respectivement ; ainsi 25 % des échantillons (Q1) ont des CCSI < 18.000 Cls/mL et des CCSI < 49.250 Cls/mL dans le les lots A et B respectivement.

La médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot A est de 37.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane ; Et la médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot B est de 212.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane.

Les valeurs observées de l'écart interquartile (Q3-Q1) des les lots A et B sont respectivement de 162.000 et 333.750 Cls/mL.

Tableau 22 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J31, au sein du groupe 1

| Variables | CCSI* du lot A | CCSI* du lot B |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| Q1 (premier quartile) | 18 000 | 49 250 |
| Q2 (médiane) | 37 000 | 212 000 |
| Q3 (troisième quartile) | 180 000 | 383 000 |
| Q3-Q1 (Ecart interquartile) | 162 000 | 333 750 |

* : Cls/mL

c) Résultats des CCSI à J64

À **J64**, le passage en dessous du seuil concerne surtout le Lot A avec 3 CCSI.

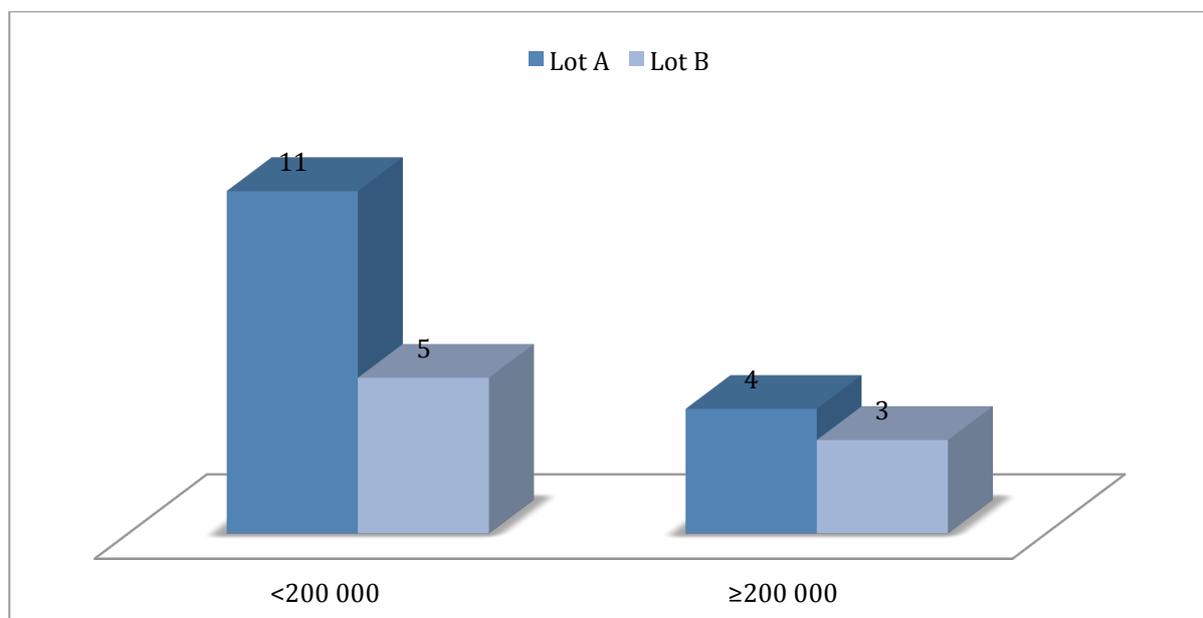


Figure 17: Répartition des CCSI au sein du groupe 1, à J64.

Tableau 23 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J64, au sein du groupe 1

| Variables | CCSI* du lot A | CCSI* du lot B |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| Q1 (premier quartile) | 30 000 | 44 750 |
| Q2 (médiane) | 47 000 | 126 500 |
| Q3 (troisième quartile) | 128 000 | 297 000 |
| Q3-Q1 (Ecart interquartile) | 98 000 | 252 250 |

* : Cls/mL

Le diagramme des quartiles de la distribution des CCSI (Tableau 21) montre que 75 % des échantillons (Q3) ont des CCSI < 128.000 Cls/mL et des CCSI < 297.000 Cls/mL au sein des lot A et B respectivement ; ainsi 25 % des échantillons (Q1) ont des CCSI < 30.000 Cls/mL et des CCSI < 44.750 Cls/mL dans les lots A et B respectivement.

La médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot A est de 47.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane ; Et la médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot B est de 126.500 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane.

Les valeurs observées de l'écart interquartile (Q3-Q1) des lots A et B sont respectivement de 98.000 et 252.250 Cls/mL.

B. Groupe 2

Les résultats des CCSI du groupe 2 sont représentés dans le tableau suivant. Les cases colorées en gris correspondent aux CCSI \geq au seuil S

Tableau 24 : Résultats des CCSI du groupe 2

| Lot | Numéro de l'animal | CCSI à J0 | CCSI à J31 | CCSI à J64 |
|-------|--------------------|-----------|------------|------------|
| Lot C | 87 | 10000 | 23000 | 7000 |
| | 118 | 42000 | 19000 | 43000 |
| | 41 | 19000 | 6000 | 9000 |
| | 102 | 9000 | 29000 | 9000 |
| | 99 | 39000 | 19000 | 4000 |
| | 84 | 10000 | 16000 | 19000 |
| | 90 | 24000 | 14000 | 6000 |
| | 127 | 20000 | 100000 | 174000 |
| | 88 | 5000 | 5000 | 8000 |
| | 141 | 40000 | 10000 | 6000 |
| | 78 | 47000 | 31000 | 92000 |
| | 10 | 19000 | 23000 | 65000 |
| | 57 | 13000 | 20000 | 58000 |
| | 163 | 15000 | 9000 | 11000 |
| | 103 | 35000 | 74000 | 63000 |
| | 112 | 14000 | 20000 | 38000 |
| | 61 | 55000 | 23000 | 114000 |
| | 72 | 3000 | 68000 | 14000 |
| | 161 | 23000 | 9000 | 20000 |
| | 35 | 36000 | 24000 | 109000 |
| | 160 | 7000 | 108000 | 150000 |
| | 64 | 26000 | 55000 | 39000 |
| | 12 | 9000 | 44000 | 10000 |
| | 80 | 116000 | 63000 | 42000 |
| | 49 | 32000 | 41000 | 34000 |
| | 4 | 70000 | 117000 | 747000 |
| | 142 | 4000 | 12000 | 401000 |
| | 40 | 50000 | 143000 | 162000 |
| 131 | 3000 | 49000 | 27000 | |
| 128 | 31000 | 42000 | 50000 | |
| | 106 | 42000 | 51000 | 4000 |
| | 42 | 25000 | 16000 | 82000 |
| | 56 | 31000 | 20000 | 100000 |
| | 71 | 28000 | 4000 | 10000 |
| | 130 | 26000 | 49000 | 114000 |
| | 26 | 12000 | 20000 | 14000 |
| | 122 | 84000 | 24000 | 30000 |

| | | | | |
|-------|-----|--------|--------|--------|
| Lot D | 144 | 11000 | 15000 | 20000 |
| | 27 | 63000 | 70000 | 41000 |
| | 7 | 105000 | 30000 | 110000 |
| | 145 | 25000 | 43000 | 45000 |
| | 138 | 22000 | 16000 | 35000 |
| | 66 | 44000 | 313000 | 111000 |
| | 2 | 6000 | 25000 | 14000 |
| | 149 | 25000 | 14000 | 20000 |

a) Résultats des CCSI à J0

Initialement à J0, les deux lots du Groupe 2 avaient une CCSI inférieure à 200.000 Cls/mL

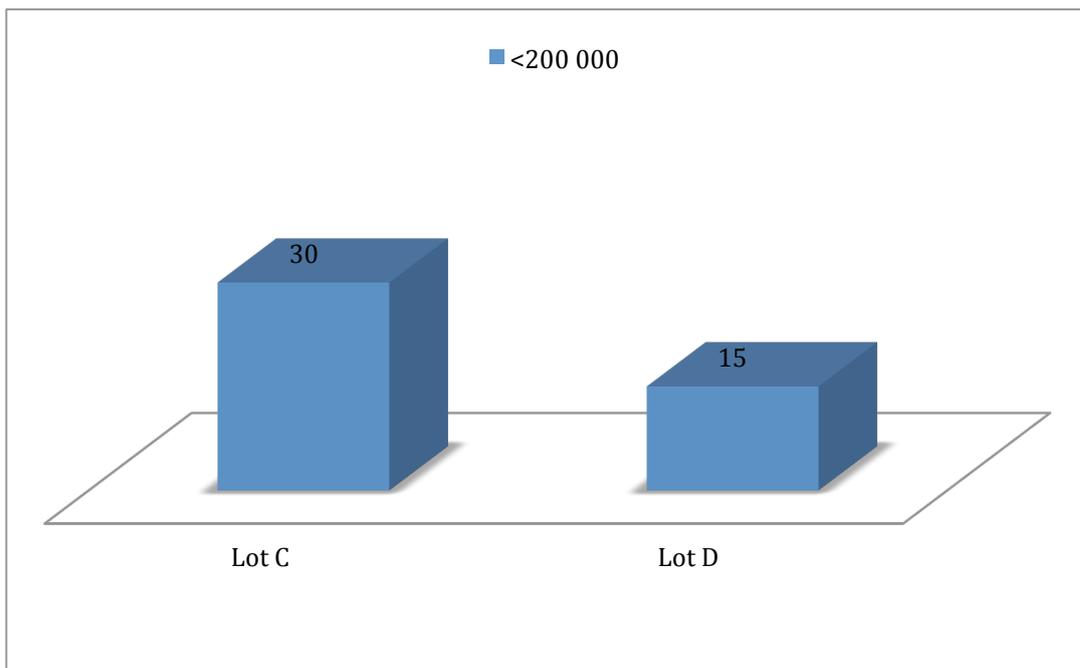


Figure 18: Répartition des CCSI au sein du groupe 2, à J0.

Tableau 25 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J0, au sein du groupe 2

| Variables | CCSI* du lot C | CCSI* du lot D |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| Q1 (premier quartile) | 9 750 | 22 000 |
| Q2 (médiane) | 21 500 | 26 000 |
| Q3 (troisième quartile) | 39 250 | 44 000 |
| Q3-Q1 (Ecart interquartile) | 29 500 | 22 000 |

* : Cls/mL

Le diagramme des quartiles de la distribution des CCSI (Tableau 22) montre que 75 % des échantillons (Q3) ont des CCSI < 39.250 Cls/mL et des CCSI < 44.000 Cls/mL au sein des lots C et D respectivement ; ainsi 25 % des échantillons (Q1) ont des CCSI < 9.750 Cls/mL et des CCSI < 22.000 Cls/mL dans les lots C et D respectivement.

La médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot C est de 21.500 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane ; Et la médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot D est de 26.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane.

Les valeurs observées de l'écart interquartile (Q3-Q1) des lots C et D sont respectivement de 29.500 et 22.000 Cls/mL.

b) Résultats des CCSI à J31

À **J31**, les proportions sont pratiquement les mêmes qu'à J0. Au sein du lot C, tous les CCSI restent sous le seuil des 200.000 Cls/mL (sous le seuil du cas mammite) ; Et dans le lot D, un seul CCSI seulement dépasse les 200.000 Cls/mL.

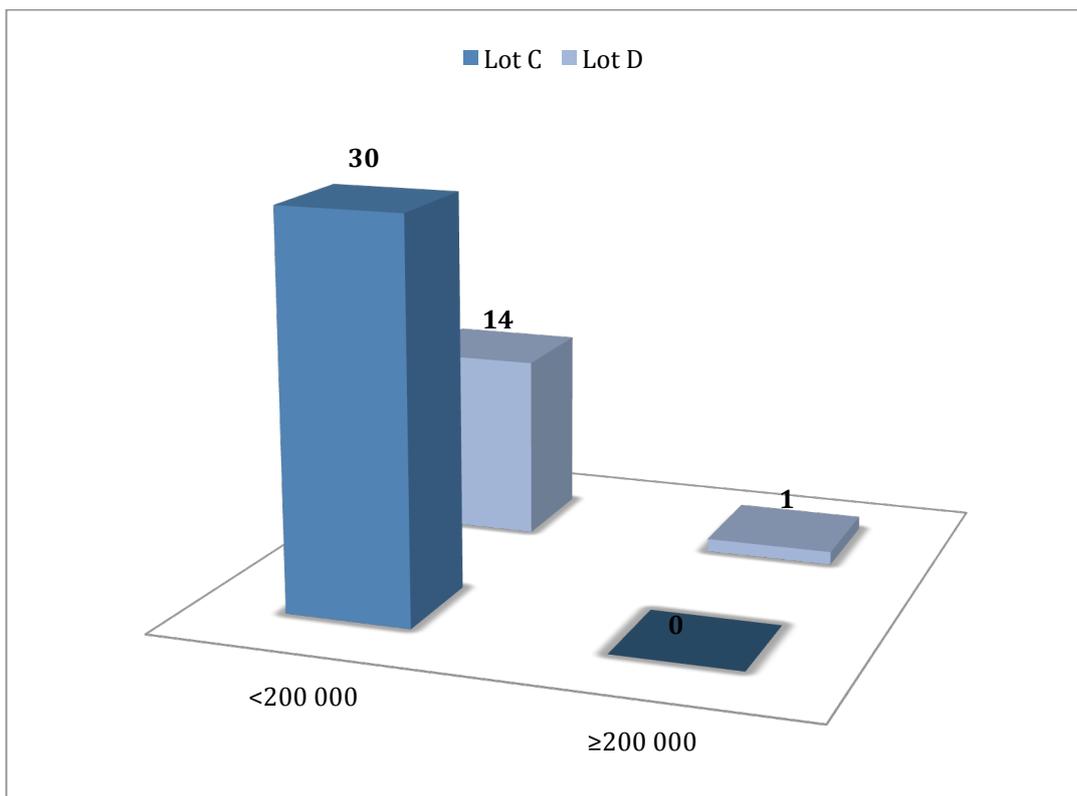


Figure 19: Répartition des CCSI au sein du groupe 2, à J31.

Tableau 26 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J31, au sein du groupe 2

| Variables | CCSI* du lot | |
|-----------------------------|--------------|----------------|
| | C | CCSI* du lot D |
| Q1 (premier quartile) | 15 500 | 16 000 |
| Q2 (médiane) | 23 500 | 24 000 |
| Q3 (troisième quartile) | 57 000 | 49 000 |
| Q3-Q1 (Ecart interquartile) | 41 500 | 33 000 |

* : Cls/mL

Le diagramme des quartiles de la distribution des CCSI (Tableau 23) montre que 75 % des échantillons (Q3) ont des CCSI < 57.000 Cls/mL et des CCSI < 49.000 Cls/mL au sein des lots C et D respectivement ; ainsi 25 % des échantillons (Q1) ont des CCSI < 15.500 Cls/mL et des CCSI < 16.000 Cls/mL dans les lots C et D respectivement.

La médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot C est de 23.500 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane ; Et la médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot D est de 24.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane.

Les valeurs observées de l'écart interquartile (Q3-Q1) des lots C et D sont respectivement de 41.500 et 33.000 Cls/mL.

c) Résultats des CCSI à J64

À **J64**, le passage en dessous du seuil concerne seulement 2 CCSI du Lot C.

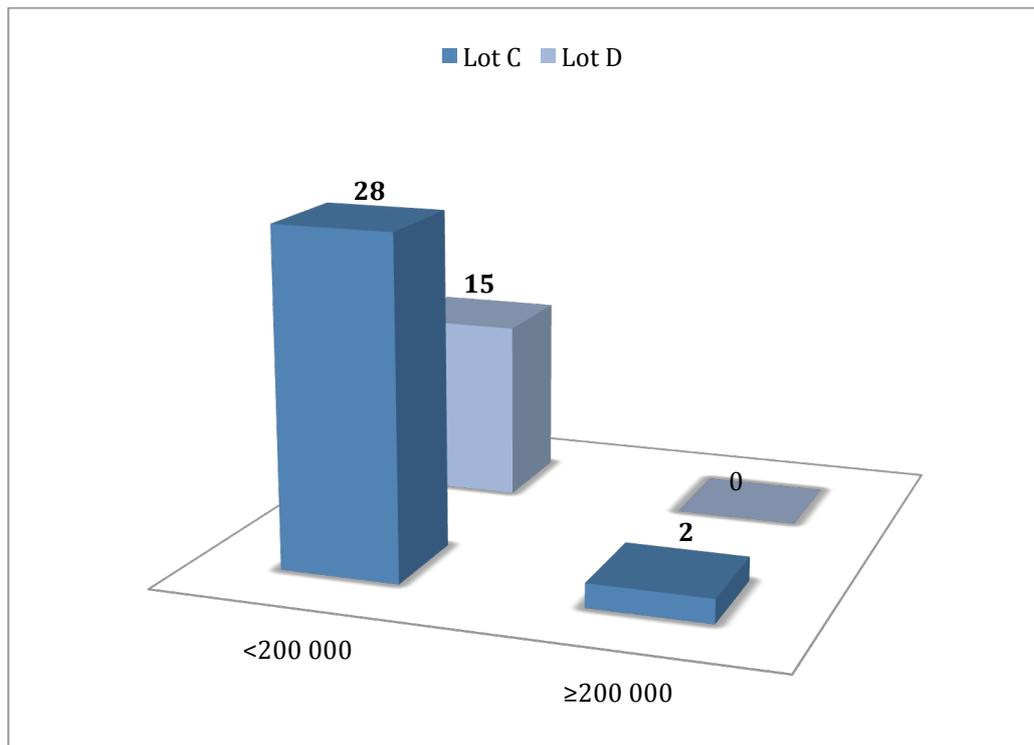


Figure 20: Répartition des CCSI au sein du groupe 2, à J64.

Tableau 27 : Diagramme des Quartiles des CCSI à J64, au sein du groupe 2

| Variables | CCSI* du lot C | CCSI* du lot D |
|-----------------------------|----------------|----------------|
| Q1 (premier quartile) | 9 750 | 14 000 |
| Q2 (médiane) | 38 500 | 35 000 |
| Q3 (troisième quartile) | 96 250 | 100 000 |
| Q3-Q1 (Ecart interquartile) | 86 500 | 86 000 |

* : Cls/mL

Le diagramme des quartiles de la distribution des CCSI (Tableau 24) montre que 75 % des échantillons (Q3) ont des CCSI < 96.250 Cls/mL et des CCSI < 100.000 Cls/mL au sein des lot C et D respectivement ; ainsi 25 % des échantillons (Q1) ont des CCSI < 9.750 Cls/mL et des CCSI < 14.000 Cls/mL dans les lots C et D respectivement.

La médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot C est de 38.500 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane ; Et la médiane (Q2) de la distribution des CCSI du lot D est de 35.000 Cls/mL, donc 50 % des échantillons ont des CCSI inférieurs à cette valeur médiane.

Les valeurs observées de l'écart interquartile (Q3-Q1) des lots A et B sont respectivement de 86.500 et 86.000 Cls/mL.

III.4. Analyse statistique

A. Suivi des comptages cellulaires dans le temps

Le but du suivi des comptages dans le temps est d'évaluer l'évolution positive qu'elle soit ou négative des CCSI au sein de chaque groupe ; Pour ainsi évaluer l'apport bénéfique ou non du SYMBIOVEBA® sur :

- La guérison de vaches atteintes de mammites subcliniques initialement (Groupe 1)
- Et sur la prévention d'apparition de mammites subcliniques sur des vaches saines (Groupe2)

a) Groupe 1

Au sein du groupe 1, notre analyse concerne le lot A qui regroupe quinze vaches atteintes de mammites subcliniques et qui ont reçue après chaque prélèvement une dose du symbiotique.

D'après le Tableau 19 ci-dessous, la moyenne des CCSI à J0 était de 235.866,66 Cls/mL puis elle est descendue à 67.933,33 Cls/mL à J64.

Tableau 28 : Tableau des statistiques descriptives du CCSI du lot A, au cours du temps

| Variable | Observations | Minimum | Maximum | Moyenne | Ecart-type |
|----------|--------------|------------|------------|------------|------------|
| J0 | 15 | 135000,000 | 310000,000 | 235866,667 | 46570,786 |
| J31 | 15 | 5000,000 | 375000,000 | 94866,667 | 110740,925 |
| J64 | 15 | 2000,000 | 189000,000 | 67933,333 | 62349,781 |

Tableau 29 : Analyse statistique de la variation des CCSI du lot A, au cours du temps

| | |
|-----------------------|--------|
| Q (Valeur observée) | 17,200 |
| Q (Valeur critique) | 5,991 |
| DDL | 2 |
| p-value (unilatérale) | 0,000 |
| alpha | 0,05 |

DDL : Degrés de liberté

Les résultats consignés dans le Tableau 20, révèlent que la structure des distributions des CCSI a significativement ($p < 0,02$) changé au cours du temps en s'améliorant c'est à dire en diminuant, ce qui pourrait suggérer un effet bénéfique du symbiotique sur les CCSI et par

extrapolation sur la guérison de cas de mammites subcliniques (passage au-dessus du seuil mammite)

b) Groupe 2

Au sein du groupe 2, notre analyse concerne le lot C qui regroupe trente vaches indemnes de mammites subcliniques initialement et qui ont reçue après chaque prélèvement une dose du symbiotique.

Tableau 30 : Tableau des statistiques descriptives du CCSI du lot C, au cours du temps

| Variable | Observations | Minimum | Maximum | Moyenne | Ecart-type |
|----------|--------------|----------|------------|-----------|------------|
| J0 | 30 | 3000,000 | 116000,000 | 27533,333 | 23998,180 |
| J31 | 30 | 5000,000 | 143000,000 | 40533,333 | 36101,135 |
| J64 | 30 | 4000,000 | 747000,000 | 84366,667 | 148753,553 |

Le tableau 21 ci-dessus montre que la moyenne des CCSI à J0 était de 27.533,33 Cls/mL puis elle est arrivée à 84.366,33 Cls/mL à J64 ; Mais elle reste en dessous du seuil mammite.

Tableau 31 : Analyse statistique de la variation des CCSI du lot C au cours du temps

| | |
|-----------------------|-------|
| Q (Valeur observée) | 6,458 |
| Q (Valeur critique) | 5,991 |
| DDL | 2 |
| p-value (unilatérale) | 0,040 |
| alpha | 0,05 |

D'après le tableau 22, il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre la structure des distributions des CCSI au cours du temps, mais ce changement n'étant pas positif nous ne pouvant conclure un effet préventif du symbiotique vis à vis des mammites subcliniques.

B. Situation des CCSI à J64 : évaluation de l'effet du symbiotique

a) Groupe 1

Au sein du groupe 1, il s'agit de l'analyse des taux de guérison à J64 ; Les proportions de mamelles considérées guéries par rapport aux non guéries à J64, sont représentées dans le tableau de contingence ci-dessous :

Tableau 32 : Situation des CCSI du groupe 1 à J64.

| | <S | ≥S |
|-------|----|----|
| Lot A | 15 | 0 |
| Lot B | 5 | 3 |

L'analyse statistique du tableau de contingence précédent relève une différence significative ($p < 0,05$) entre les deux distributions des valeurs de CCSI à J64 (Tableau), et donc nous pouvons conclure que le SYMBIOVEBA a un effet curatif sur les vaches en lactations atteintes de mammites subcliniques.

Tableau 33 : Analyse statistique de la variation des CCSI à J64, au sein du groupe 1

| | |
|-----------------------|---------|
| U | 32,500 |
| U (normalisé) | 0,000 |
| Espérance | 60,000 |
| Variance (U) | 239,407 |
| p-value (unilatérale) | 0,039 |
| alpha | 0,05 |

b) Groupe 2

Au sein du groupe 2, il s'agit de l'analyse de l'effet préventif du symbiotique vis à vis de mammites subcliniques ; Les proportions de mamelles considérées infectées ou non à J64, sont représentées dans le tableau de contingence ci-dessous :

Tableau 34 : Situation des CCSI du groupe 2 à J64.

| | <S | ≥S |
|--------------|--------------|-----------|
| Lot C | 28 | 2 |
| Lot D | 15 | 0 |

Tableau 35 : Analyse statistique de la variation des CCSI à J64, au sein du groupe 2

| | |
|-----------------------|----------|
| U | 221,500 |
| U (normalisé) | -0,072 |
| Espérance | 225,000 |
| Variance (U) | 1723,523 |
| p-value (unilatérale) | 0,471 |
| alpha | 0,05 |

Une analyse statistique appliquée au tableau de contingence n°, montre un $p > 0,05$ et donc supérieur au taux de signification admis dans la présente étude. En conclusion, notre expérimentation n'offre pas les arguments suffisants pour conclure de l'effet préventif du SYMBIOVEBA® vis à vis des mammites subcliniques.

C. Analyses des taux de guérison bactériologique à J64

Cette analyse concerne les résultats bactériologiques du groupe 1 à J64. Le taux de guérison moyen par vache est de 65,21% ; Plus spécialement 66,66% de taux de guérison au sein du lot A et 62,5% au sein du lot B. Comparons les résultats entre les 2 lots à l'aide d'un tableau de contingence qui représente le nombre de vaches guéries et non guéries selon le lot (Tableau) auquel on appliquera le test du khi deux ($p=0,84$).

Tableau 36 : Répartition des guérisons à l'échelle de l'animal

| | Guéries | Non guéries |
|--------------|----------------|--------------------|
| Lot A | 10 | 5 |
| Lot B | 5 | 3 |

Il n'y a pas de différence significative ($p>0,05$) entre les 2 lots au niveau des taux de guérison bactériologique par vache. Ce qui fait que sur le plan bactériologique, nous ne pouvons affirmer l'effet curatif de SYMBIOVEBA sur les vaches atteintes de mammites subcliniques.

Tableau 37 : Analyse statistique du taux de guérison bactériologique à J64, au sein du groupe 1

| | |
|------------------------------------|-------|
| Khi ² (Valeur observée) | 0,040 |
| Khi ² (Valeur critique) | 3,841 |
| DDL | 1 |
| p-value | 0,842 |
| alpha | 0,05 |

IV. Discussion

En Algérie, plusieurs études ont été menés sur la prévalence des mammites subcliniques et des principales bactéries responsables de mammites subcliniques en élevage bovin (Bouaziz, 2005 ; Boufaïda Asnour et al., 2012 ; SAIDI et al., 2013)

Dans des pays étrangers, la supplémentation alimentaire en additifs afin de guérir des vaches en lactation ou prévenir une éventuelle infection a concerné quelques probiotiques (Bouchard, 2013) ; Ceci a été également étudié chez la femme atteinte de mammites (Jiménez et al., 2008) (Arroyo et al., 2010).

Cependant à ce jour, les études sur la supplémentation en symbiotique n'a pas été exploré sur tous les plans mise à part les récentes études sur l'aspect épidémiologique des mammites dans le cadre de l'utilisation d'un symbiotique (au sein de l'ENSV); Encore moins, l'étude de quelques paramètres indicateurs des l'état de l'immunité locale de la mamelle, et de l'effet d'un symbiotique sur la réponse immunitaire locale lors d'infection subclinique ou non.

Avant de faire l'analyse des résultats obtenus dans cette étude, il nous paraît nécessaire de discuter le protocole général de notre expérimentation, afin de faire ressortir ses avantages et ses limites.

IV. 1. Méthode d'échantillonnage

A. Choix de la ferme

La ferme IBRAHIM a été choisie en premier lieu, du fait de la coopération de ses gérants, de son vétérinaire et de ses techniciens ; C'est également une ferme vouée à la production laitière avec des vaches de race haute productrice laitière et utilisant des techniques modernes de production laitière.

B. Choix des bovins à prélever et effectif

Le choix des bovins à prélever s'est fait de manière aléatoire mais ceci après mise à l'écart de dix vaches non aptes à l'expérimentation (sous traitement, malade..); À partir de là, la constitution des lots et groupes expérimentaux s'est faite au hasard.

Les lots constitués au sein de chaque groupe sont homogènes vis à vis de la race et de l'état infectieux de la mamelle, vu que le premier n'est constitué initialement que de vaches atteintes de mammites subcliniques et le deuxième de vaches initialement indemnes de mammites.

La puissance de notre essai, avec des effectifs aussi petits est extrêmement faible. Et un effectif plus important pouvait montrer une différence significative dans l'efficacité curative et préventive du symbiotique sur le plan bactériologique.

Avant de démarrer l'expérimentation, il aura fallu faire un calcul d'effectif afin de s'assurer d'une puissance suffisante. Notre étude n'a qu'un objectif préliminaire qui devra être complété par la suite par une expérimentation concernant un effectif plus important.

IV.2. Outils diagnostiques et critères d'évaluation

A. Utilisation des CCSI

Les CCS sont des marqueurs des mammites sub-cliniques, ils nous est apparu indiqué de mesurer l'influence du SYMBIOVEBA® en particulier, sur ce critère du fait que ça soit révélateur de toute modification du nombre des cellules de l'immunité locale au niveau de la mamelle. Cette démarche nous paraît intéressante malgré les imperfections du CCS.

Le comptage cellulaire individuel (CCSI), comme celui de Tank, constitue la base du dépistage de la mammite dans les exploitations laitières depuis de nombreuses années et représente un outil de valeur inestimable. Dans les pays européens adhérant au contrôle laitier, les cellules du lait de chaque vache sont dénombrées mensuellement dans tous les élevages, et ces données sont disponibles chez les éleveurs (SHYAKA, 2007).

Plusieurs études ont cherché à déterminer une valeur seuil pour le taux cellulaire correspondant à une forte probabilité d'infection (Badinand, 2003). Le seuil significatif que nous avons retenu pour notre étude est de 200 000 cellules par ml car il a été défini après un travail de synthèse réalisé par Boutet et collaborateurs en 2006.

Tous les auteurs s'accordent pour dire que quand on augmente la valeur seuil utilisée, la sensibilité diminue alors que la spécificité du test augmente. Ainsi SCHEPERS a testé différents seuils sur 22 467 prélèvements de lait de quartiers :

Tableau 38 : Sensibilité et spécificité pour trois valeurs seuils possibles (d'après SCHEPERS et al 1997 ; Depuis NOIRETERRE, 2006)

| Valeur seuil | Sensibilité | Spécificité |
|-----------------|-------------|-------------|
| 100 000 cell/mL | 83.2 | 80.5 |
| 200 000 cell/mL | 74.5 | 89.6 |
| 400 000 cell/mL | 60.8 | 95.0 |

B. Validité des résultats des CCS

Selon le National Mastitis Council, il est indiqué de faire 3 prélèvements de suite et d'analyser les 3 séparément afin d'obtenir un résultat plus fiable (ALEXANDRE, 2005), et ceci constitue un point fort pour notre étude vu l'analyse faite sur 3 prélèvements successifs.

C. Méthode d'ensemencement, d'isolement et d'identification

Tous les échantillons ont été préalablement ensemencés sur une gélose Columbia enrichie au sang frais de mouton (5- 10%). Ce milieu permet :

- L'isolement de la plupart des germes exigeants
- De juger de l'activité hémolytique des colonies qui y poussent.

L'identification a été faite grâce aux galeries API de BioMerieux. L'identification par ces galeries est rapide et facile d'utilisation. Cette méthode permet l'étude de 20 caractères biochimiques en réactions groupées. Cependant, certains auteurs considèrent peu fiable l'identification de l'espèce par ce système, à cause du nombre limité de test (BES et al., 2000).

IV.3. Prévalence des mammites subcliniques

Dans la présente étude, la prévalence initiale des vaches atteintes de mammites subcliniques était de 33,82%. Boufaïda Asnoune et collaborateur ont décelé à l'aide du CMT, une prévalence de mammites subcliniques de 79%. Dans une étude sur l'évaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien, la prévalence de mammites à partir de laits individuels était de 47% et de 76% sur les laits de mélange (Aggad et al., 2009).

Une étude plus récente portant sur la fréquence d'occurrence des mammites subcliniques, montre une prévalence de 28,77% de quartiers atteints décelés par CMT (SAIDI et al., 2013) ; Cette prévalence est proche de la notre qui est de 33,82% sur lait de mélange des quatre quartiers.

Dans la littérature, la prévalence des vaches atteintes de mammites subcliniques variait de 17% (Pluvinage et al., 1991) à 78% (Tuteja et al., 1993a). Dans les autres études, la fréquence des mammites subcliniques était de 64% en Inde (Saxena et al., 1993), 62% en Ethiopie (Dege et Tareke, 2003), 56% en Jamaïque (Zingesser et al., 1991), 52% en Uruguay (Giannechini et al., 2002), 45% en Trinidad (Romain et al., 2000) et 34% en Tunisie (M'SADAK et al., 2014).

Les données relatives à la prévalence des mammites subcliniques varient d'une étude à une autre. Cette variation pourrait être attribuée à l'utilisation de différentes méthodes de diagnostic des mammites subcliniques (examen bactériologique, test de la concentration cellulaire somatique, CMT) et à la définition de l'infection (cas mammité) qui est variable selon les auteurs (Eberhart et al., 1987).

Dans notre étude nous avons utilisé le comptage cellulaire, cette technique présente l'avantage d'être plus spécifique que les autres, la comparaison entre le comptage cellulaire et les techniques bactériologiques nous donnent des résultats satisfaisants (de concordance entre 28,4 et 98,6% selon Sargeant et al. 2001).

IV.4. Analyse bactériologique

A. Analyse des résultats bactériologiques à J0

Nous avons eu une fréquence de 69,56% d'associations de deux germes contre 32,5% rapportés par (SAIDI et al., 2013) ; Ainsi que 30,43% de prélèvements révélées monobactériens contre 57,5% depuis SAIDI et collaborateurs.

Dans la présente étude, les résultats bactériologiques placent les **Staphylocoques à coagulase négative** comme le groupe d'agents étiologiques les plus fréquents en matière de

mammites subcliniques. En effet, ils ont été isolés dans 30% des cas, ce qui s'explique par leur rôle pathogène connu dans les mammites subcliniques (BEN HASSEN et al., 2003). La place de ces germes est variable d'une étude à une autre: 21% (NOIRETERRE, 2006), 33% (DUREL et al., 2003), 25,9% (Bouaziz, 2005), 41 % pour (Fabre et al., 1997), 51% (Bussato et al., 2000)

Le nombre élevé de SNC isolé dans cette exploitation serait peut être dû aux mauvaises conditions d'hygiène de la traite. Plusieurs travaux ont montré que l'application d'une désinfection des trayons après la traite contribue à la diminution de la prévalence de SCN (Todhunter et al., 1993).

En deuxième position, **Escherichia coli** avec une fréquence de 17,50%, relativement plus élevée que celle rapportée dans la littérature lors de mammite subclinique. En effet, la fréquence de ce germe varie de 2% (Fabre et al., 1997 ; Saddek et al., 1998) à 7% (Longo et al., 1994). Ce germe est plutôt à l'origine de mammites cliniques. Le mauvais entretien de la litière, la mauvaise hygiène de la stabulation et des animaux en général pourrait expliquer la fréquence élevée d'*Escherichia coli* isolé dans cette étude.

Nous avons isolés le **Staphylococcus aureus** avec un taux de 15%, cette valeur est inférieure à celle de Saidi et collaborateur (40%) et de Bouaziz (30,9%). Ce résultat se rapproche un peu des fréquences rapportées dans différents pays par divers auteurs : en France 29,0% pour Fabre et al. (1997b), En Egypte 29,1% pour Seddek et al. (1999), au Zimbabwe 34,2% pour Kuddinha et al. (2002). Cette fréquence d'isolement relativement importante du *S.aureus* s'expliquerait amplement par le fait que ça soit un pathogène majeur de mammites en général.

Pour les autres **entérobactéries**, nous avons isolés 22,50%, ce qui représente un taux semblable à ceux observés par (Noireterre, 2006) et (Fallet, 1999) et (Manner, 2001) qui sont respectivement de 22,6%, 23,7% et 25,3%.

Nous avons pu isoler un taux de 29,43% de *Stenotrophomonas maltophilia*.
Aucun isolement de streptocoques n'a été enregistré.

Notre étude permet ne permet pas de caractériser un type précis de mammite principalement rencontré à la ferme IBRAHIM ni de modèle épidémiologique mais nous avons plutôt une association des deux modèles : contagieux et environnemental.

B. Analyse des résultats bactériologiques à J64

Dans notre étude, le taux de guérison bactériologique du groupe 1 à J64 est de 65,21% ; Avec 66,66% et 62,5% respectivement pour les lots A et B. Lescut (1999) et Schultze (1983) ont rapportés des résultats semblables avec des taux de 61% et 68% respectivement.

ALLAIRE et al. dans une étude portant sur l'efficacité du Cepravin® et utilisant la bactériologie comme outil diagnostique, trouvent un taux de guérison de 88%. Ce sont des résultats supérieurs aux nôtres.

De même, ALEXANDRE rapporte en 2005 des taux de guérison bactériologique de 86% pour le Cepravin® et de 75% pour le Vonapen®.

L'analyse des résultats nous montre que le taux de guérison des infections à staphylocoques

est de 100%. Ce résultat est supérieur avec ceux rapportés par différents auteurs qui ont expérimentés des antibiotiques : 78% pour Laval et al. (1991), 76,9% pour Charpiat (2003). Des taux de guérison se rapprochant à celui obtenu dans notre étude ont été signalés : 85% (Cummins et McCCasey, 1987), 88% (Allaire, 1990) et 93% (Stephan et al., 1984).

D'une façon générale, les différentes études rapportent des taux de guérison variables vis à vis des Staphylocoques. Ceci s'explique par le fait que *Staphylococcus aureus* peut avoir une localisation intracellulaire et de ce fait s'enkyster dans le parenchyme, ce qui fait que le contact, antibiotique-germe, ne peut pas toujours se produire convenablement (Bousquet-Mélou, 2003).

Mais ceci n'a pas empêché d'avoir de meilleurs résultats dans notre étude forcément du fait de la composition du SYMBIOVEBA®. En effet, les lactobacilles ont été testés in vitro et ont montrés une aptitude à produire des composants comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et des bactériocines à activité anti-microbienne (Charlier et al., 2009; Nader-Macias et al., 2008b). Par conséquent, une infusion intra-mammaire de bactériocine produite par *Lactococcus lactis* a prouvé son efficacité comme une injection antibiotique classique (Crispie et al., 2008; Klostermann et al., 2008).

Les taux de guérison des SNC a été de 100% dans notre étude. DJURICIC et al. (2014) rapportent 61,29% de guérison pour les SNC.

Les entérobactéries ont montrés un taux de guérison de 91,66%, valeur comparables à celle de DJURICIC et al. (2014) qui est de 91,17% suite à une injection intramammaire d'antibiotique durant la lactation.

IV.5. Impact sur les comptages cellulaires somatiques

Pour analyser l'activité du SYMBIOVEBA® par le biais de son effet sur les CCSI, nous pouvons comparer les résultats obtenus à ceux d'autres études utilisant des probiotiques ou même des antibiotiques vu que le but est de rechercher une activité curative et préventive similaires aux antibiotiques afin de faire régresser leur utilisation et par ceci pallier au problèmes d'antibio-résistances très fréquents au niveau des élevages. Il faut garder à l'esprit que dans notre étude l'effectif est faible et que toute conclusion peut être biaisée par cet état de fait.

A. Activité curative

Celle-ci se définit par une CCSI inférieure au seuil de guérison (S). La guérison est dite complète si la mamelle assainie garde une CCSI < S à J64 (Tableau)

Le taux de guérison tous germes confondus est de 86,95% au sein du groupe 1 ; Elle est de 100% dans le lot A de vaches recevant le SYMBIOVEBA® et de 62,5% au sein du lot B de vaches ne recevant pas le symbiotique. La différence entre les deux taux de guérison a été significative concluant de l'effet curatif vrai du symbiotique utilisé.

Le SYMBIOVEBA® dans notre étude présente une activité curative tout à fait comparable à celle d'autre produit rapportée par divers auteurs : 89 % de quartiers traités à la cefalexine (Horlacef®) pour Leroux (1991), 93% pour Allaire (1991) avec cephalonium (Cepravin HL®), 95% pour Lescut (1999) avec cephalonium (Cepravin HL®), et 87% Charpiat (2003) avec rifaximine (Fatrox®). En revanche, ce taux est supérieur à ceux obtenus par Saurel (1993) (84% avec la cefazoline), Leroux (1991) (79% avec cloxacilline (Orbenin HL®) et Charpiat (2003) (77% avec cloxacilline Orbenin®).

MEISSONNIER et LAUMONIER , en utilisant des comptages cellulaires individuels pour évaluer l'efficacité du Vonapen®, observent une chute importante du comptage cellulaire pour la majorité des vaches traitées de 71 à 83%.

Le taux de guérison selon les CCSI est supérieur à celui constaté bactériologiquement, et ceci pourrait s'expliquer par le seuil de guérison que nous avons fixés à 200.000 Cls/mL et au-dessous duquel il peut aussi y'avoir une infection bactérienne ; Ceci a été rapporté par DJABRI et collaborateurs que des quartiers ayant des CCS entre 110.000 et 150.000 Cls/mL présentaient des infections à germes mineurs. C'est le cas dans notre étude, des prélèvements à CCSI < S présentent des infection bactériennes à germes mineurs (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter brakii*, *Citrobacter freundii* et *acinetobacter baumannii* isolés respectivement à : 50%, 12,5%, 12,5%, 12,5%, 12,5% de fréquence.

B. Activité préventive

Celle-ci s'apprécie par des CCSI < S des vaches du groupe 2.

L'activité préventive du SYMBIOVEBA n'a pas été constatée dans notre étude du fait de la différence non significative entre les moyennes de CCSI du lot expérimental et du lot témoin à J64, ceci étant peut être dû à l'effectif pas très important ou aux conditions d'hygiène de la traite ou de l'élevage.

CONCLUSION

Cette étude a permis d'estimer la prévalence des mammites subcliniques, d'identifier la nature et d'évaluer l'importance des différentes espèces bactériennes responsables des infections mammaires ainsi que l'effet d'une administration orale d'un symbiotique sur les mammites subcliniques. Elle a mis en évidence les principaux points suivants :

- Une prévalence de 33,82% des mammites subcliniques.
- Les germes responsables de mammites subcliniques sont principalement des bactéries pathogènes à réservoir mammaire : Staphylocoques à coagulase négative (30%), *Staphylococcus aureus* (15%) ; Et des bactéries d'environnement : *Escherichia coli* (17,50%) et les autres entérobactéries (22,50). La situation de l'élevage se caractérise par la coexistence des mammites de traite et des mammites d'environnement ; Ceci s'expliquant par la fréquence rencontrée des Staphylocoques (45%) et la fréquence globale des entérobactéries de 40%. Les mauvaises conditions d'hygiène de la traite, le non contrôle de la machine à traire et le mauvais entretien de l'habitat ont constitué les probables facteurs de risque.
- L'association du CCSI et d'une analyse bactériologique sur toutes les vaches renseigne de façon précise mais ponctuelle sur l'étiologie et la fréquence des mammites subcliniques au sein d'un élevage ; Par contre, l'association des deux sur trois prélèvements successifs offre la possibilité de suivre l'infection présente, détecter les nouvelles infections, et estimer le taux de guérison avec ou sans traitement.
- L'administration du SYMBIOVEBA® pour des vaches atteintes de mammites subcliniques durant la lactation, permet :
 - Une guérison bactériologique globale de 66,66%
 - Et une diminution des CCSI en dessous de 200.000 Cls/mL pour 100% des vaches traitées.
- L'effet préventif du SYMBIOVEBA® sur des vaches saines vis à vis de mammites subcliniques n'a pas été conclu dans notre étude, une autre expérimentation avec un plus grand effectif et sur une plus grande période sera probablement nécessaire pour explorer son probable effet préventif.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Adamski, F.M., King, A.T., Demmer, J., 2000. Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brush-tail possum). *Molecular immunology* 37, 435-444.**
- Aggad, H., Mahouz, F., Ahmed Ammar, Y., Kihal, M., 2009. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Revue Méd. Vét.* 160, 590–595.**
- ALEXANDRE, A., 2005. UTILISATION DES COMPTAGES CELLULAIRES DANS LA COMPARAISON DE DEUX PREPARATIONS HORS-LACTATION. UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON.**
- ALIBERTI J., HIENY S., REIS E., SOUSA C., SERHAN C.N., SHER A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by Dcs : a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat. Immunol.*, 2002a, 3, 76-82.**
- ALIBERTI J., SERHAN C., SHER A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.*, 2002b, 196, 1253- 1262.**
- ALLUWAIMI A.M., ROSSITTO P.V., LEUTENEGGER C.M., FARVER T.B., SMITH W.L., CULLOR J.S. The somatic cell count versus cytokines as a tool in bovine udder health control. In : Proceedings of the IV Congress of Egyptian Society for Cattle Diseases, Asiat, Egypt, 2001.**
- ALLUWAIMI A.M., LEUTENEGGER C.M., FARVER T.B., ROSSITTO P.V., SMITH W.L., CULLOR J.S. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2003, 50, 105- 111.**
- ALLUWAIMI A.M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res. Vet. Sci.*, 2004, 77, 211-222.**
- ALMEIDA R.A., BATCHA T., OLIVER S.P. Persistence of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells. In : Hoegeveen H. (Ed.), *Mastitis in dairy production : current knowledge and future solutions*. Wageningen Academic Publishers : Wageningen, 2005, 137-142.**

- Apodaca, G., Katz, L.A., Mostov, K.E., 1994. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *The Journal of cell biology* 125, 67-86.**
- Arroyo, R., Martin, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernandez, L., Rodriguez, J.M., 2010. Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk. *Clinical Infectious Diseases* 50, 1551–1558.**
- Barnouin, J., Chassagne, M., 1998. Factors associated with clinical mastitis incidence in French dairy herds during late gestation and early lactation. *Veterinary research* 29, 159-171.**
- Ben Hassen, S., Messadi, L. & Ben Hassen, A., 2003, 'Identification and characterization of Staphylococcus species isolated from cow's milk with and without mastitis', *Annales de Medecine Vétérinaire* 147, 41–47.**
- BONNANS C., CHANEZ P., CHAVIS C. Lipoxins in asthma: potential therapeutic mediators on bronchial inflammation? *Allergy*, 2004, 59, 1027-1041.**
- Bosquet, G., Faroult, B., Labbé, J., Le Page, P., Sérieys, F., 2013. Référentiel Vétérinaire 2013 pour le traitement des mammites bovines 100.**
- Bouaziz, O., 2005. Contribution à l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'Est Algérien. UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE, FACULTE DES SCIENCES-DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES.**
- Boufaïda Asnoune, Z., Butel, M., Ouzrout, R., 2012. Prévalence des principales bactéries responsables de mammites subcliniques des vaches laitières au nord-est de l'Algérie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 65 (1-2), 5–9.**
- BOULANGER D., BUREAU F., MELOTTE D., MAINIL J., LEKEUX P. Increased nuclear factor kappaB activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, 86, 1259-1267.**
- BOUTET P., BUREAU F., DEGAND G., LEKEUX P. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, 86, 3430-3439.**

- BOUTET P., BOULANGER D., GILLET L., VANDERPLASSCHEN A., CLOSSET R., BUREAU F., LEKEUX P.** Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87, 4104-4114.
- Bouchard, D., 2013.** Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à *Staphylococcus aureus*.
- Boutet, P., Bureau, F., Lekeux, P., 2006.** La mammite bovine : de l'initiation à la résolution. *Ann. Méd. Vét.* 1-26.
- BRINKC., DAHLENS.E., DRAZENJ., EVANS J.F., HAY D.W., NICOSIA S., SERHAN C.N., SHIMIZU T., YOKOMIZO T.** International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol. Rev.*, 2003, 55, 195-227.
- BUREAU F., BONIZZI G., KIRSCHVINK N., DELHALLE S., DESMECHT D., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P.** Correlation between nuclear factor-kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000a, 161, 1314-1321.
- BUREAU F., DELHALLE S., BONIZZI G., FIEVEZ L., DOGNE S., KIRSCHVINK N., VANDERPLASSCHEN A., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P.** Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.*, 2000b, 165, 5822-5830.
- BUREAU F., DESMET C., MELOTTE D., JASPAR F., VOLANTI C., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.P., PIETTE J., LEKEUX P.** A proinflammatory role for the cyclopentenone prostaglandins at low micromolar concentrations: oxidative stress- induced extracellular signal-regulated kinase activation without NF-kappa B inhibition. *J. Immunol.*, 2002, 168, 5318-5325.
- Busato A, Trachsel P, Schallibaum M, Blum JW. 2000.** Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Prev. Vet. Med.*, 44 : 205-220.
- Coullioud P., M.J.L., Brouillet P., Fedayin M, 1991.** Identification et sensibilité aux antibiotiques des diverses espèces de staphylocoques associées à des mammites bovines inapparentes et subcliniques. *Revue de Médecine Vétérinaire* 142, 39-47.

- CRAWSHAW, W., MACDONALD, N., DUNCAN, G., 2005. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Veterinary Record* 812–813.**
- DJABRI B., BAREILLE N., BEAUDEAU F., SEEGERS H., Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis, *Vet. Res.* 2002, 33, 335–357.**
- Dego OK, Tareke F. 2003. Bovine mastitis in selected areas of southern Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 35 (3) : 197-205**
- Durel, L., Theron, L., Guyot, H., 2011. Vademecum MAMMITES BOVINES.**
- Eberhart, R., Harmon, D., Jasper, R., Natzke, S., 1987. Current concepts of bovine mastitis. Presented at the 3rd Natl. Mastitis Counc., Arlington, pp. 258–264.**
- Fabre JM, Morvan H, Lebreux B, Houffschmitt RM, Langridge S, Booth JM. 1997b. Estimation de la fréquence des différents germes responsables de mammites en France, partie 2 : mammites subcliniques. *Bull. GTV*, 3 : 17-23.**
- Fitzpatrick, J., Fontaine, M.C., Goetze, L., Holst, O., Leigh, J., Petzl, W., Schuberth, H.J., Sipka, A., Smith, D.G., Quesnell, R., Watts, J., Yancey, R., Zerbe, H., Gurjar, A., Zadoks, R.N., Seyfert, H.M., members of the Pfizer mastitis research, c., 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology* 144, 270-289.**
- Gayrard, V., 2000. Physiologie de la lactation. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.**
- Giannechini.R, Concha.C, Rivéro.R, Delucci.I, Moreno Lopez.J. 2002. Occurrence of clinical and subclinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Act. Vet. Scand.*, 43 (4) : 221-230.**
- Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, A., 2011. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 7, 1–19.**

- Griesbeck-Zilch, B., Meyer, H.H., Kuhn, C.H., Schwerin, M., Wellnitz, O., 2008. Staphylococcus aureus and Escherichia coli cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. Journal of dairy science 91, 2215-2224.**
- Gunther, J., Koczan, D., Yang, W., Nurnberg, G., Repsilber, D., Schuberth, H.J., Park, Z., Maqbool, N., Molenaar, A., Seyfert, H.M., 2009. Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with Escherichia coli. Veterinary research 40, 31.**
- Hancock, J.T., Salisbury, V., Ovejero-Boglione, M.C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R., Harrison, R., 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. Antimicrobial agents and chemotherapy 46, 3308-3310.**
- HANZEN C., 2009. Propédeutique de la glande mammaire, sémiologie et diagnostic individuel et de troupeau. Liège, Belgique, Université de Liège, p. 5-28.**
- Harini, H. & Sumathi, B.R., 2011, 'Screening of bovine milk samples for sub-clinical mastitis and antibiogram of bacterial isolates', Veterinary World 4, 358–359.**
- Harmon, R.J., 1994, 'Symposium - mastitis and genetic evaluation for somatic cell count – physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts', Journal of Dairy Science 77, 2103–2112.
[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77153-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8)**
- Heleili, N., Ayachi, A., Melizi, M., Kassah, A.L. & Mamache, B., 2012, 'Prevalence of subclinical bovine mastitis and the in vitro sensitivity of bacterial isolates in Batna Governorate, East of Algeria', Journal of Animal Science Advances 2, 576–582.**
- Hokmabad, V., Reza, M.F., Mogaddam, M., Sadegh, M. & Mirzaii, H., 2011, 'Bacterial pathogens of intramammary infections in Azeri buffaloes of Iran and their antibiogram', African Journal of Agricultural Research 6, 2516–2521.**
- Jiménez, E., Fernandez, L., Maldonado, A., Martin, R., Olivares, M., Xaus, J., Rodriguez, J., 2008. Oral Administration of Lactobacillus Strains Isolated from Breast Milk as an Alternative for the Treatment of Infectious Mastitis**

during Lactation. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, American Society for Microbiology. 74, 4650–4655.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02599-07>

Krömker, V., Zinke, C., Paduch, J., Klocke, D., Reimann, A., Eller, G., 2010. Evaluation of increased milking frequency as an additional treatment for cows with clinical mastitis. *J Dairy Res.* 90–4.

Lafi, S.Q., Al-Rawashdeh, O.F., Ereifej, K.L. & Hailat, N.Q., 1994, 'Incidence of clinical mastitis and prevalence of sub clinical udder infection in Jordan', *Preventive Veterinary Medicine* 18, 89–98.
[http://dx.doi.org/10.1016/0167-5877\(94\)90067-1](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5877(94)90067-1)

LE PAGE P, BOSQUET G, THÉRON L, LABBÉ J-F, FRÉDÉRICI-MATHIEU C, TISSERAND S, *et al.* Traitement et prévention des mammites bovines : actualités. *Supplément technique, Dépêche Vétérinaire*. 2014, 136, 39 p.

Longo, F., Beguin, J.C., Consalvi, P.J. & Deltor, J.C., 1994, 'Some epidemiological data on sub-clinical mastitis in dairy cow', *Revue de Médecine Vétérinaire* 145, 43–47.

Manner, Y., Pellerin, J.L. & Papierok, G., 1999, 'L'analyse bactériologique des laits de mammites clinique: le Sensi-Vet Mam Color apporte une réponse rapide et fiable', *Journées Nationales GTV-INRA*, Nantes, France, 26-28 May 199, 181.

Mdegela, R.H., Karimuribo, E., Kusiluka, L.J.M., Kabula, B., Manjurano, A., Kapaga, A.M. *et al.*, 2005, 'Mastitis in smallholder dairy and pastoral cattle herds in the urban and periurban areas of the Dodoma municipality in Central Tanzania', *Livestock Research for Rural Development* 17, viewed 11 April 2012 available from: <http://www.lrrd.org/lrrd17/11/mdeg17123.htm>

MEISSONNIER E. *et* LAUMONIER G. 1991. Influence du Vonapen HL sur l'évolution du comptage cellulaire du lait entre le tarissement et le vêlage chez les vaches laitières. *Mammites des vaches laitières*, Société Française de Buiatrie Paris, 18-19 Déc.

M'SADAK, Y., MIGHRI, L., KRAIEM, K., 2014. Etude des numérations cellulaires du lait et analyse descriptive des facteurs de risque des mammites en élevage bovin hors sol dans la région de Monastir (Tunisie). *Nature & Technologie, B- Sciences Agronomiques et Biologiques* 56 – 61.

- HILLERTON J.E. Redefining mastitis based on somatic cell count. IDF Bulletin, 1999, 345, 4–6.**
- Inoue, T., Asano, Y., Matsuoka, S., Furutani-Seiki, M., Aizawa, S., Nishimura, H., Shirai, T., Tada, T., 1993. Distinction of mouse CD8+ suppressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. Journal of immunology 150, 2121-2128.**
- Jensen, D.L., Eberhart, R.J., 1981. Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. American journal of veterinary research 42, 743-747.**
- Kawai, T., Akira, S., 2006. TLR signaling. Cell death and differentiation 13, 816-825.**
- Kolida, S., Gibson, G.R., 2011. Synbiotics in Health and Disease. Annual Review of Food Science and Technology 2, 373–393.**
- Lee C.S., W.F.B.P., Kemp P, 1980. Identification properties and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry secretions, colostrum and milk from normal cows. Journal of Dairy Research 47, 39-50.**
- Lefevre, C., Kammerer, M., Le Guenic, M., Roussel, P., Alby, C., Linclau, O., Cartaud, G., Tainturier, D., Larrat, M., Bareille, N., 2008. Le traitement des mammites cliniques de la vache laitière par des huiles essentielles. Innovations Agronomiques 79–83.**
- Lembo, A., Kalis, C., Kirschning, C.J., Mitolo, V., Jirillo, E., Wagner, H., Galanos, C., Freudenberg, M.A., 2003. Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to Salmonella enterica serovar Typhimurium and Staphylococcus aureus in mice. Infection and immunity 71, 6058-6062.**
- Loken, T., 2001. Alternative therapy of animals-homeopathy and other alternative methods of therapy. Acta Vet. Scand. Suppl 94:47–50.**
- Maier, R., Schmid, P., Cox, D., Bilbe, G., McMaster, G.K., 1991. Localization of transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 gene expression in bovine mammary gland. Molecular and cellular endocrinology 82, 191-198.**

- Mayer, B., Doleschall, M., Bender, B., Bartyik, J., Bosze, Z., Frenyo, L.V., Kacs Kovics, I., 2005. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) in the bovine mammary gland. The Journal of dairy research 72 Spec No, 107-112.**
- McDonald, J.S., Anderson, A.J., 1981. Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. American journal of veterinary research 42, 1366-1368.**
- MIALOT J. P. 1983. Technique de prélèvements de lait pour l'examen bactériologique. Rec. Méd. Vét. 11: 1057-1058.**
- Monsallier, G., 1994. Control of mesophilic germs quantity in cow raw milk in farm. Recueil De Medecine Veterinaire De L'Ecole D'Alfort 170, 411-418.**
- MOTTRAM T., RUDNITSKAYA A., LEGIN A., FITZPATRICK J.L., ECKERSALL P. D. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk Biosens Bioelectron, 2007, 22, 2689–2693.**
- ORLANDINI S., VAN DEN BIJGAART H. Reference system for somatic cell counting in milk, Accred Qual Assur , 2011, 16, 415–420.**
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J.J., Cajero-Juarez, M., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J.E., Bravo-Patino, A., Baizabal-Aguirre, V.M., 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. The Journal of infection 54, 399-409.**
- PANNEN B.H., ROBOTHAM J.L., The acute phase response, New Horizon, 1995, 3, 183– 197.**
- Peeler, E.J., Green, M.J., Fitzpatrick, J.L., Green, L.E., 2003. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. Preventive veterinary medicine 59, 169-180.**
- PEMBERTON, R.M. J. P. HART, T. T. MOTTRAM. An assay for the enzyme N-acetyl-b- Dglucosaminidase (NAGase) based on electrochemical detection using screen-printed carbon electrodes (SPCEs). Analyst (Lond.), 2001, 126, 1866–1871.**
- PIEPERS S., DE MEULEMEESTER L., DE KRUIF A., OPSOMER G., W BARKEMA, H., DE VLIEGHER S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium J Dairy Res, 2007, 74, 478–483.**

- Petzl, W., Zerbe, H., Gunther, J., Yang, W., Seyfert, H.M., Nurnberg, G., Schuberth, H.J., 2008. Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. Veterinary research 39, 18.**
- Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J.P., Edelman, L., Sansonetti, P.J., Corthesy, B., 2002. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. Immunity 17, 107-115.**
- PIEPERS S., DE MEULEMEESTER L., DE KRUIF A., OPSOMER G., W BARKEMA, H., DE VLIEGHER S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium J Dairy Res, 2007, 74, 478–483.**
- Pluvinage, P., Ducruet, T., Josse, J., Monicat, F., 1991. Facteurs de risque des mammites des vaches laitières. Résultats d'enquête. Rec. Med. Vet. 167, 105–112.**
- PYÖRÄLÄ S. Review article: Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet. Res., 2003,34, 565–578.**
- Rainard, P., Riollet, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. Veterinary research 37, 369-400.**
- Ranjan, R., Gupta, M.K., Singh, S. & Kumar, S., 2010, 'Current trend of drug sensitivity in bovine mastitis', Veterinary World 3, 17–20.**
- RAO A. La situation épidémiologique des germes contagieux de mammites bovines en Wallonie (Mémoire). Faculté de médecine vétérinaire de l'ULg : Liège, année académique 2013-2014, 32 pages.**
- RAYNES J.G., The acute phase response. Biochem. Soc. Trans. 22 (1994) 69–74. RUEGG P.L., REINEMANN D.J., Milk quality and mastitis tests. Bov. Pract., 2002, 36, 41–**
- Rainard, P., Poutrel, B., 1988. Effect of naturally occurring intramammary infections by minor pathogens on new infections by major pathogens in cattle. Am. J. Vet. Res. 49(3), 327–329.**
- Rincheval-Arnold, A., Belair, L., Djiane, J., 2002. Developmental expression of pIgR gene in sheep mammary gland and hormonal regulation. The Journal of dairy research 69, 13-26.**

- Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, B., 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of dairy science* 84, 1077-1084.**
- Roberson, J., Warnick, L., Moore, G., 2004. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. *J Dairy Sci.* 583–92.**
- Romain H.T, Adesiyun A.A, Webb L.A , Lauckner F.B. 2000. Study on risk factors and their associations with subclinical mastitis in lactating dairy cows in Trinidad. *J. Vet. Med. B*, 47 : 257-271.**
- Ruegg, P., 2009. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. *J. Anim. Sci.* 43–55.**
- Saddek, S.R., Abd-Elkader, H.A. & Abd- Elhaffez, M.M., 1996, ‘Bacteriological studies of subclinical mastitis in Friesian cattle in Assiut Governorate’, *Assiut Veterinary Medicine Journal* 42, 77–88.**
- Sahoo, N.R, Kumar, P., Bhusan, B., Bhattacharya, T.K., Dayal, S., Sahoo, M., 2012, ‘Lysozyme in livestock: a guide to selection for disease resistance: a review’ *Journal of Animal Science Advances* 2, 347–360.**
- SAIDI R., KHELEF D., KAIDI R. Evaluation d’un test de dépistage précoce des mammites subcliniques des vaches. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 2010, 63 (3-4), 57-61.**
- Sanchez, L., Lujan, L., Oria, R., Castillo, H., Perez, D., Ena, J.M., Calvo, M., 1992. Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep. *Journal of dairy science* 75, 1257-1262.**
- SANFORD, C.J., KEEFE, G.P., SANCHEZ, J., DINGWELL, R.T., BARKEMA, H.W., LESLIE, K.E., DOHOO, I.R. Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis Test. *Prev. Vet. Med*, 2006, 77, 96–108.**
- SARGEANT J. M., LESLIE K. E., SHIRLEY J. E., PULKRABEK B. J., LIM G. H. Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation. *J. Dairy Sci.*, 2001, 84, 2018–2024.**

- Saxena RK, Dutta GN, Borah R, Duragohain J. 1993. Incidence and etiology of bovine subclinical mastitis. Indian Vet. J., 70 : 1079-1080.**
- SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. J. Am. Vet. Med. Assoc., 1957, 130, 199–204.**
- Schukken, Y.H., Gunther, J., Schukken, Y., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, A., Testa, F., Scaccabarozzi, L., 2014. Efficacy of vaccination on Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. J. Dairy Sci. 5250–5264.**
- Sereys, 2002. Nouveau regard sur les mammites à enterobactéries. Point vétérinaire 224, 50-54.**
- Sérieys, F., 2011. Suivi de l'utilisation en élevages d'un vaccin contre les mammites (Startvac®, Hipra) 89–100.**
- Shafer-Weaver, K.A., Sordillo, L.M., 1997. Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. Veterinary immunology and immunopathology 56, 53-64.**
- SHYAKA, A., 2007. DIAGNOSTIC DES MAMMITES CLINIQUES ET SUBCLINIQUES EN ELEVAGE BOVIN LAITIER INTENSIF (CAS DE LA FERME DE W A YEMBAM). UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR.**
- Soltys, J., Quinn, M.T., 1999. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. Infection and immunity 67, 6293-6302.**
- Sordillo, L.M., Streicher, K.L., 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. Journal of mammary gland biology and neoplasia 7, 135-146.**
- Sprong, R.C., Hulstein, M.F., Van der Meer, R., 2001. Bactericidal activities of milk lipids. Antimicrobial agents and chemotherapy 45, 1298-1301.**
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., Wheeler, T.T., 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. Journal of animal science 87, 3-9.**

Swanson, K., Gorodetsky, S., Good, L., Davis, S., Musgrave, D., Stelwagen, K., Farr, V., Molenaar, A., 2004. Expression of a beta-defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infection and immunity* 72, 7311-7314.

THERON L., Détection des mammites, actualité et perspectives. Observatoire de la santé mammaire (OSAM), 2014.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of immunology* 165, 5392-5396.

Tuteja FF, Kapur MP, Sharma A, Vinajaka AK. 1993a. Studies on bovine subclinical mastitis : Prevalence and microflora. *Indian Vet. J.*, 70, 787-791.

VIGUIER C., ARORA S., GILMARTIN N., WELBECK K., O'KENNEDY R.. Review :Mastitis detection: current trends and future perspectives, *Trends Biotechnol*, 27 (No.8)., 2009, 486-493.

VANGROENWEGHE F, DUCHATEAU L, BOUTET P, LEKEUX P, RAINARD P, PAAPE MJ, *et al.* Effect of carprofen treatment following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *Journal of Dairy Science*. 2005, 88, 2361-2376.

Wellnitz, O., Baumert, A., Saudenowa, M., Bruckmaier, R.M., 2010. Immune response of bovine milk somatic cells to endotoxin in healthy quarters with normal and very low cell counts. *The Journal of dairy research* 77, 452-459.

Wellnitz, O., Bruckmaier, R.M., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary journal* 192, 148-152.

WHYTE, D. WALMSLEY M., LIEW A., CLAYCOMB R., MEIN G. Chemical and rheological aspects of gel formation in the California mastitis test. *J. Dairy Res.*, 2005, 72, 115–121.

Wilson, E., Butcher, E.C., 2004. CCL28 controls immunoglobulin (Ig)A plasma cell accumulation in the lactating mammary gland and IgA antibody transfer to the neonate. *The Journal of experimental medicine* 200, 805-809.

- Yamasaki, O., J. Kaneko, S. Morizane, H. Akiyama, J. Arata, S. Narita, J. Chiba, Y. Kamio, and K. Iwatsuki. 2005a. The association between Staphylococcus aureus strains carrying panton-valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. Clin. Infect. Dis. 40(3):381-385.**
- Yamasaki, O., S. Morizane, H. Akiyama, K. Iwatsuki, J. Kaneko, and Y. Kamio. 2005b. Tendon destruction induced by Panton-Valentine leukocidin-positive Staphylococcus aureus in a patient with Sezary syndrome. Br. J. Dermatol. 152(3):586-587.**
- Yamawaki, R. A., E. L. Milbradt, M. P. Coppola, J. C. Rodrigues, R. L. Andreatti Filho, C. R. Padovani, and A. S. Okamoto. 2013. Effect of immersion and inoculation in ovo of Lactobacillus spp. in embryonated chicken eggs in the prevention of Salmonella Enteritidis after hatch. Poult. Sci. 92(6):1560-1563.**
- Yarwood, J. M., and P. M. Schlievert. 2003. Quorum sensing in Staphylococcus infections. J. Clin. Invest. 112(11):1620-1625.**
- Yeung, C. Y., J. S. Chiang Chiau, W. T. Chan, C. B. Jiang, M. L. Cheng, H. L. Liu, and H. C. Lee. 2013. In vitro prevention of salmonella lipopolysaccharide-induced damages in epithelial barrier function by various lactobacillus strains. Gastroenterol. Res. Pract. 2013:973209.**
- Younes, J. A., H. C. van der Mei, H. E. van den, H. J. Busscher, and G. Reid. 2012. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. PLoS. One. 7(5):e36917.**
- Young, C. W., V. R. Eidman, and J. K. Reneau. 1985. Animal health and management and their impact on economic efficiency. J. Dairy Sci. 68(6):1593-1602.**
- Yu, Z., X. Zhang, S. Li, C. Li, D. Li, and Z. Yang. 2013. Evaluation of probiotic properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Chinese sauerkraut. World J. Microbiol. Biotechnol. 29(3):489-498.**
- Zadoks, R. N., J. R. Middleton, S. McDougall, J. Katholm, and Y. H. Schukken. 2011. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 16(4):357-372.**

- Zárate G., and M. E. Nader-Macias. 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 43(2):174-180.**
- Zárate G., V. Santos and M.E. Nader-Macias. 2009. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2009:48358.**
- Zhang, J. S., J. D. Yin, X. Zhou, F. N. Li, J. J. Ni, and B. Dong. 2008. Effects of lower dietary lysine and energy content on carcass characteristics and meat quality in growing-finishing pigs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 21:1785-1793.**
- Zhang, W., D. Yu, Z. Sun, R. Wu, X. Chen, W. Chen, H. Meng, S. Hu, and H. Zhang. 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional homemade koumiss in Inner Mongolia, China. *J. Bacteriol.* 192(19):5268-5269.**
- Zhang, Z. F., and I. H. Kim. 2013. Effects of probiotic supplementation in different energy and nutrient density diets on performance, egg quality, excreta microflora, excreta noxious gas emission, and serum cholesterol levels in laying hens. *J. Anim Sci.* 91(10):4781-4787.**
- Zhang, J. L., Q. M. Xie, J. Ji, W. H. Yang, Y. B. Wu, C. Li, J. Y. Ma, and Y. Z. Bi. 2012. Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens. *Poult. Sci.* 91(11):2755-2760.**
- Zhang, W., H. Wang, J. Liu, Y. Zhao, K. Gao, and J. Zhang. 2013. Adhesive ability means inhibition activities for lactobacillus against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe.* 22:97-103.**
- Zhao, K., H. Y. Liu, M. M. Zhou, and J. X. Liu. 2010. Establishment and characterization of a lactating bovine mammary epithelial cell model for the study of milk synthesis. *Cell Biol. Int.* 34(7):717-721.**
- Zhao, L. 2013. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat. Rev. Microbiol.* 11(9):639-647.**
- Zhao, X., and P. Lacasse. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *J. Anim Sci.* 86(S13):57-65.**

Zinegesser J, Daye Y, Lopez V, Grant G, Bryan L, Kearney M, Hugh-Jones ME. 1991. National survey of clinical and subclinical mastitis in Jamaican dairy herds. 1985-86. Trop. Anim. Hlth. Prod., 23, 2-10.

ANNEXES

Annexe 1 : Flacon stérile pour prélèvement de lait



Annexe 2 : Technique de prélèvement

| Prélèvement | Matériel | technique |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <ul style="list-style-type: none">-Pots de prélèvement stériles et gants d'examen.-Coton hydrophile ou compresses.-Alcool chirurgical 70°.-Papier absorbant.-Feutre indélébile.-Glacière avec pains de glace. | <p>Lavage des mains.</p> <p>Lavage et séchage des trayons.</p> <p>Désinfection de l'extrémité du trayon avec un tampon de coton imbibé d'alcool.</p> <p>Elimination des premiers jets</p> <p>On saisit le flacon entre le pouce et l'index de la main gauche.</p> <p>On dévisse le bouchon avec la main droite, et on dirige le pot vers le bas.</p> <p>On saisit le trayon de la main droite, on le ramène en position latérale et on traite presque horizontalement dans le flacon.</p> <p>On referme le flacon et on l'identifie en inscrivant : la date, le numéro de l'animal.</p> |



Annexe 3 : Etapes de réalisation du comptage cellulaire à l'aide de DCC (DELAVAL CELL COUNTER®)

1. Avec la carte d'analyse, prélever un échantillon de lait (en appuyant sur le piston, du lait est aspiré)



2. Appuyer sur la touche (On/ Off) pour démarrer l'appareil puis introduire la carte dans le DCC



3. Appuyer sur la touche (RUN) et après 45 secondes lire le résultat

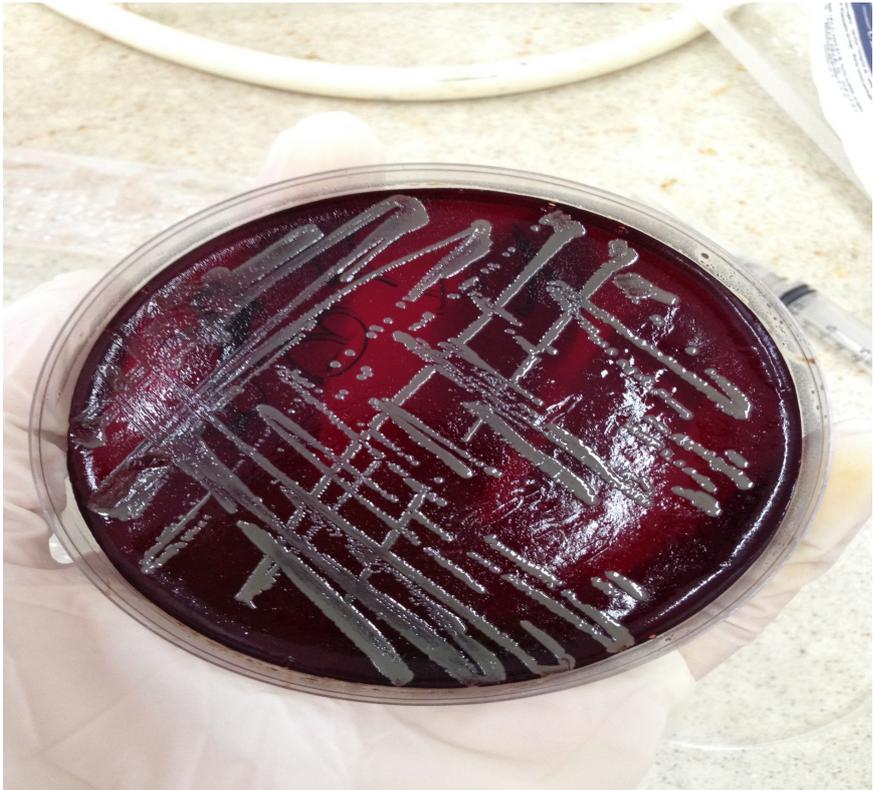


Annexe 4 :Le symbiotique utilisé SYMBIOVEBA®

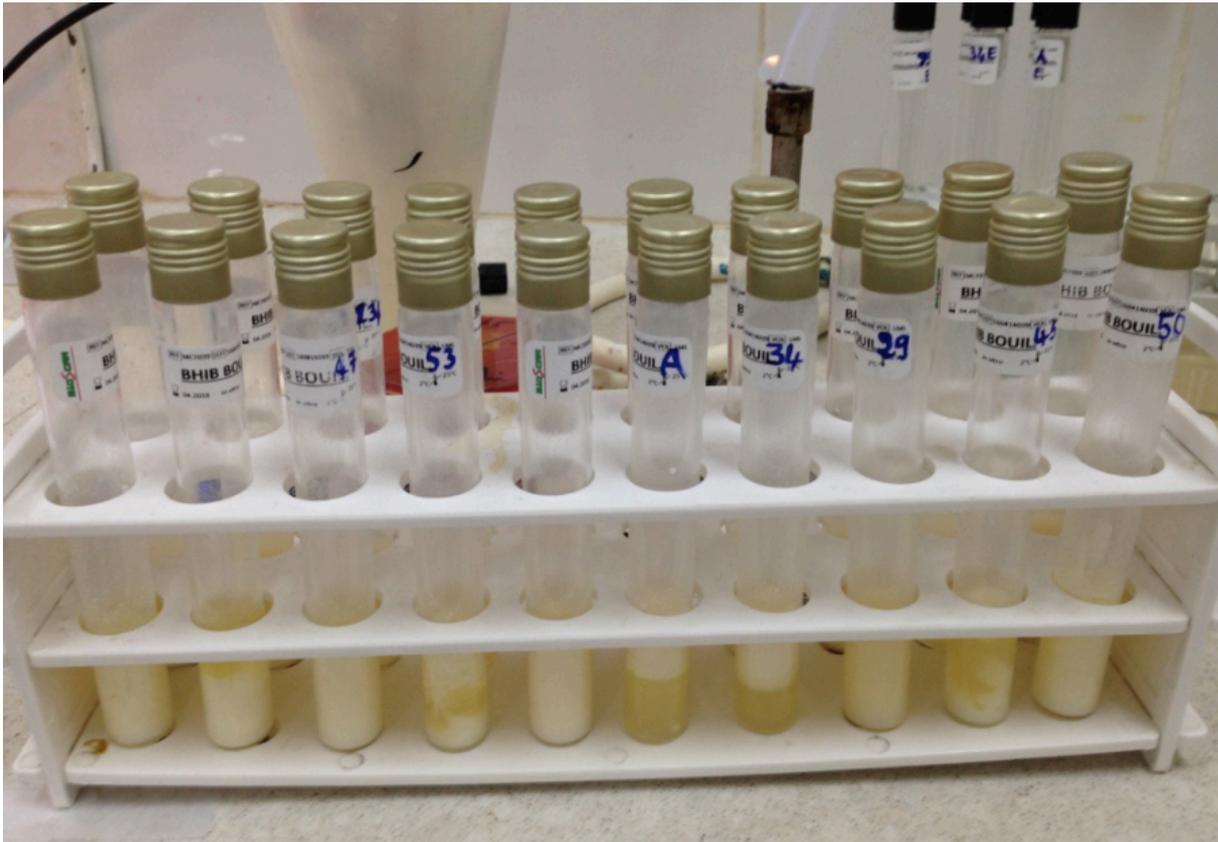
Symbioveba



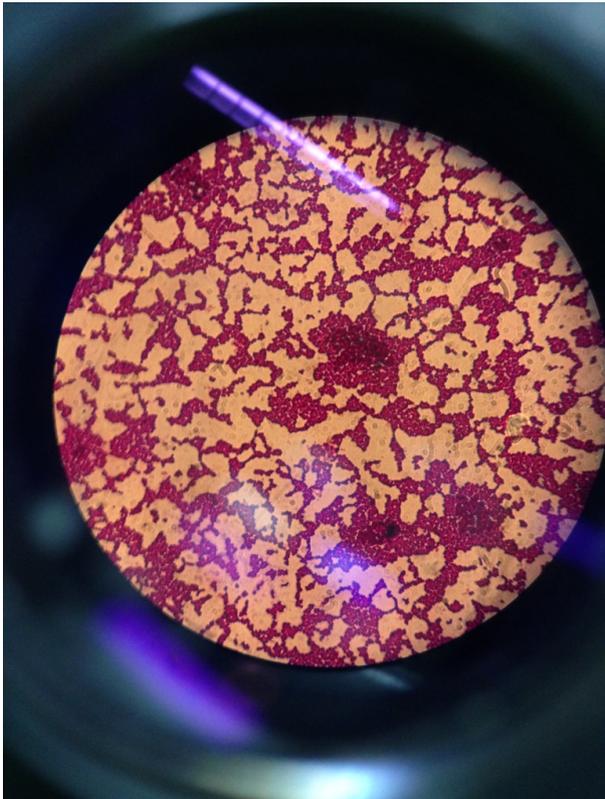
Annexe 5 : Gélose Columbia aditionée de 5% de sang de mouton



Annexe 6 : Tubes de bouillons d'enrichissement inoculés de 1ml de lait



Annexe7 : coloration de Gram (sous microscope optique)



Annexe 8 : Test de la Catalase pour les Bactéries Gram +



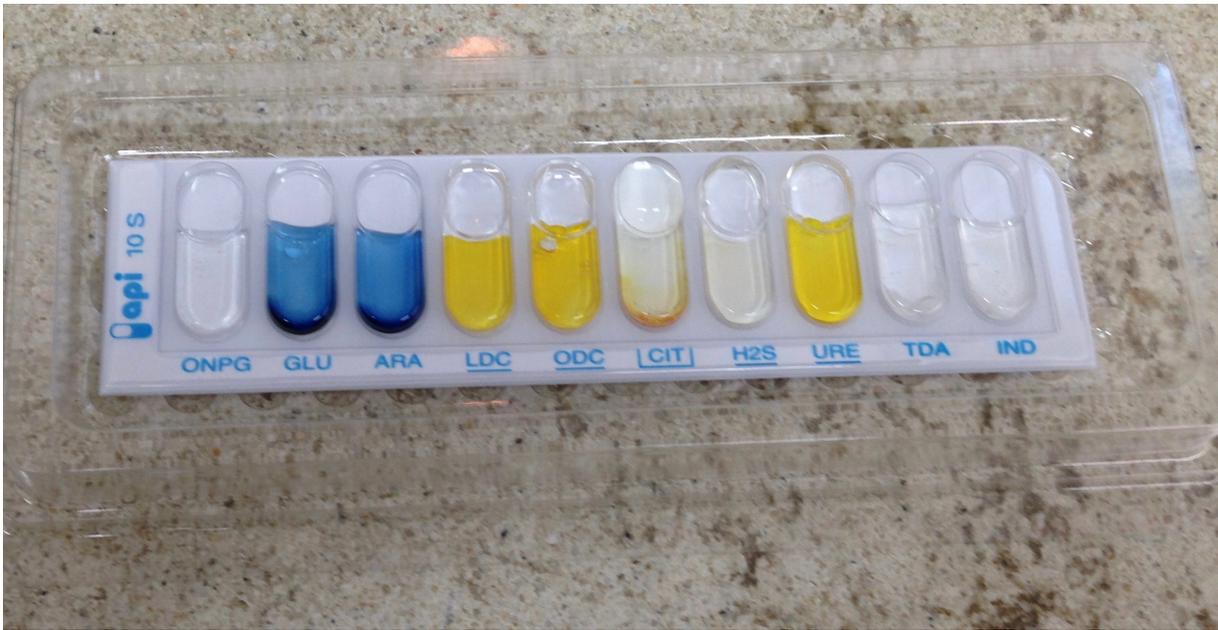
Annexe 9 : Test de l'Oxydase pour les bactéries Gram –



Annexe 10: Test de coagulase positif



Annexe11 : Galerie api® 10S



Annexe 12 : Galerie api® 20NE

