

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة-الجزائر
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE-ALGER

Thèse
En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Vétérinaires

THEME

**ETUDE DES LEVURES RESPONSABLES DES MAMMITES
DANS LES ELEVAGES BOVINS LAITIERS DE LA REGION DE
SIDI LAHCENE DANS LA WILAYA DE SIDI BEL ABBES :
PREVALENCE ET IDENTIFICATION.**

Présenté par :

Dr. AKDOUCHE Leila. Épouse. SAADI

Devant le Jury :

Pr.KHELEF D.	Professeur, E.N.S.V – Alger	Président
Pr.AISSI M.	Professeur, E.N.S.V – Alger	Directeur de Thèse
Pr. AGGAD H.	Professeur, ISV –Université de TIARET	Examineur
Pr.KAIDI R.	Professeur, ISV –Université de BLIDA	Examineur
Dr.BOUZID R.	M.C.A., E.N.S.V– Alger	Examineur

Septembre 2016

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail,
A mon mari Ahmed
pour son amour,
son soutien à chaque instant,
pour ces conseils éclairés
et surtout pour ces encouragements...*

*A mes enfants :
Mohamed Amine,
Ahmed Yacine,
Mohamed Said,
que dieu les protège.*

A mes défunttes mère et tante.

*A ma belle mère
pour sa présence rassurante.*

Remerciements

Nous tenons à remercier Allah, le tout puissant qui a éclairé notre chemin et la patience qu'il ma donné pour réaliser ce travail.

Mes vifs remerciements et mes sincères reconnaissances s'adressent à :

Ma promotrice, Melle Aissi M., professeur à l'ENSU, pour m'avoir guidé et dirigé dans mon travail, ainsi que pour les conseils qu'elle m'a prodigué avec dévouement et patience. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur KHELLOF D., Professeur à l'ENSU, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de notre thèse. Hommage respectueux.

Monsieur KAIDI R., professeur à l'université de Blida, qui nous à fait l'honneur d'examiner ce travail.

Monsieur AGGAD H., professeur à l'université de TIAREJ, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse. Sincères remerciements.

Monsieur BOUZID R., maitre de conférences à l'ENSU, qui nous à fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Docteur Vétérinaire KHOURI A.K., qui ma aider dans la réalisation des prélèvements du lait dans la région de Sidi Lahcene , Wilaya de Sidi BelAbbes.

Le mérite de ce travail revient à toutes les personnes qui de prés ou de loin, par leur participation et leur soutien, ont contribué à sa réalisation. Mille merci.

LISTE DES FIGURES

Partie bibliographique

Figure 1 : Les chlamydospores chez <i>Candida albicans</i>	10
Figure 2 : Morphologie de <i>Candida albicans</i>	11
Figure n° 3 : colonies de <i>Candida albicans</i>	11
Figure n°4 : <i>Candida albicans</i> incubée à 37°C dans du sérum de lapin (test de germination). Les tubes germinatifs (flèches) représentent le début de la formation des vrais hyphes (pas de constriction)	12
Figure n°5 : aspect microscopique des levures de <i>Cryptococcus neoformans</i>	13
Figure n°6 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Cryptococcus</i> sp	15
Figure n°7 : (A) : aspect macroscopique des colonies du genre <i>Trichosporon</i> ; (B) : aspect microscopique des levures de <i>Trichosporon</i>	16
Figure n°8 : (A) Aspect macroscopique des Colonies du genre <i>Rhodotorula</i> ; (B) aspect microscopique des levures de <i>Rhodotorula</i>	17
Figure n°9 : Représentation schématique des différentes étapes de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	28
Figure n°10 : Représentation schématique des 2 procédures disponibles pour l'identification de levures à partir de colonies isolées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	29

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

Figure n°11 : Situation géographique de la commune de Sidi Lahcene dans la wilaya de Sidi Bel Abbès.....	30
Figure n° 12 : les Communes limitrophes de Sidi Lahcene.....	30
Figure n°13 : Préparation des lames pour l'examen direct au microscope. (A) : dépôt d'une goutte de la potasse à 30 % (B): Dépôt du colorant bleu lactophénol ; (C) : dépôt d'une colonie sur le colorant et recouvrir d'une lamelle.....	37
Figure n°14 : Les différentes étapes de l'ensemencement. (A) : Récupération de quelques gouttes du lait ; (B) : Dépôt de ces gouttes sur la gélose Sabouraud ; (C) : Etalement de ces gouttes à	

l'aide du râteau sur toute la surface de la gélose Sabouraud.....38

Résultats

Figure n°15 : le mode d'élevage dans la région étudiée.....	45
Figure n°16 : le type de stabulation dans la région étudiée.....	46
Figure n°17 : intervalle du changement de la litière.....	46
Figure n°18 : la nature de la litière.....	47
Figure n°19 : la fréquence des mammites dans la région de Sidi lahcène.....	47
Figure n°20 : la fréquence des mammites selon les saisons.....	48
Figure n°21 : la fréquence des mammites selon le taux de production du lait.....	48
Figure n°22 : la fréquence des mammites selon le nombre de lactations.....	49
Figure n°23 : la fréquence des mammites selon le stade de lactation.....	49
Figure n°24 : la désinfection du matériel de traite.....	50
Figure n°25 : désinfection des mains du trayeur.....	50
Figure n°26 : la fréquence de la désinfection des mains du trayeur après chaque vache.....	51
Figure n°27 : la fréquence de la désinfection de la mamelle avant chaque traite.....	51
Figure n°28 : chiffon utilisé pour le nettoyage de la mamelle.....	52
Figure n°29 : la fréquence de la désinfection du chiffon après chaque utilisation.....	52
Figure n°30 : le type de mammites rencontrées.....	53
Figure n°31 : la persistance des mammites après traitement antibiotique.....	53
Figure n°32 : la fréquence de l'apparition de mammites mycosiques après traitement antibiotiques prolongé.....	54
Figure n°33 : Apparition du muguet chez les veaux allaitants.....	54
Figure n°34 : la fréquence d'utilisation de tests pour le dépistage des mammites subcliniques.....	55
Figure n°35 : Colonies de levures innombrables poussées après ensemencement d'échantillons de lait (A, B, C) ...	57

Annexe II

Figure n°36 : Technique de prélèvement du lait.

Annexe V

Figure n°37 : Protocole de suivi pour le diagnostic mycologique (photos A ,B).

Figure n°38 : test CMT positif.

Figure n°39: préparation des lames pour l'examen direct.

Figure n°40 : la lecture des résultats de l'analyse mycologique.

Figure n°41 : galerie API[®]20C AUX.

Figure n°42 : isolement des levures sur milieu sabauraud additionné de chloramphénicol.

Figure n°43 : isolement des champignons filamenteux sur milieu sabauraud additionné de chloramphénicol.

Figure n° 44: Repiquage des levures sur milieu sabauraud additionné de chloramphénicol pour identification ultérieure

Figure n°45 : réalisation du test de blastèse (test de germination).

Figure n°46 : Test Sabauraud actidione positif.

Figures n°47: Levures, filaments, pseudofilaments et arthrospores vues au microscope optique. (Gr. x400)(Photos : A, B, C, D, E, F, G, H.)

LISTE DES TABLEAUX

Partie bibliographique

Tableau n°1 : Répartition des différentes populations cellulaires du lait en l'absence d'infection.....	3
--	---

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

Tableau n°2 : Nombre d'élevages concernés par l'étude	31
Tableau n°3 : Nature et nombre d'échantillons prélevés dans les élevages bovins étudiés.....	32
Tableau n°4 : Grille de lecture du test CMT (Notice Leucocyttest).....	36

Résultats

Tableau n°5 : Résultats de l'examen direct des prélèvements de lait et de l'eau de l'abreuvoir.....	56
Tableau n°6 : Nombre de prélèvements positifs.....	56
Tableau n°7 : Les différentes espèces de levures isolées à partir des deux types d'exploitations.....	58
Tableau n°8 : Les différents genres de levures isolés dans notre étude et leur fréquence.....	59
Tableau n°9 : Les différentes espèces de levures isolées dans notre étude et leur fréquence.....	60
Tableau n°10 : La prévalence de l'infection fongique selon le mode de traite.....	61
Tableau n°11 : Les espèces de levures isolées dans le lait et dans d'autres échantillons analysés.....	62

Annexe III

Tableau n°12 : Le milieu du Test APT 20C AUX (Bio Mérieux, France)	
---	--

Annexe V

Tableau n°13 : Critères identification des levures (DROUHET et DUPONT, 1985)

Tableau n° 14: tableau d'identification des levures de la galerie API 20 AUX V4

Annexe VII

Tableau n °15 : le mode d'élevage dans la région étudiée.

Tableau n °16 : le type de stabulation dans la région étudiée.

Tableau n°17 : intervalle du changement de la litière.

Tableau n °18 : la nature de la litière.

Tableau n°19: la fréquence des mammites cliniques dans la région de Sidi lahcène.

Tableau n°20 : la fréquence des mammites selon les saisons.

Tableau n°21 : la fréquence des mammites selon le taux de production du lait.

Tableau n°22 : la fréquence des mammites selon le nombre de lactations.

Tableau n°23 : la fréquence des mammites selon le stade de lactation.

Tableau n°24 : La fréquence de la désinfection du matériel de traite.

Tableau n°25: la fréquence de la désinfection des mains du trayeur.

Tableau n°26 : la fréquence de la désinfection des mains du trayeur après chaque vache.

Tableau n°27: la fréquence de la désinfection de la mamelle avant chaque traite

Tableau n°28: chiffon utilisé pour le nettoyage de la mamelle.

Tableau n°29 : la fréquence de la désinfection du chiffon après chaque utilisation.

Tableau n°30: le type de mammites rencontrées.

Tableau n°31 : la persistance des mammites après traitement antibiotique

Tableau n°32 : la fréquence de l'apparition de mammites mycosiques après traitement antibiotiques prolongé.

Tableau n°33 : Apparition du muguet chez les veaux allaitants

Tableau n°34 : la fréquence d'utilisation de tests pour le dépistage des mammites subcliniques.

Annexe VIII

Tableau n°35 : Les espèces de levures isolées dans le lait et dans d'autres échantillons analysés.

Annexe IX

Tableau n°36 : La comparaison des résultats de la présente étude avec d'autres études menées dans d'autres pays.

LISTE DES ABREVIATIONS

AD : Antérieur droit.

AG : Antérieur gauche.

ATB : Antibiotique.

C. : *Candida*.

CMT : California Mastitis Test.

Cr. : Cryptococcus.

ENSV : Ecole Nationale supérieure vétérinaire.

G. : *Geothricum*.

p : probabilité.

P.C.B. : Pomme de terre –Carotte –Bille.

PD : Postérieur droit.

pH : Le potentiel hydrogène.

R. : *Rhodotorula*.

(R) : résistante.

RAT: Riz Agar Tween.

S: *Saccharomyces cerevisiae*.

(S): sensible.

Tr. : Trichosporon.

VL : volume.

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
<u>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	
I/ Rappels sur les moyens de défense de la mamelle.....	3
I.1. Le canal du trayon.....	3
I.2. Les défenses cellulaires	3
I.3. Les défenses non cellulaires	4
I.4. Particularités de la période sèche.....	5
II/ Description clinique des mammites fongiques.....	6
II.1. Les mammites cliniques.....	6
II.2. Les mammites subcliniques.....	7
III/ Facteurs impliqués dans les mammites fongiques.....	7
III.1. L'agent déterminant.....	7
III.1.1. Les levures impliquées lors de mammites fongiques.....	7
III.1.1.1. Le genre <i>Candida</i>	8
III.1.1.2. Le genre <i>Cryptococcus</i>	13
III.1.1.3. Le genre <i>Trichosporon</i>	15
III.1.1.4. Le genre <i>Rhodothorula</i>	17
III.1.2. Physiologie et Croissance des levures.....	18
III.2. Facteurs favorisants.....	22
III.2.1. L'animal.....	22
III.2.1. Facteurs de sensibilité.....	22
III.2.1.1. Numéro de lactation.....	22
III.2.1.2. Stade de lactation.....	22
III.2.1.3. Le niveau de production laitière.....	23
III.2.1.4. La morphologie de la mamelle et du trayon.....	23
III.2.2. Facteurs de résistance.....	24
III.2.2. L'élevage.....	24
IV/ Diagnostic au laboratoire des infections à levures.....	25
IV.1. Diagnostic direct.....	25
IV.1.1. Prélèvement des échantillons de lait.....	25

IV.1.2. Examen direct.....	25
IV.1.3. Culture.....	25
IV.2. Diagnostic indirect.....	26
IV.2.1. Réactions sérologiques.....	26
IV.2.2. Biologie moléculaire.....	27
IV.2.3. Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	27

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS	30
I.1. Description de la région d'étude.....	30
I.2. La période d'étude	31
I.3. Le questionnaire distribue aux vétérinaires praticiens et éleveurs.....	31
I.4. Les élevages bovins étudiés.....	31
I.5. Nature et nombre des échantillons prélevés	31
I.6. Mode d'expression des résultats du questionnaire.....	33
II. METHODES	
II.1. Techniques de prélèvement des échantillons de lait et des écouvillons.....	33
II.1.1. Prélèvements de lait	33
II.1.2. Prélèvements de l'eau des abreuvoirs.....	33
II.1.3. Ecouvillonnages.....	33
II.1.3.1. Ecouvillonnage des régions anales et vaginales.....	33
II.1.3.2. Ecouvillonnage des gobelets trayeurs des machines à traire.....	34
II.1.3.3. Ecouvillonnage des mains des trayeurs.....	34
II.1.3.4. Ecouvillonnage de la peau de la mamelle.....	34
II.1.3.5. Ecouvillonnage de la face interne de l'abreuvoir.....	34
II.1.3.6. Ecouvillonnage de la face interne du mangeoire.....	34
II.1.3.7. Ecouvillonnage du seau de lait	34
II.1.3.8. Ecouvillonnage de la face interne de la citerne.....	34
II.2. Méthodes de diagnostic de la mammite	34
II. 2.1. Méthodes de diagnostic de la mammite clinique.....	34
II. 2.2. Méthodes de diagnostic de la mammite subclinique.....	35

II.2.2. 1.Le Diagnostic des mammites subclinique par le test CMT	35
II. 3.Méthodes de diagnostic mycologiques.....	36
II.3.1. Analyses du lait.....	36
II.3.1.1. Examen direct.....	37
II.3.1.2. Mise en culture.....	37
II.3.1.3. Repiquage des colonies de levures.....	39
II.3.1.4. Identification des colonies de levures.....	39
II.3.1.4.1. Milieu Sabouraud / Chloramphénicol à 37 °C	39
II.3.1.4.2. Milieu Sabouraud / Actidione	39
II.3.1.4. 3. Milieu à base de crème de riz (Rice Cream).....	40
II.3.1.4. 4. Milieu à base de sérum pour blastèse	40
II.3.1.4.5. Milieu à l'urée Indole.....	40
II.3.1.4.6. Etude des caractères physiologiques.....	40
II.3.1.4.6.1. Assimilation de sources de carbone = Test API	
20C AUX	41
II.3.2. Analyse mycologique de l'eau de l'abreuvoir	42
II.3.3. Analyse mycologique des écouvillons	42

RESULTATS

I. Résultats du questionnaire	39
II Résultats de l'ensemencement des prélèvements.....	56
II.1. Résultats de l'examen direct	56
II. 2.Résultats de l'analyse mycologique	56
III. Prévalence de l'infection mycosique dans les élevages étudiés.....	61
IV. Les espèces de levures isolées dans le lait et d'autres échantillons analysés.....	62
DISCUSSION	64
CONCLUSION	73
PERSPECTIVES	76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77
ANNEXES	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'inflammation de la mamelle est une des trois premières pathologies des vaches laitières. Cette pathologie peut être inapparente (infection latente, mammite subclinique), c'est la plus fréquente (95 à 98% des cas) et peut être apparente (mammite clinique), cette dernière ne représente que 2 à 5% des cas (**MAHIEU, 1985**).

La mammite bovine est une maladie multifactorielle impliquant interrelation entre l'hôte, l'environnement et les agents infectieux. Elle est considérée comme la plus répandue et la maladie infectieuse des vaches laitières économiquement importante sur tous les continents, avec des pertes annuelles estimées à 35 billion de \$ dans l'industrie laitière mondiale. (**BRADLEY, 2002**)

L'infection de la mamelle entraîne une perturbation de la glande mammaire par une diminution des éléments produits par les cellules de l'épithélium sécrétoire (matière grasse, caséine, lactose) et une augmentation des éléments provenant du flux sanguin par augmentation de la perméabilité des tissus atteints (sels minéraux, protéines solubles, cellules) (**SERIEYS et al., 1985**).

Plusieurs microorganismes sont impliqués dans l'étiologie des infections intra-mammaires chez les bovins, représentés principalement par les bactéries, les virus, les mycoplasmes, les algues et les levures (**LEBLANK et al.2006**).

Les levures se trouvent dans les endroits humides qui sont riches en matière organique, et sont facilement isolées à partir des trayons et équipement de traite (**KELLER et al.2000**).

Bien que l'incidence de la mammite en raison de la levure a été généralement faible, les épidémies sont occasionnellement rapporté (**ELAD et al.1995**) (**CRAWSHAW et al.2005**)

Les foyers de mammite causés par les levures ont été signalés dans des troupeaux intensivement gérés dans lesquels il y avait des défaillances dans l'hygiène de l'environnement ou en association avec traitement intramammaire répétitif (**FARNSWORTH et SORENSEN.1972**), (**MORETTI, 1998**).

Plusieurs espèces de levures du genre *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Trichosporon* ont été associées à la mammite chez les vaches laitières. *Candida* est habituellement le genre le plus fréquemment isolé, avec de grandes variations de la prévalence et des espèces identifiées.

(**FARNSWORTH et SORENSEN.1972**),(**AALBAEK et al ,1994**),(**KRUKOWSKI et al.2006**)

Les études sur les infections fongiques des glandes mammaires chez les vaches sont de plus en plus fréquentes en raison de leur incidence croissante. Selon les données de la littérature, ces infections représentent 2% -13% de tous les cas de mammite chez les vaches (**COSTA et al.1993** ; **KRUKOWSKI et al.2000**; **LAGNEAU et al.1996**) mais en Algérie, très peu d'études ont été menées sur la fréquence des mammites fongiques dans les élevages bovins laitiers ainsi que les différents facteurs favorisant leurs apparition et leurs développement car ces mammites sont sous estimées dans notre pays. A cet effet, nous nous sommes intéressé à cette affection en menant une

étude dans quelques élevages bovins laitiers de la région de Sidi Lahcène, wilaya de Sidi BelAbbes, par la distribution aux vétérinaires praticiens de la région d'un questionnaire afin de cerner cette pathologie et par la réalisation d'échantillons de lait et d'écouvillons dans les élevages bovins laitiers ciblés pour des analyses mycologiques afin d'identifier les levures responsables et de déterminer la prévalence de cette affection dans les élevages bovins laitiers visés.

Les objectifs de notre étude sont :

- Identifier les différents genres et espèces de levures impliquées dans l'infection de la glande mammaires chez les bovins de la région de Sidi Lahcène, wilaya de Sidi BelAbbes.
- Etudier quelques facteurs de risques favorisant cette infection.
- Evaluer la prévalence de ces levures dans l'infection mammaire chez les bovins.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. RAPPELS SUR LES MOYENS DE DEFENSE DE LA MAMELLE

I.1. Le canal du trayon

L'anatomie du canal du trayon permet d'obstruer hermétiquement l'extrémité distale de la mamelle. Cette première barrière est présente en continu sauf lors de la traite et pendant 30 à 60 minutes après celle-ci, où la mamelle est particulièrement sensible aux infections. De plus, de cette conformation l'épithélium du canal produit en continu, de la kératine qui vient occuper la lumière du canal. Il a été démontré qu'elle fixait les germes jusqu'à leur expulsion lors de la traite.

Une détérioration du canal du trayon et particulièrement de son sphincter (hyperkératose) ou simplement un diamètre naturellement plus important sont des facteurs de risques reconnus de nouvelles infections, ce qui montre l'importance de cette barrière passive (**REMY D., 2007 ; SMITH B.P., 2008**).

I.2. Les défenses cellulaires

La mamelle saine contient peu de cellules, ce sont principalement des macrophages (66-88%) ainsi que des lymphocytes, des cellules épithéliales desquamées, et quelques polynucléaires :

Tableau n°1 : Répartition des différentes populations cellulaires du lait en l'absence d'infection (**SERIEYS, 1985 ; MEUNIER, 1999 ; SMITH, 2008**).

Type cellulaire	Pourcentage
Polynucléaires	0 à 11%
Macrophages	66 à 88%
Lymphocytes	10 à 27 %
Cellules épithéliales	0-7

Lors d'infection, les lésions du tissu sécrétoire provoquent l'afflux massif de polynucléaires neutrophiles sanguins dans la glande par diapédèse. Ces derniers deviennent alors le type de cellule majoritaire dans le lait. Ils représentent de 50% des cellules lors d'une infection modérée, à 90% lors de mammite aiguë. Les polynucléaires, de par leur capacité de phagocytose, constituent la principale défense de la mamelle contre les infections. Leur capacité à phagocyter les germes est réduite par rapport aux polynucléaires sanguins. L'afflux massif de polynucléaires modifie profondément la qualité de la sécrétion : le lait contient des caillots de fibrine et des grumeaux. (**SERIEYS, 1985**).

Ainsi, on s'aperçoit que les principales cellules luttant contre l'installation de l'infection sont les macrophages alors que ce sont les neutrophiles qui luttent contre l'infection une fois qu'elle est établie.

Les macrophages phagocytent les germes et présentent les anticorps aux lymphocytes T, qui vont alors sécréter des cytokines, et acquérir leurs capacités : cytotoxique et mémoire.

Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en cellules mémoires.

Les polynucléaires neutrophiles sont essentiels à l'élimination des germes. Leur réponse à l'infection peut être séparée en quatre phases : le recrutement, la phagocytose, la destruction intracellulaire des germes, et l'apoptose. (MEUNIER, 1999 ; SMITH, 2008).

Le recrutement des neutrophiles repose sur la libération de substances chimiotactiques, dont les deux plus importantes sont l'interleukine 8, et le facteur 5a du complément, sécrétés par les macrophages et les cellules épithéliales. Les polynucléaires migrent ainsi par diapédèse depuis le sang selon le gradient chimiotactique. La vitesse à laquelle se déroule cette phase conditionne la sévérité et l'évolution de l'infection. Les neutrophiles sont activés par la diapédèse et les substances chimiotactiques, ce qui se traduit par l'expression à leur surface de récepteurs membranaires facilitant la phagocytose.

Mais le plus important de ces récepteurs est celui qui se lie à l'extrémité Fc des immunoglobulines, permettant la phagocytose des germes qui sont opsonisés. Il faut noter que les neutrophiles sont moins efficaces dans le lait que dans le sang. En effet la présence de globules gras gêne la formation des pseudopodes lors de la phagocytose, ainsi que la lyse intracellulaire du germe. Les molécules responsables de la lyse des germes sont, entre autres, des radicaux libres (anion super oxyde), la myéloperoxydase, des bactéricines, des défensines et l'hypochlorite... Ces molécules possèdent un large spectre antibactérien et antifongique.

Une fois l'infection circonscrite, les neutrophiles subissent l'apoptose et les fragments qui en résultent sont phagocytés par les macrophages.

Il semble que les cellules épithéliales interviennent aussi dans les mécanismes de défense en produisant des molécules chimiotactiques. (MEUNIER, 1999 et SMITH, 2008).

I.3. Les défenses non cellulaires

Elles comprennent les molécules à activités antimicrobiennes présentes dans la mamelle, le **complément** et les **immunoglobulines**. Les immunoglobulines sont en faible concentration dans le lait sain, mais leur concentration augmente rapidement lors d'une infection. Elles proviennent de la synthèse dans la mamelle par les plasmocytes, et majoritairement de la circulation

sanguine, ce qui est permis par l'augmentation de perméabilité des cellules épithéliales et des jonctions serrées qui les relient lors d'une inflammation. Elles ont pour fonction d'opsoniser les bactéries, de neutraliser les toxines ou de se fixer sur les récepteurs bactériens impliqués dans l'adhérence aux cellules épithéliales. (REMY, 2007 et SMITH, 2008).

Le complément est présent en très faible concentration dans la mamelle mais peut jouer un rôle important de part sa précocité d'action sur les souches dites séro-sensibles, qui sont cependant assez rares parmi les germes responsables de mammites (MEUNIER, 1999).

Parmi les molécules à activité antimicrobienne présentes dans la mamelle, les plus importantes sont les lactoferrines (et son homologue sanguin, la transferrine dont la concentration est faible dans la mamelle (MEUNIER, 1999)). Elles séquestrent le fer, ce qui inhibe la croissance des bactéries qui ont besoin de cet élément pour se multiplier. Elle agit aussi en détruisant la membrane cellulaire des bactéries. On peut aussi citer le lysozyme, les lactopéroxydases et la xanthine qui ont aussi une activité antimicrobienne. Comme les immunoglobulines, elles sont en faible concentration dans une mamelle saine, mais augmentent rapidement suite à une infection, par synthèse au niveau des cellules épithéliales. De plus dans le lait sain la présence de citrate inhibe leur activité, alors que dans le lait de mammites, beaucoup moins riche en citrate, elles retrouvent leur activité. Leur rôle est plus important durant la période sèche.

I.4. Particularité de la période sèche

La compréhension des changements qui ont lieu pendant la période sèche est essentielle pour expliquer l'épidémiologie des infections mammaires. En effet pendant cette période on observe dix fois plus de nouvelles infections que lors de la lactation.

Ainsi, même pendant le tarissement, on observe des variations de la sensibilité de la mamelle aux infections. Ces observations sont dues à des **modifications de l'importance relative des défenses de la mamelle.** (BRADLEY, 2004)

En effet, le canal du trayon est scellé pendant la période sèche par un bouchon de kératine, mais ce bouchon prend plusieurs jours pour se former et disparaît sept à dix jours avant le vêlage. Les variations dans la vitesse de mise en place de ce bouchon peuvent expliquer en partie les sensibilités individuelles aux nouvelles infections. En effet à 10 jours on observe 50% des animaux qui n'ont pas encore de bouchon fonctionnel, et 5% des vaches n'auront toujours pas de bouchon à 60 jours.

Pendant la période sèche, on observe une diminution de la concentration en citrate ainsi qu'une augmentation de la concentration en lactoferrine (passant de 20 à 200µg/ml pendant la lactation à 10 mg/ml pendant la période sèche (MEUNIER, 1999) qui est donc plus active que pendant la lactation.

De par la diminution du volume des sécrétions présentes dans la mamelle durant la période sèche, on observe une augmentation de la concentration en leucocytes. De plus il y a moins de globules gras, et de caséine qui inhibent en partie l'activité des phagocytes.

Ces modifications qui augmentent la résistance à la mamelle, mettent cependant plusieurs jours à se mettre en place, alors que la traite avec son effet de flush des germes est arrêtée, ce qui explique pourquoi la phase d'involution de la mamelle est particulièrement à risque. Pendant la phase de colostrogénèse, on observe une évolution inverse avec une disparition du bouchon de kératine, une dilution des leucocytes et le retour des globules gras et de la caséine, ce qui explique pourquoi cette phase est aussi à risque.

II. DESCRIPTION CLINIQUE DES MAMMITES

II.1. Les mammites cliniques

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

II.1.1. Mammite 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 mammite 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 mammite 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 peut conduire généralement à la mort en l'absence de traitement.

II.1.2.Mammite 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 (mammite subaiguë) à très faibles (mammite aiguë). En l'absence de traitement ce type d'infection évolue généralement à la chronicité.

II.1.3.Mammite chronique

Faisant toujours 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.

II.2.Les mammites sub-cliniques

Elle est par définition asymptomatique, la sécrétion est macroscopiquement normale : seul un comptage des cellules somatiques du lait ou 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.

III. FACTEURS IMPLIQUES DANS LES MAMMITES FONGIQUES

Trois facteurs essentiels ont été impliqués dans les infections mammaires chez la vache. Le **germe** est considéré comme **l'agent déterminant** tandis que **l'animal** et son **environnement** sont jugés comme des **facteurs favorisants**.

III.1. L'AGENT DETERMINANT

III.1.1.Les levures impliquées lors de mammites fongiques

Les mammites à champignons sont imputables à 3 genres : *Candida* (*C. krusei*, *C. albicans*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. kefir*), *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* (*C. neoformans*, *C. lactativirus*).

Les champignons sont ubiquistes dans l'environnement. Certains aliments de la ration telles les pulpes fraîches de sucreries (*Candida krusei*) peuvent en renfermer de grandes quantités. L'apparition de mammites à champignons présuppose une infection bactérienne préexistante, un traitement antibiotique préalable et un nombre important de germes.

L'infection apparaît en moyenne 4 à 10 jours après la contamination. Les infections à champignons sont à suspecter lorsque les traitements intra-mammaires apparaissent inopérants

ou ont été effectués sans avoir respecté les mesures d'hygiène habituelles (**BURVENICH et al.1995**).Elles ont pour source l'environnement et en particulier l'alimentation, la peau, les fèces des animaux, le sol et les plantes. L'infection a généralement lieu lors d'injection intramammaire avec une seringue ou un produit contaminé d'où l'importance de la désinfection de la peau et de l'entrée du canal du trayon lors de toute injection intra mammaire.

III.1.1.1.Le genre *Candida*

Les infections par *Candida* sont les plus fréquentes. Ce champignon utilise les pénicillines et les oxytétracyclines injectées comme source d'azote. Les lésions sont habituellement limitées à la citerne et les signes locaux peu marqués. L'infection est généralement bénigne et régresse en l'espace d'une semaine.

L'auto-guérison sans traitement anti-infectieux est possible pour autant que la fréquence des traites soit augmentée. Les champignons sont habituellement résistants aux antibiotiques mais sensibles aux dérivés iodés. (**BURVENICH et al.1995**)

Candida s'est révélé sensible au clotrimazole, à la nystatine, à la polymyxine B, au miconazole. La prophylaxie médicale veillera à intensifier la qualité hygiénique des traitements intramammaires.

Certains praticiens préconisent le recours à la traite fréquente combinée à l'injection d'Anti inflammatoire non stéroïdien pendant 2 à 3 jours.

L'application locale d'un onguent à base de salicylate de méthyl, menthol ou eucalyptol est également conseillée. Une amélioration peut être observée rapidement ou prendre 15 jours. (**BURVENICH et al.1995**)

A. Morphologie

Le genre *Candida*, qui comprend 196 espèces (**KOENIG, 1995**), rassemble des levures non pigmentées formant des colonies blanches crémeuses. Leur forme est variable: globuleuse, ovoïde, cylindrique ou allongée.

Les caractères morphologiques des *Candida* varient selon les espèces et peuvent dépendre du milieu de culture.

B. Écologie

Les *Candida* sont habituellement commensaux des muqueuses et de la peau (**DEEPA al., 2015 ; EL-KIRAT-CHATEL , 2010**) ou peuvent être des espèces environnementales. (**EL-KIRAT-CHATEL, 2010**).

Cas particulier : *Candida albicans* :

Candida albicans est considéré chez l'homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne (**FINKELMAN, SHEA-DONOHUE et al., 2004 ; HEYDECK , THOMAS et al., 1998**).

Au niveau des muqueuses digestives et vaginales, la levure se présente sous forme de blastospores, considérées comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme hôte. En revanche, lorsque le délicat équilibre entre la forme commensale et les défenses immunitaires est rompu, cette étroite symbiose se transforme en parasitisme.

Au niveau des tissus infectés, *Candida albicans* est retrouvé simultanément sous les formes de blastospores et de mycéliums. Alors que la forme blastospore reste non-invasive, la forme mycélienne est capable de pénétrer les muqueuses.

Candida albicans est une levure qui n'est jamais présente sur la peau saine et dans l'environnement à moins d'une contamination par l'homme ou l'animal. Son seul habitat est les muqueuses (**PRAMAYON, 2001**) (D'après <http://www.arnobio2.com>).

C. Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence

Le passage de l'état saprophyte à l'état pathogène chez les levures *Candida* dépend de la balance entre les capacités de colonisation de la levure, l'expression de facteurs de virulence et le contrôle par les défenses du système immunitaire. (**EL-KIRAT-CHATEL, 2010**).

L'adhérence de la levure à la cellule hôte par l'intermédiaire d'adhésines constitue la première étape de l'invasion (**CALDERONE et al., 1994**). La transition morphogénétique levure-(pseudo)filament et la sécrétion de protéases et de phospholipases permettent alors aux *Candida* spp. d'envahir les tissus (**NAGLIK et al., 2004**).

Cas particulier : *Candida albicans*

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en 12 chromosomes (**EZEKOWITZ et al., 1991**) se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (**KABHA et al., 1995**) formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

Morphologiquement, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre

Candida albicans (COSTE A. et al., 2003). Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés:

- La forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4 μm avec parfois un bourgeon de formation.
- La forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600 μm de longueur et 3 à 5 μm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien (COSTE et al., 2003 ; CLOHISY et al., 1987). Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants (SCHREIBER ; PERKINS et al., 1993).
- La forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (RAVEH ; KRUSKAL et al., 1998).

Sous certaines conditions environnementales extrêmes en termes de milieu et de température, *Candida albicans* peut aussi former des chlamydospores, qui sont des structures terminales ou latérales arrondies. Elles sont formées par épaissement du thalle, mesurent deux fois la taille du blastospore et possèdent une paroi plus épaisse. Les chlamydospores sont la forme de résistance de *Candida albicans* et participent à l'identification du champignon en laboratoire. Elles sont rarement mises en évidence *in vivo* (COSTE et al., 2002)(fig. 1).

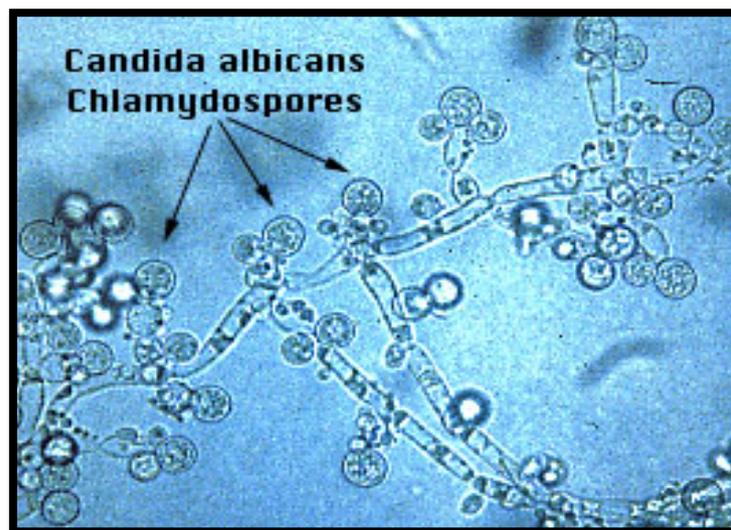


Figure n°1 : Les chlamydospores chez *Candida albicans* (flèches) (D'après

<http://www.medschool.lsuhs.edu>

Toutes ces transitions morphologiques se mettent en place en réponse à des changements des conditions environnementales et permettent ainsi au champignon de s'adapter à différentes niches biologiques (**fig. 2**).

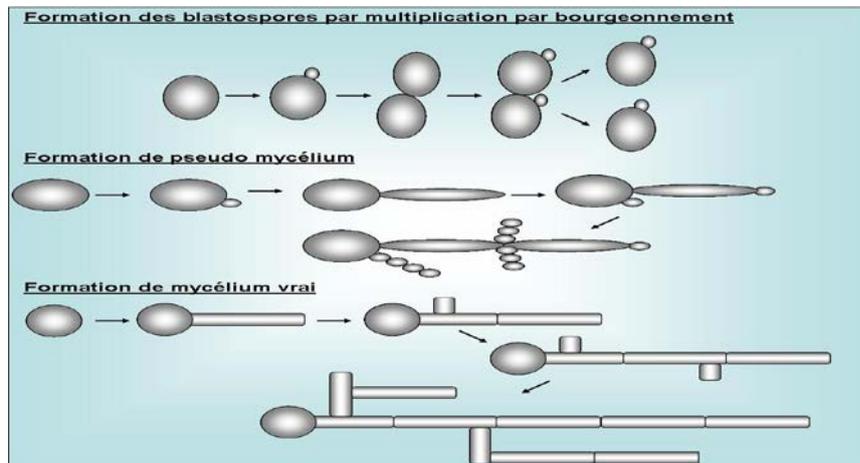


Figure n°2 : Morphologie de *Candida albicans* (ODDS , 1988).

De façon générale, le rôle infectieux de *Candida albicans* pathogène opportuniste (Fig. 2), semble être favorisé par une combinaison de facteurs liés aux statuts immunologique et physiologique de l'hôte, ainsi qu'à des facteurs liés au microorganisme, plutôt qu'à un facteur de virulence unique. Les infections candidosiques sont probablement initiées par une diminution des défenses de l'hôte qui modifie l'équilibre de commensalisme au profit de la levure, et entraîne le basculement du stade de colonisation à celui de l'infection. La séquence des évènements qui contribuent à l'installation de *Candida albicans* chez son hôte peut se résumer en trois étapes clés ; **l'Adhérence** et colonisation, **Invasion** au niveau des tissus et la **Multiplication** et survie chez l'hôte. (LAGANE, 2007).



Figure n°3 : colonies de *Candida albicans* (D'après <https://www.mikrobiologia-aordycz.blogspot.com>)

Plusieurs facteurs de virulence ont été proposés

- **L'adhérence aux surfaces** : elle peut se faire au niveau des muqueuses, mettant en jeu des interactions spécifiques de type ligand /récepteur avec les mannoprotéines de la paroi de la levure. On parle d'adhésines. (EDENS et al., 1999).

-**La formation de mycéliums vrais et de pseudomycéliums** : en général, le passage de la forme levure à la forme plus ou moins filamenteuse est associé à la virulence. Les tubes germinatifs (Fig.02), structures intermédiaires entre le blastospore et le mycélium augmentent l'adhérence aux cellules épithéliales et favorisent la colonisation (EDENS et al., 1999) en induisant la propre endocytose du pathogène (VILLEGAS et al., 2004 ; TONTONNOZ et al., 1998). Par la suite, la production d'hyphes augmente l'invasion et la destruction tissulaire (TONTONNOZ, SPIEGELMAN et al., 1995).

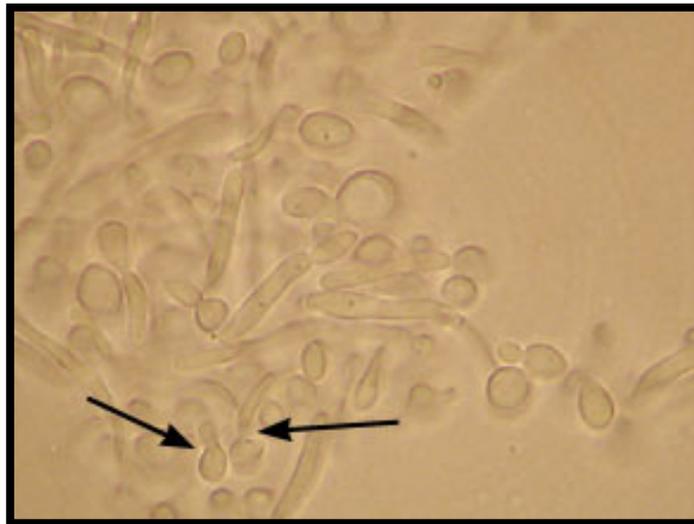


Figure n°4 : *Candida albicans* incubée à 37°C dans du sérum de lapin (test de germination). Les tubes germinatifs (flèches) représentent le début de la formation des vrais hyphes (pas de constriction) (D'après [https://www. Flabmed.ucsf.edu](https://www.Flabmed.ucsf.edu)).

- **L'interférence avec la phagocytose** : *Candida albicans* est capable de produire des peptides acides pouvant inhiber la liaison aux phagocytes et le métabolisme oxydatif. De plus, la levure peut induire l'apoptose des macrophages et des neutrophiles échappant ainsi aux cellules du système immunitaire (HUANG et al., 1999 ; BERRY et al., 2007).

- **L'interférence avec le complément** : les adhésines fongiques (mannoprotéines), apparentées au récepteur CR3 des lymphocytes, peuvent être affines pour certains composants matriciels plasmatiques tels que la fibronectine, mais aussi la fraction C3bi du complément, perturbant ainsi la phagocytose de la levure.

- **Les enzymes** : la sécrétion d'enzymes hydrolytiques au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires (SERGHIDES et KAIN, 2001). Ces enzymes sont des aspartyl protéinases (Saps) (CHAWLA et al., 2001) , des phospholipases (AKIYAMA et al., 2002) et des lipases. (KAUL et ANANDET, 2003).

III.1.1.2. Le genre *Cryptococcus*

A. Morphologie et aspects culturels

Les cryptocoques sont affiliés aux basidiomycètes. Ce sont des levures sphériques ou ovalaires entourées d'une capsule polysaccharidique d'épaisseur variable conférant un aspect muqueux aux colonies et un pigment caroténoïde les colorant du beige à l'ocre. Par contre, le pseudomycélium est absent.

Les cryptocoques se reproduisent par bourgeonnement et possèdent toutes une uréase (CHABASSE D. et al., 1999). Il y a une seule espèce qui est pathogène : *Cryptococcus neoformans*. Son habitat naturel est le sol (surtout enrichi en fientes d'oiseaux : le pigeon).

Cas particulier : *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans : est une levure sphérique d'un diamètre de 4 à 6 µm qui produit une capsule (Fig.5), ce qui porte son diamètre à 25 µm ou plus (SHEA Y.R., 2007, DALE D.C. et al., 2007) *Cr. neoformans* produit en général un seul bourgeon qui se sépare une fois la maturation achevée (SHEA Y.R., 2007). Cet organisme existe sous forme de levure dans l'environnement (SCHELL W. A., 2006).

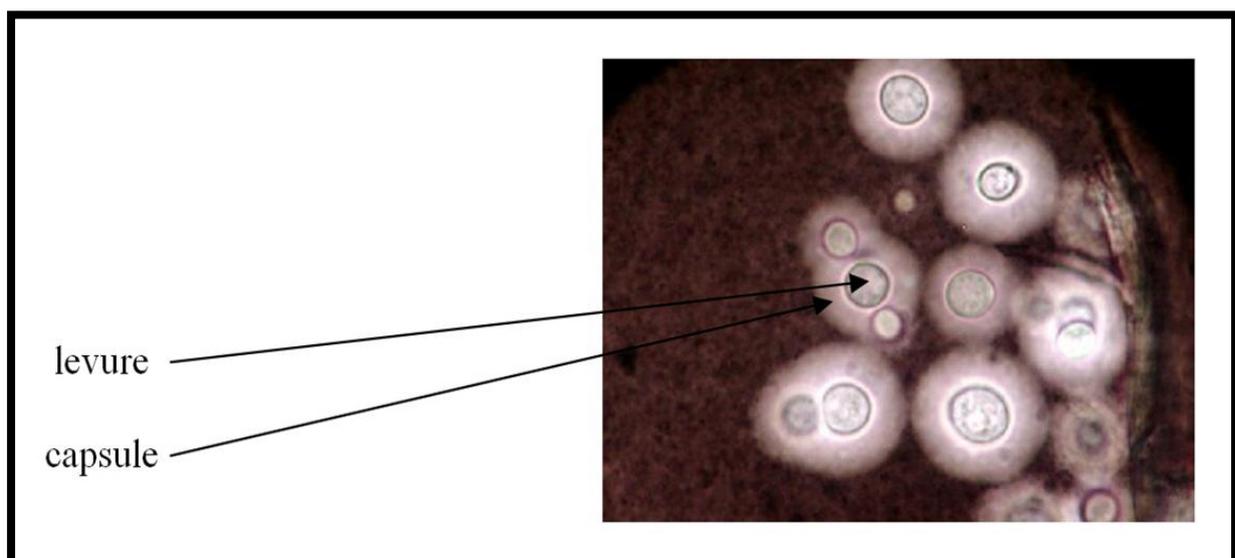


Figure n° 5 : aspect microscopique des levures de *Cryptococcus neoformans* (D'après www.microbiologie.medicale.fr (VERON Brigitte))

. B. Caractéristiques physiologiques

Cr. neoformans est la seule espèce à produire une uréase et une phénoloxydase. L'activité uréasique est caractéristique des basidiomycètes tandis que la phénol-oxydase est une enzyme membranaire spécifique de *Cr. neoformans* catalysant l'oxydation des diphenols en pigment mélanique. (KOENIG, 1995)

C. Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence

Cr. neoformans est capable de se développer à 37°C ce qui lui confère son rôle pathogène chez l'animal. Le diagnostic de genre est fait par recherche de l'uréase sur milieu urée-indole qui vire de l'orangé au rose-fushia en moins de 4 heures.

Le rôle pathogène de *Cr. Neoformans* est d'autant plus important que sa rémanence dans la mamelle, le lait et les produits laitiers peut s'échelonner sur sept (07) ans. (MORGANTI et SANGUINITTI, 1976)

Contrairement aux fréquentes guérisons spontanées rencontrées pour les autres genres, celle concernant *Cryptococcus* est très rare .L'infection à Cryptocoque est la seule engendrant des symptômes généraux d'envergure, pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal atteint. (POUDEN W.D.et al., 1952)

D. Diagnostic mycologique

-Examen direct

L'examen au microscope est réalisé après coloration à l'encre de chine diluée au 1/5ème qui en teintant le fond en noir permet la visualisation de la capsule polysaccharidique. Celle-ci apparaît alors comme un halo blanc bien visible.

-Recherche de la pathogénicité chez la souris

Après inoculation intracérébrale d'une suspension de levures, la souris meurt en une à deux semaines s'il s'agit de *Cr. neoformans*. L'examen du cerveau à l'encre de chine fait apparaître les levures encapsulées. Cette recherche peut être utile pour confirmer la pathogénicité de certaines souches. (CRISTELE SAS-NICOLAS, 2001).

E. Diagnostic différentiel avec d'autres infections à levure

Il sera établi sur un ensemble d'arguments :

- Levure plus grosses que *Candida*, ronde, avec plusieurs bourgeonnements latéraux possibles et une volumineuse capsule polysaccharidiques ;
- Sur Gélose Sabouraud, en 48 heures, on obtient des grosses colonies, muqueuses, ocre (Fig.04).

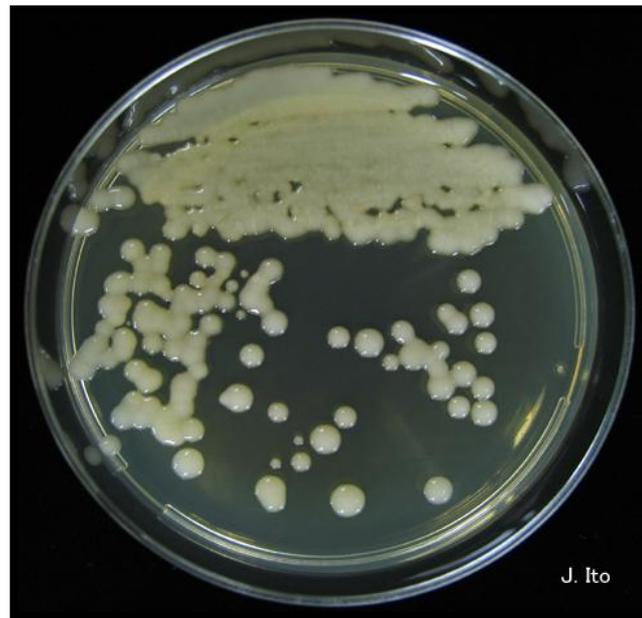


Figure n°6 : Aspect macroscopique des colonies de *Cryptococcus* sp. (D'après <https://www.studyblue.com>).

Remarque : les chromogènes n'ont pas été mis au point pour les *Cryptococcus*.

- Les galeries miniaturisées permettent l'identification de *Cryptococcus*. Le caractère Uréase est positif en moins de 30 minutes.

- Il possède un antigène polysaccharidique de type mannane (différent de *C. albicans*).

Il peut être soluble et il peut être recherché dans des liquides biologiques à l'aide de particule de latex sensibilisés par des anticorps anti-*Cryptococcus*. (D'après <http://www.arnobio2.com>) (Arnaud Delahave).

III.1.1.3. Le genre *Trichosporon*

A. Morphologie et aspects cultureux

Cette levure présente des aspects morphologiques différents selon que l'on observe en lésion ou en culture. En lésion, elle se présente sous forme d'arthrospores polygonales de 3 à 6 μ . En culture, on retrouve des formes blastosporées ou des filaments septés (Fig. 7) (**RICHARD et al., 1980**).

Les arthrospores se forment par désarticulation d'une partie des hyphes à son extrémité.

Pousse sur milieu de Sabouraud sans Actidione® (certaines espèces y sont sensibles). Les colonies sont plissées et plus ou moins sèches.

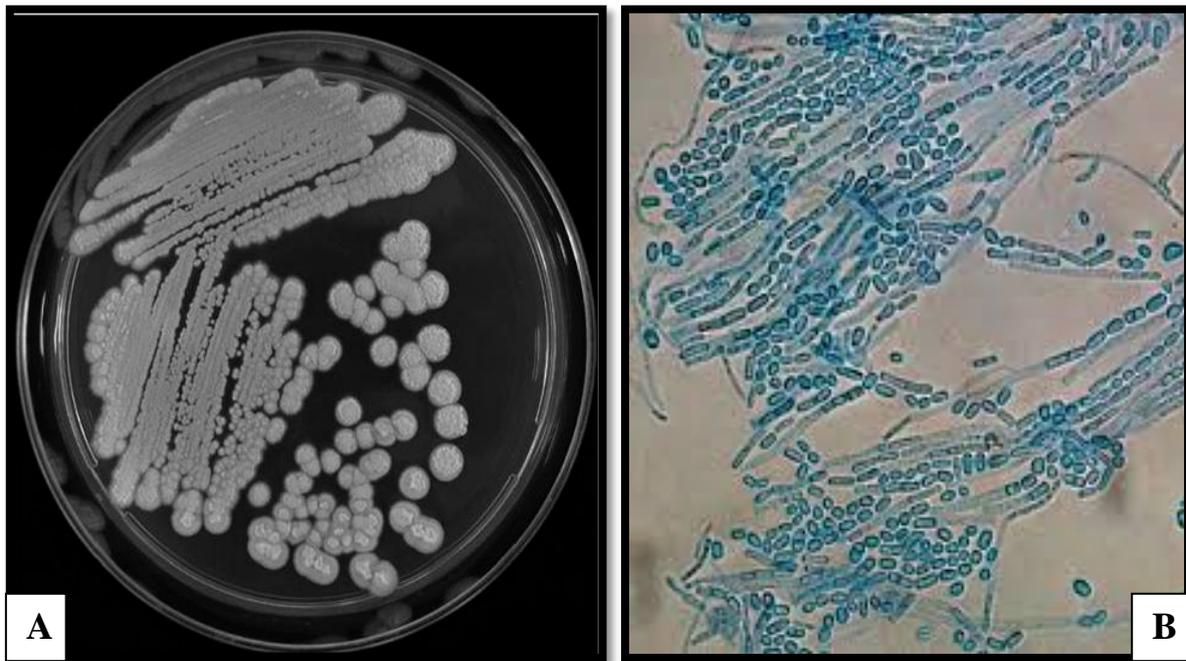


Figure n°7 : (A) : aspect macroscopique des colonies du genre *Trichosporon*; (B) : aspect microscopique des levures de *Trichosporon* (QUESADA et al., 1995).

B. Ecologie

Les levures du genre *Trichosporon* sont largement répandues dans la nature, saprophytes du sol, du bois, des fruits, des matières fécales. *Trichosporon cutaneum* a été mis en évidence sur la peau saine en région périnéale (KELLER et al., 2000).

C. Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence

Trois espèces pathogènes principales ; *Tr. beigeli*, *Tr. cutanium* et *Tr. capitatum*. MURPHY et DRAKE ,1947 ont reproduit expérimentalement un cas de mammite à *Tr. granulosis* (FORTIER , 1990). La mammite à *Trichosporon* est clinique et aigue ; la guérison spontanée des vaches atteintes de ces mammites semble se produire au bout de 8 à 12 jours (FORTIER, 1990).

D. Caractéristiques physiologiques

Les *Trichosporon* assimilent des sucres divers, résistent ou non à l'actidione aux concentrations de 0,1 p.1000 ou 1p.1000 mais aucune espèce ne fermente les sucres et toutes produisent une uréase (EUZEBY , 1994).

E. Diagnostic mycologique

Les colonies de *Trichosporon* ont un aspect poudreux, farineux ou cérébriforme et une coloration crème. Selon les espèces, les *Trichosporon* supportent des températures d'incubation variant de 25°C à 42°C (EUZEBY, 1994).

III.1.1.4. Le genre *Rhodotorula*

A. Morphologie et aspects culturels

Les levures du genre *Rhodotorula* sont globuleuses, ovoïdes ou allongées, mesurant de 6 à 8 μ \times 3 à 4 μ à bourgeonnements multiples, polaire et latéral. Ces levures sont parfois enveloppées d'une mince capsule qui leur confère une apparence mucoïde. Les cultures se développent facilement sur milieu Sabouraud à 38°C et même en présence d'actidione. Les colonies sont luisantes, de couleur corail au saumon à revers crème (Fig.8). On n'y observe que très rarement des filaments (FAMEREE, et al., 1970 ; EUZEBY, 1994).

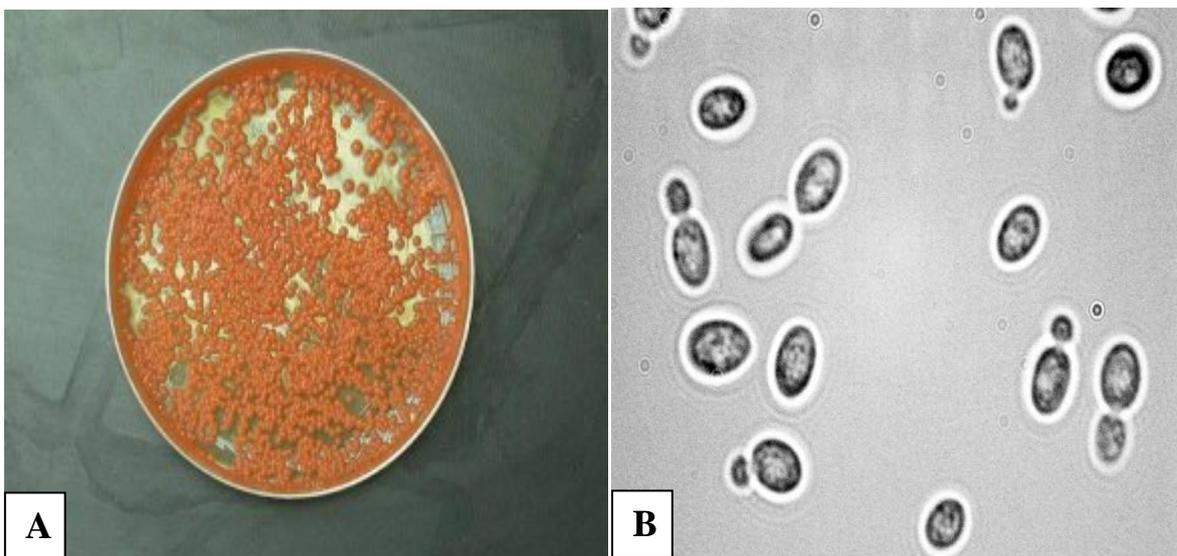


Figure n°8 : (A) Aspect macroscopique des Colonies du genre *Rhodotorula*; (B) aspect microscopique des levures de *Rhodotorula* (QUESADA M. et al., 1995).

B. Ecologie

Levure très répandue dans la nature, retrouvée au niveau du sol, dans l'air, l'eau, les aliments. Elle est habituellement saprophyte chez l'homme.

C. Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence (EUZEBY, 1994).

Les *Rhodotorula* sont souvent isolées chez l'homme et les animaux, du tégument, voire du sang mais ne sont généralement pas pathogènes.

Du point de vue physiologique, les *Rhodotorula* assimilent divers sucres, selon les espèces. Elles n'assimilent pas l'inositol et ne synthétisent pas l'amidon. Elles n'ont aucun pouvoir fermentatif mais secrètent une uréase (**EUZEBY J, 1994**).

C. Diagnostic mycologique

Repose sur :

- La présence de levures ovoïdes à l'examen direct.
- L'obtention de colonies pigmentées en rose à rouge orangé sur milieu de Sabouraud sans Actidione.
- L'absence de pseudomycélium sur RAT ou PCB (ou très réduit).
- La présence d'une uréase.

III.1.2. Physiologie et Croissance des levures

III.1.2.1. Les besoins nutritifs

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans son milieu externe les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physicochimiques favorables.

III.1.2.1.1.Sources de carbone

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les levures, puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques etc. (**BOTTON, 1991**). Les levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie.

Les sources les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées (**Pol, 1996**). D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles ; elles sont capables d'oxyder des acides organiques et les alcools (éthanol, Glycérol) (**OTENG-GYANG, 1984**).

III.1.2.1.2.Sources d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques pour la biosynthèse d'acides aminés, de protéines, d'acides nucléiques et de vitamines (**LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1997 ; GUIRAUD, 1998**). Les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Par ailleurs, l'assimilation des ions d'ammoniums est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques) (**WALKER et al., 1997 et BOUIX et LEVEAU, 1999**).

III.1.2.1.3.Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (**LARPENT-GOURGAUD et SANGLIER, 1992**). De plus, d'autres facteurs leur sont essentiels comme les vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique) qui interviennent lors des réactions enzymatiques, comme des coenzymes (**BOTTON et AL., 1990**).

III.1.2.2. Les conditions physicochimiques de croissance

III.1.2.2. 1.La température

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. Toutefois, ces températures ne sont pas rigoureusement les températures optimales de croissance que les levures trouvent dans leurs habitats naturels (**LEVEAU et BOUIX, 1993**). En effet, la température maximale de croissance peut se situer entre 35°C et 45°C. D'autres levures peuvent se développer à 0°C (**OTENG-GYANG, 1984**) ou à plus de 50°C pour *Candida Slooffii*, *Saccharomyces telluris* et *Torulopsis bovina*. (**BOURGOIS et al., 1988 ; LEVEAU et BOUIX, 1993**).

III.1.2.2.2.Le pH

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides et par leurs activités métaboliques (la respiration et la sécrétion d'acide organique) acidifiant encore plus le milieu. Leur croissance optimale se fait à des pH entre 4,6 à 6,5 et beaucoup d'espèces tolèrent de grandes variations de pH. Elles peuvent s'adapter à des milieux acides (pH 2,8 à 3,0) ou alcalins (pH 8 à 8,5) (**BOURGOIS et al., 1988 ; LARPENT et LARPENT GAURGAUD, 1997**).

III.1.2.2.3.La pression osmotique et l'activité d'eau

La pression osmotique intervient également sur le développement des levures dont l'effet varie d'une souche à une autre. La plupart des souches ne peuvent pas se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées correspondant à une activité de l'eau de l'ordre de 0,60 mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérantes (**LEVEAU et BOUIX, 1979 ; LARPENT et LARPENT GAURGAUD, 1997**) car elles sont capables de synthétiser des osmoprotecteurs (betaine, glycérol).

III.1.2.2.4.L'oxygène

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les genres :

Rhodotorula, *Lipomyces*, *Cryptococcus* etc. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire (comme les *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces*) soit respiratoire (comme les *Candida*, les *Kluyveromyces*, la plupart des *Pichia* et des *Hansenula* et quelques *Torulopsis*) (BOUIX et LEVEAU, 1991).

III.1.2.3. Le métabolisme

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés. Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif conduisant à la formation de CO₂ et H₂O (POL, 1996). La voie de dégradation des glucides étant la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate, l'entrée dans cette voie varie selon le glucide tandis que la destinée du pyruvate dépend à la fois du sucre utilisé et de l'espèce de levure considérée.

En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolisme (BOTTON, 1991) :

III.1.2.3.1. Métabolisme oxydatif : les levures utilisant le glucose en présence d'oxygène, par conséquent, leur métabolisme est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (LARPENT, 1991).

III.1.2.3.2. Métabolisme fermentaire : en plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂.

En plus de ces composés majoritaires, des alcools, des aldéhydes, des esters, des acides sont formés en plus petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (GUIRAUD et ROSEC, 2004).

III.1.2.3.3.L'intelligence de la levure

Les levures ont besoin de carbone organique, source d'énergie. A cet égard, ce sont les sucres que les levures préfèrent. L'énergie est extraite des molécules de sucres lors de réactions chimiques complexes dont il existe deux grands types, **la respiration** et les **fermentations**, la

première ayant un meilleur rendement mais nécessitant de l'oxygène (D'après <http://www.didier-pol.net/1IND-LEV.html>).

Les levures possèdent d'étonnantes capacités d'adaptation. Lorsqu'il y a de l'air, elles respirent, lorsqu'il n'y en a pas elles fermentent. De plus, elles peuvent non seulement s'adapter à l'absence d'oxygène, mais aussi au type de sucre disponible. Ainsi, si le glucose est leur aliment préféré, en son absence elles savent utiliser d'autres sucres comme le saccharose ou le maltose.

Le fonctionnement de toute cellule obéit à un principe d'économie. Pour utiliser un sucre, la cellule doit fabriquer toute une série d'**enzymes** spécifiques et, parallèlement, elle ne doit pas produire inutilement les enzymes correspondant à des sucres absents du milieu. Leur fabrication gaspillerait de l'énergie en pure perte. Ainsi, lorsque l'on donne du glucose aux levures, elles ne fabriquent pas les enzymes nécessaires à l'utilisation du saccharose ou du maltose. Ces phénomènes résultent d'un contrôle s'exerçant au niveau des gènes codant les enzymes du métabolisme des sucres. En présence de glucose, les gènes codant les enzymes nécessaires à l'utilisation du saccharose ou du maltose sont réprimés par un signal chimique intracellulaire et les enzymes qu'ils codent ne sont pas fabriquées. On parle alors de **répression catabolique**. Inversement, si un sucre différent du glucose est fourni, un autre signal chimique intracellulaire déclenche la mise en activité des gènes correspondants. C'est l'**induction enzymatique** (D'après <http://www.didier-pol.net/1IND-LEV.html>).

Ce type de contrôle métabolique au niveau génétique est d'une très grande efficacité. Il permet aux cellules de s'adapter rapidement à un changement de milieu sans gaspillage énergétique (D'après <http://www.didier-pol.net/1IND-LEV.html>).

III.2. FACTEURS FAVORISANTS

III.2. 1.L'animal

L'apparition d'une mammite résulte la plupart du temps d'une modification de l'équilibre naturel existant entre d'une part la sensibilité naturelle physiologique et morphologique de la glande mammaire à l'infection et d'autre part les mécanismes de défense active et passive propres à cet organe. Cet équilibre est susceptible d'être modifier aux trois stades successifs du processus infectieux à savoir la pénétration, l'installation et la multiplication du germe. (**ANDERSON, 1978; CRAVEN et WILLIAMS, 1985; WATSON, 1992; BURVENICH et al., 1995**)

III. 2.1.1. Facteurs de sensibilité

III.2.1.1.1. Numéro de lactation

La fréquence des infections augmente avec le nombre de lactation des animaux. Cette observation est imputable aux modifications morphologiques de la glande mammaire avec l'âge. Elle conduit à l'idée que les vaches âgées (plus de 4 lactations) donc vraisemblablement infectées auparavant, sont incapables de développer une immunité locale efficace. Il existe une relation certaine entre l'âge de l'animal et son statut sanitaire : plus il est âgé, plus grands sont les risques qu'il soit infecté. En fait, les explications de cette observation sont nombreuses. Elle peut traduire, pour l'animal, l'augmentation de la probabilité, avec le temps, de rencontrer un germe pathogène ; elle peut traduire aussi l'augmentation de la réceptivité de cet animal (diminution de l'efficacité du canal du trayon en temps que mécanisme de défense). Il est également connu que l'activité des polymorphonucléaires est plus élevée chez les primipares. **(OLIVER et al., 1990; EBERHART, 1986).**

III.2.1.1.2. Stade de lactation

L'étude de la dynamique des infections mammaires selon le stade de lactation montre 3 périodes distinctes au cours du cycle lactation /tarissement d'un animal **(OLIVER et al., 1990, EBERHART, 1986) :**

a. Le peripartum

Il comprend les 15 jours précédant et suivant le vêlage. Pendant cette période, on constate une augmentation de la sensibilité de la glande mammaire (reprise de la lactation, disparition de la sécrétion de la période sèche), ainsi qu'une augmentation de la pression pathogène liée aux germes d'environnement (mauvaises conditions hygiéniques du vêlage). On peut observer, à cette période, une incidence plus forte des infections d'environnement par rapport aux autres périodes de la lactation, ainsi qu'une incidence plus forte des cas cliniques liés aux infections de la lactation précédente, non éliminées lors du tarissement, et qui ont pu persister pendant toute la durée de la période sèche.

La diminution de la fonction immunitaire ainsi que de la migration leucocytaire dans la glande mammaire au cours des premiers jours du post-partum contribuent à faire de cette période une période à risque. **(OLIVER et al., 1990, EBERHART, 1986).**

b. La lactation augmentation de la pression pathogène liée aux germes d'origine mammaire (transmission pendant la traite). **(OLIVER et al., 1990, EBERHART, 1986).**

Cette période semble surtout affectée au cours des trois premiers mois (augmentation très nette du taux de nouvelles infections).

C'est au cours de cette période que l'on observe surtout une

c. Le tarissement

Idéalement la durée du tarissement sera comprise entre 45 et 75 jours. Des valeurs inférieures ne permettent pas une bonne récupération de la glande mammaire et s'accompagnent d'une réduction de la production laitière ultérieure d'autant plus importante que la durée du tarissement a été courte. Ainsi des durées de tarissement inférieures à 30 jours peuvent entraîner une réduction de la production laitière comprise entre 600 et 1200 litres. (**OLIVER et al., 1990, EBERHART, 1986**).

Le tarissement est une période clé pour la gestion des infections mammaires. Il faut y voir trois raisons. Cette période est particulièrement favorable à l'élimination des infections persistantes. A l'inverse, elle est propice à l'installation de nouvelles infections. Enfin, elle influence également le nombre mais aussi la gravité des infections en début de lactation suivante.

III.2.1.1.3. Le niveau de production laitière

Diverses études ont démontré l'existence de corrélations positives (0.30 à 0.44) entre le niveau de production laitière et la sensibilité aux mammites. Ainsi sur base d'un coefficient de corrélation égal à 0.30, on a observé qu'une augmentation annuelle de la production laitière de 54 Kg s'accompagnait d'une augmentation de l'incidence de mammites cliniques de 0.4% et du nombre de cas cliniques par vache et par an de 0.02. (**PANKEY, 1989**).

III.2.1.1.4. La morphologie de la mamelle et du trayon

Les vaches dont les quartiers sont pendulaires apparaissent plus sensibles aux infections. Les trayons en forme de cylindre sont plus souvent infectés que ceux en forme d'entonnoir, la forme en bouteille étant la plus défavorable (**PANKEY, 1989**).

III.2.1.2. Facteurs de résistance

III.2.1.2.1. Au niveau du trayon

Le canal du trayon s'oppose à la pénétration des germes dans le pis selon deux mécanismes liés d'une part à sa conformation et d'autre part à son fonctionnement.

Sur le plan de la conformation, le diamètre du canal du trayon est plus grand dans sa partie proximale (0.8 mm) que dans sa partie distale (0.4 mm). Il constitue de ce fait un élément de résistance important. Les fibres musculaires lisses associées aux fibres élastiques et à celles de collagène se condensent à l'apex du trayon en un sphincter assurant normalement l'occlusion du canal. Enfin, le canal du trayon est plus ou moins obstrué par des replis de la muqueuse du canal

du trayon qui s'épanouissent dans le sinus en 5 à 6 replis formant une collerette (Rosette de Furstenberg).

Sur le plan du fonctionnement, le renouvellement régulier des assises cellulaires kératinisées (stratum corneum) du canal du trayon élimine en permanence les germes qui tentent de le traverser. La kératine bordant le canal du trayon exerce une activité bactéricide via différentes substances aux quelles elle sert de support de fixation (acide laurique, acide oléique, défensines, xanthine-oxydase). Elle se renouvelle en permanence, un tiers environ étant éliminé tous les jours. Le flux de lait à chaque traite empêche les germes de se fixer sur les muqueuses et favorise leur élimination du quartier. Divers résultats expérimentaux ont montré une aggravation des phénomènes inflammatoires et infectieux avec les rétentions de lait survenant en cours de lactation en cas de sous-traite (machine mal réglée, mauvaise stimulation de l'animal, mauvaise ambiance de traite) ou au cours d'un tarissement progressif. **(PANKEY, 1989)**.

III.2.2.L'élevage

Les facteurs d'élevage impliqués dans les mammites concernent l'installation de traite, la traite, l'alimentation, le logement des animaux, les pathologies intercurrentes et l'environnement.

IV. DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE DES INFECTIONS A LEVURES

IV.1. Diagnostic direct

IV.1.1. Prélèvement des échantillons de lait

Le prélèvement doit être effectué avec les précautions d'asepsie usuelles étant donnée l'ubiquité des champignons. Le lait doit être récolté après nettoyage et désinfection soignée de la mamelle et des trayons, dans un récipient stérile et après élimination des premiers jets (pour éviter toute contamination) (CHERMETTE et BUSSIERAS, 1993).

Le moment le plus opportun pour mettre en évidence les levures dans le lait a été déterminé par WEIGT (1991), à des instants différents: Lait de début de traite; Lait de fin de traite; Lait résiduel obtenu 5 minutes après une injection intraveineuse d'ocytocine (TOURNADRE, 1987). Pour parvenir à un diagnostic de mammite mycosique, il est nécessaire d'effectuer plusieurs prélèvements (3 dans la journée ou un quotidien pendant 3 jours) dans de bonnes conditions, individuellement sur chaque quartier (CHERMETTE et BUSSIERAS, 1993).

IV.1.2. Examen direct

Il doit être réalisé assez rapidement après le prélèvement (les levures prolifèrent à température ambiante)

- Eclaircissement : réalisé avec de la potasse (KOH).
- Coloration : l'observation au microscope se fait soit directement à l'état frais entre lame et lamelle soit après coloration : bleu lactophénol, gram, MGG, bleu de méthylène, Gomori-Grocott.

L'examen microscopique direct a pour but d'observer le champignon responsable non modifié et d'évaluer la quantité d'éléments fongiques dans le prélèvement.

- Observations : les levures peuvent apparaître sous forme de blastospore (forme ovale de 2-4 μ m +/- bourgeonnement), de pseudomycélium ou de mycélium. (D'après <https://www.Flabmed.ucsf.edu>)

IV.1.3. Culture

La culture des champignons est souvent aisée sur les milieux classiques (milieu de Sabouraud, milieux au malt) :

- Milieu de Sabouraud + antibiotique (gentamicine, chloramphénicol pour inhiber les contaminations bactériennes). *Candida albicans* pousse sur milieu Sabouraud chloramphénicol actidione (mais d'autres espèces de *Candida* sont inhibées par l'actidione).
- Milieu chromogène : permet d'identifier *C. albicans* directement à la couleur de la colonie (pour les autres levures, des examens complémentaires sont nécessaires pour identifier l'espèce en cause).

- Milieu pauvre : RAT, PCB (pomme de terre, carotte, bile) : permettent d'observer les formes pseudo mycélium.

Les levures se développent en 24 - 48 heures .Incubation à 25-30°C (D'après <https://www.Flabmed.ucsf.edu>).

Les champignons ne sont pas sensibles aux antibiotiques antibactériens qui, additionnés au milieu de culture (chloramphénicol), permettent d'éliminer les contaminations bactériennes. L'actidione est un antibiotique antifongique qui inhibe la croissance des champignons saprophytes tout en laissant pousser la plupart des pathogènes (sauf *C. neoformans*).

IV.1.3.1. Identification des colonies isolées:

La culture du champignon étant obtenue, l'étude des caractères macroscopiques, microscopiques et physiologiques des champignons sur les milieux convenables, permettra d'en déterminer le genre et l'espèce.

L'isolement des levures est obtenu par réensemencement sur milieu Sabouraud - chloramphénicol et Sabouraud – chloramphénicol - actidione. Il existe également des milieux, notamment chromogéniques, qui permettent simultanément l'isolement et l'identification des principales espèces pathogènes (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. neoformans*).

L'identification des champignons est basée sur l'étude :
- des critères morphologiques, reposant essentiellement sur la présence d'une capsule (*Cryptococcus neoformans*), ou de pseudomycélium (*Candida*), d'arthrospores (*Trichosporon*, *Geotrichum*), de tubes germinatifs ou de chlamydo-spores (*Candida albicans*).

- des critères physiologiques, indispensables pour l'identification des champignons levuriformes (zymogramme, auxanogramme, activités enzymatiques : uréase, phénoloxydase). L'identification d'espèce est principalement basée sur les caractères d'assimilation (auxanogramme) et de fermentation (zymogramme) et les tests enzymatiques, à l'aide de galeries commerciales.

- des critères immunologiques, peuvent fournir des renseignements épidémiologiques intéressants: ils permettent en particulier de préciser des sérotypes A ou B de *Candida albicans* et les sérotypes A, B, C ou D de *Cryptococcus neoformans*. (BOIRON, 1996)

IV.2. Diagnostic indirect

IV.2.1. Réactions sérologiques

Les réactions sérologiques mettent en évidence la présence des anticorps traduisant l'immunisation humorale. Leur détection n'est intéressante seulement que dans certaines mycoses profondes et leur présence ne permet pas toujours de distinguer les infections des simples colonisations. Seules les séroconversions franches et les grandes positivités ont de la valeur. Ni la recherche d'anticorps spécifiques, ni celle d'antigènes fongiques circulants ne sont justifiées dans le cadre du diagnostic des mycoses .

La biologie moléculaire (détection de Champignons dans le matériel biologique, identification spécifique ...) reste encore actuellement du domaine de la recherche (**RISPAIL. 2005**).

Réactions de précipitation : parmi les méthodes de recherche d'anticorps précipitant, l'électro-synérèse s'avère la technique la plus sensible et la plus rapide (2 à 4 heures).

Réactions d'immunofluorescence : la méthode indirecte est actuellement la plus utilisée, utilisant un sérum anti-globulines animales marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Autres techniques : d'autres méthodes, utilisant aussi des réactifs marqués (enzymo-immunologie de type ELISA, radio-immunologie) ont maintenant fait leur preuve et offrent un choix de techniques performantes.

La sensibilité et la spécificité de ces techniques sont en général bonnes, mais toujours dépendantes de la qualité des antigènes utilisés (D'après [https://www. Flabmed.ucsf.edu](https://www.Flabmed.ucsf.edu)).

IV.2.2. Biologie moléculaire

Un certain nombre de techniques moléculaires destinées à identifier rapidement les agents fongiques responsables ont été développé. Les techniques reposant sur la réaction de polymérase en chaîne (PCR) sont les plus prometteuses, mais restent encore, à ce jour, peu concurrentielles par rapports aux méthodes biochimiques. Par ailleurs, une meilleure compréhension des phénomènes épidémiologiques a rendu nécessaire la mise au point de méthodes de typage des souches fongiques. Particulièrement développées pour *C. albicans*, ces méthodes reposent sur l'analyse des fragments de restriction de l'ADN génomique, l'hybridation à l'aide de sondes particulières, l'électrophorèse en champ pulsé ou encore la PCR. L'ensemble de ces techniques combinées à l'étude de la sensibilité in vitro des souches aux antifongiques, permet une meilleure approche de l'épidémiologie et du traitement des infections fongiques (**BOIRON P., 1996**).

IV.2.3. Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

IV.2.3.1. Principe du MALDI-TOF

La spectrométrie de masse (SM) est une technique de détection et d'identification de microorganismes entiers par mesure de leur masse. La SM à ionisation douce de type MALDI-TOF associe une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur de temps de vol (TOF, Time-Of-Flight) (**CLAYDON et al., 1996**).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification rapide des microorganismes grâce à la reconnaissance de profils spectraux spécifiques d'espèces obtenus à partir de colonies isolées. La réalisation des banques de données qui regroupent l'ensemble des spectres de référence nécessaires à l'identification des microorganismes est un élément clé dans la mise en œuvre d'une stratégie fiable permettant une identification précise (CARBONNELLE et al., 2011). L'identification de l'espèce est basée sur la grande similitude entre le spectre de la levure à identifier et celui d'une des souches de référence présente dans la base de données (CARBONNELLE et al., 2007)

Les conditions de culture, les méthodes d'extraction des protéines, les méthodes de dépôt de l'échantillon et la nature de la matrice sont autant de paramètres expérimentaux qui peuvent modifier la qualité des spectres et qui doivent être parfaitement standardisés (VALENTINE et AL., 2005).

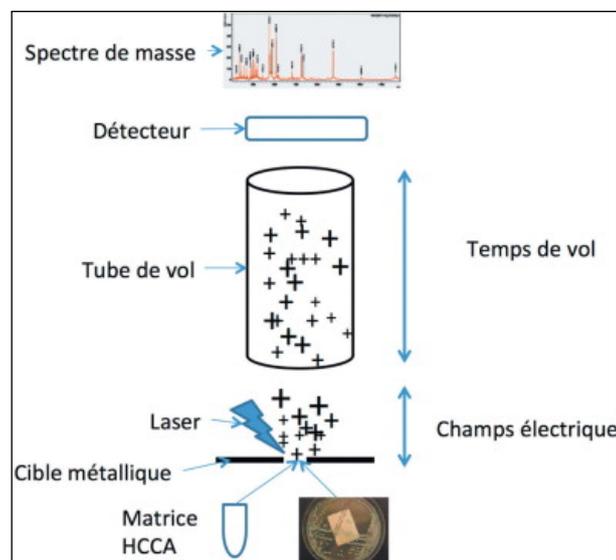


Figure n°9 : Représentation schématique des différentes étapes de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

IV.2. 3.2. Préparation des échantillons pour identification des levures

L'identification par SM est effectuée sur des colonies issues de cultures pures obtenues après 24 à 48 heures d'incubation sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques.

A/ La première consiste en une extraction réalisée préalablement au dépôt de l'échantillon sur la plaque. Cette méthode est celle utilisée dans le système Bruker®. Brièvement, 3 à 5 colonies de levures sont prélevées à l'aide d'une öse de 1 µl et mises en suspension dans 300 µl d'eau déminéralisé et 900 µl d'éthanol absolu 70% (Sigma-Aldrich). Après centrifugation à 13 000 tours/min pendant trois minutes, le culot de cellules est séché puis remis en suspension dans 50 µl d'acide formique 70% (Sigma-Aldrich). Après 30 minutes d'incubation, un volume de 50 µl

d'acétonitrile (Sigma-Aldrich) est ajouté. Enfin, après une nouvelle centrifugation à 13 000 tours/min pendant trois minutes, 1,5 µl de surnageant est déposé puis séché sur une plaque métallique (Anchorchip™ 96-spot ou Polished Steel™ 384 spots, Bruker Daltonics) à l'emplacement d'un spot. Un volume de 1,2 µl de solution de matrice (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acide [HCCA ; Bruker Daltonics]) à 10 mg/ml est ajouté à l'extrait de protéines fongiques et séché (**BADER et al., 2011**), (**SENDID et al., 2013**).

B/ La deuxième procédure consiste en une extraction réalisée directement sur la plaque lors du dépôt. Cette méthode est utilisée par les systèmes Andromas® et Saramis® (**BADER et al., 2011**), (**BILLE et al., 2012**). Une petite quantité d'une colonie de levures est prélevée à l'aide d'une öse de 1 µl, transférée sur une plaque métallique à l'emplacement d'un spot et recouverte de 1 µl d'acide formique 70% puis séchée. On ajoute ensuite 1 µl de matrice HCCA que l'on laisse co-cristalliser avec l'échantillon. Les deux procédures de préparation des échantillons sont résumées dans la figure n°10.

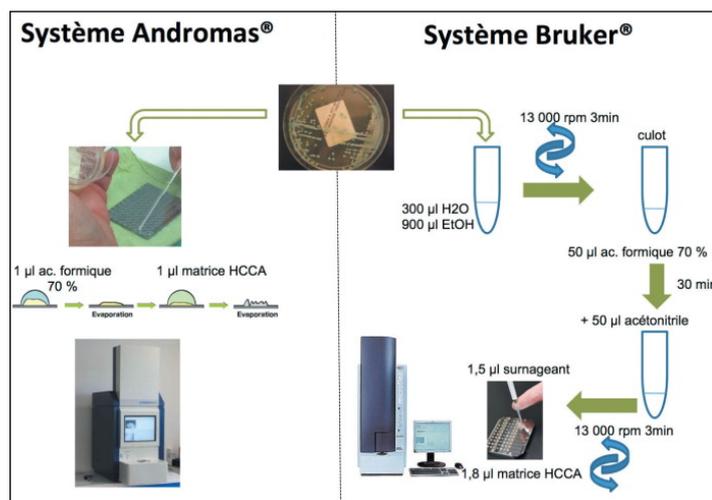


Figure n°10 : Représentation schématique des 2 procédures disponibles pour l'identification de levures à partir de colonies isolées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIELS

I.1. DESCRIPTION DE LA REGION D'ETUDE

Sidi Lahcene, également orthographié **Sidi Lahcene** -anciennement **Détrie** lors de la colonisation française est l'une des 52 communes de la wilaya de Sidi Bel Abbès. Située dans l'ouest de l'Algérie à 150 km de la frontière marocaine, et à moins de 100 km d'Oran.

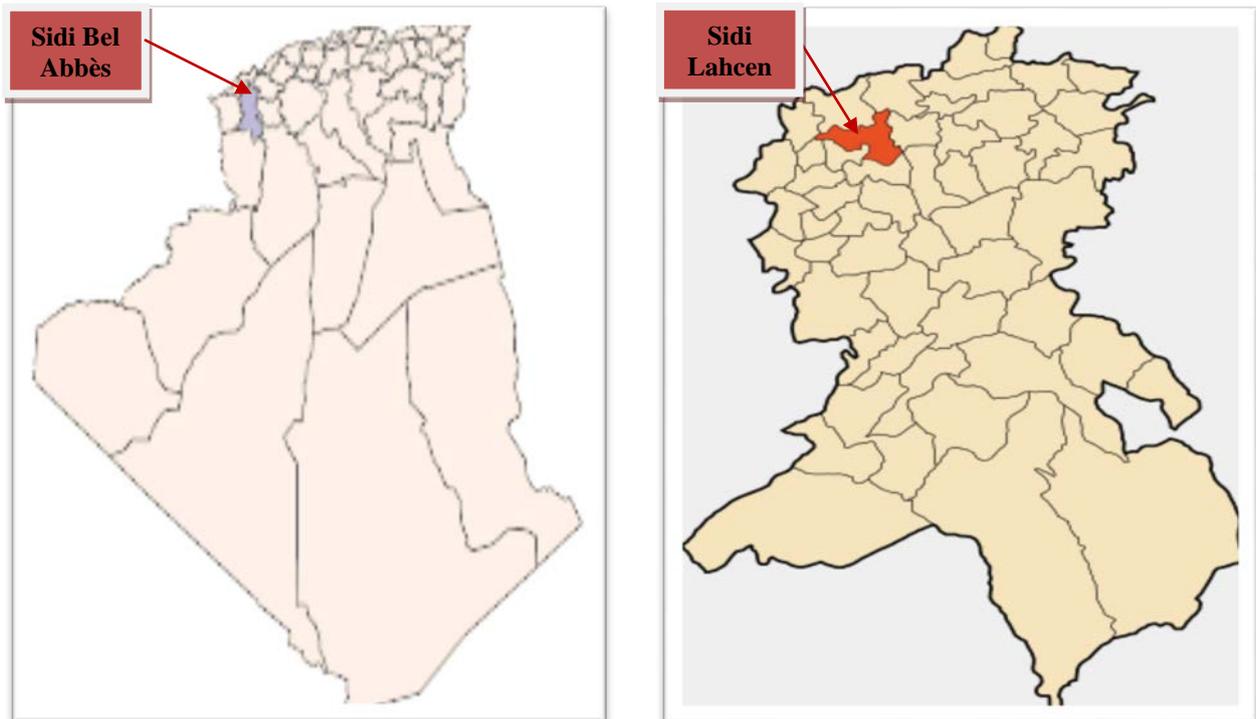


Figure n°11 : Situation géographique de la commune de Sidi Lahcene dans la wilaya de Sidi Bel Abbès.

Cette commune est limitée au Nord par Tessala, au sud par Sidi Khaled, à l'ouest par Sidi yacoub et à l'est par la commune de Sidi Bel Abbès.

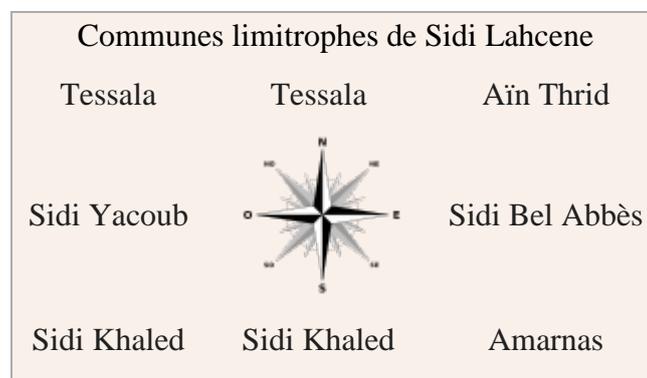


Figure n° 12 : les Communes limitrophes de Sidi Lahcene.

I.2. LA PERIODE D'ETUDE

Les prélèvements ont été effectués durant le deuxième trimestre 2012 (Mars, Avril, Mai, 2012). L'analyse mycologique a été réalisée durant le premier semestre de l'année 2013 (de Janvier 2013 jusqu'à Juillet 2013).

I.3. LE QUESTIONNAIRE DISTRIBUE AUX VETERINAIRES PRATICIENS

Des questionnaires en nombre de 50 ont été distribués aux vétérinaires praticiens de la région y compris les élevages concernés par notre étude.

Le questionnaire a porté sur les caractéristiques des différents élevages, les pratiques des trayeurs vis-à-vis du nettoyage du matériel de traite, le nettoyage de leurs mains, la préparation des mamelles à la traite, l'environnement des vaches laitières, la litière, le type de stabulation, leurs antécédents pathologiques (les mammites), (**questionnaire en annexe I**).

I.4. LES ELEVAGES BOVINS ETUDIES

13 élevages ont été suivis dont 07 avec traite mécanique et 06 avec traite manuelle. Une totalité de 70 vaches ont été prélevés dans la région de Sidi Lahcène, wilaya de Sidi BelAbbes.

Tableau n°2 : Nombre d'élevages concernés par l'étude

Numéro de l'élevage	Type de traite utilisée		Nombre de vache
	Mécanique	Manuelle	
01	x		10
02	x		06
03		x	03
04		x	04
05	x		09
06	x		10
07	x		07
08		x	03
09		x	04
10	x		04
11		x	02
12		x	02
13	x		06
Total			70

I.5. NATURE ET NOMBRE DES ECHANTILLONS PRELEVES :

A - Sur chaque vache, nous avons effectué les prélèvements suivants :

- Un prélèvement de lait de chacun des 04 trayons,
- Un écouvillonnage de la région anale,

- Un écouvillonnage de la région vaginale,
- Un écouvillonnage de la peau de la glande mammaire.

B-Dans chaque élevage, nous avons effectué les prélèvements suivants :

- Un écouvillonnage du mangeoire,
- Un écouvillonnage de l'abreuvoir,
- Un écouvillonnage du seau de lait,
- Un écouvillonnage de la citerne du stockage du lait,
- Un écouvillonnage des mains du trayeur dans le cas de la traite manuelle,
- Un écouvillonnage de la machine à traire dans le cas de la traite mécanique.
- prélèvement de l'eau de l'abreuvoir.

Tableau n° 3 : Nature et nombre d'échantillons prélevés dans les élevages bovins étudiés.

Nature du prélèvement	Traite manuelle	Traite mécanique	Total
Nombre de vache	18	52	70
Nombre d'échantillon de lait	72	208	280
Nombre d'écouvillon anal	18	52	70
Nombre d'écouvillon vaginal	18	52	70
Nombre d'écouvillon mammaire	18	52	70
Nombre d'écouvillon du mangeoire	06	07	13
Nombre d'échantillon de l'eau de l'abreuvoir	04	03	07
Nombre écouvillon de l'abreuvoir	06	07	13
Nombre d'écouvillon du seau de lait	06	07	13
Nombre d'écouvillon de la citerne	06	07	13
écouvillon des mains du trayeur	06	00	06
écouvillon de la machine à traire	00	07	07
Total des prélèvements réalisés	160	402	562

562 prélèvements ont été collectés dans les 13 élevages à savoir ;

- **490** prélèvements effectués sur les vaches (280 prélèvements de lait et 210 écouvillons) et **65** écouvillons du matériel d'élevage et **07** échantillons de l'eau de l'abreuvoir.

- **280 prélèvements de lait** ont été récoltés par les vétérinaires praticiens de la région de Sidi Lahcène, wilaya de Sidi BelAbbes et **275 écouvillonnages** réalisés sur les 13 élevages (**65** écouvillons du matériel d'élevage et 210 écouvillons sur la vache i.e. écouvillons anal, vaginal, mammaire) et **07** échantillons de l'eau de l'abreuvoir.

D'après le tableau n°2, nous avons réalisés 160 prélèvements au niveau des élevages à traite manuelle et 402 prélèvements au niveau des élevages à traite mécanique, ce qui fait un total de 562 prélèvements.

1.6. MODE D'EXPRESSION DES RESULTATS DU QUESTIONNAIRE

Toutes les données ont été saisies dans une base informatique classique (Excel 2007). On a utilisé le même logiciel pour la vérification et le traitement statistique.

Pour la comparaison des résultats obtenus, nous avons utilisé le test de khi deux (d'indépendance et de conformité). Les représentations graphiques (Histogrammes, Secteurs et Tableaux), ont pour but d'apprécier les différents paramètres étudiées.

II. METHODES

II.1. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS DE LAIT ET DE L'EAU ET DES ECOUVILLONS.

Les écouvillons réalisés ont été identifiés et conservés à + 4°C et les échantillons de lait et de l'eau ont été congelés à - 20°C jusqu'au jour de leur analyse.

II.1.1. Prélèvements de lait (voir Annexe II).

II.1.2. Prélèvements de l'eau des abreuvoirs

Dans des tubes stériles, nous avons prélevé 8 ml de l'eau de l'abreuvoir. Les prélèvements d'eau ont été acheminés au laboratoire de parasitologie et de mycologie de l'ENSV dans une glacière (+4°C).

II.1.3. Ecouvillonnages

II.1.3.1. Ecouvillonnage des régions anales et vaginales

L'écouvillonnage du périnée et de la région vaginale des vaches est assuré par frottement contre la muqueuse, d'un écouvillon stérile. L'écouvillon est identifié, daté et conservé à +4°C.

II.1.3.2. Ecouvillonnage des gobelets trayeurs des machines à traire

Un écouvillonnage a été effectué à l'aide d'un écouvillon introduit dans le manchon trayeur. On doit toujours frotter fortement et roulé l'écouvillon stérile sur toute la face interne vers l'extérieur du manchon puis on conserve l'écouvillon à +4 °C, après l'avoir identifié.

II.1.3.3. Ecouvillonnage des mains des trayeurs

Nous avons réalisé l'écouvillonnage de la face interne des mains des trayeurs. Après son identification, l'écouvillon est conservé à +4 °C.

II.1.3.4. Ecouvillonnage de la peau de la mamelle

L'écouvillonnage de la peau des mamelles est réalisé par le roulement de l'écouvillon stérile sur toute la surface de la mamelle. Après son identification, l'écouvillon est conservé à +4 °C.

II.1.3.5. Ecouvillonnage de la face interne de l'abreuvoir

Un écouvillonnage a été effectué par le frottement d'un écouvillon stérile de la face interne de l'abreuvoir, puis identifié, l'écouvillon est conservé à +4 °C.

II.1.3.6. Ecouvillonnage de la face interne des mangeoires

Un écouvillonnage a été effectué par le frottement de la face interne du mangeoire par un écouvillon stérile, après son identification, l'écouvillon est conservé à +4°C.

II.1.3.7. Ecouvillonnage du seau de lait

A l'aide d'un écouvillon stérile, un écouvillonnage de la face interne du seau de lait a été réalisé ; après son identification, l'écouvillon est conservé à +4 °C.

II.1.3.8. Ecouvillonnage de la face interne de la citerne

A l'aide d'un écouvillon stérile, un écouvillonnage de la face interne de la citerne de stockage du lait a été réalisé; après son identification, conservation à +4 °C.

II.2.METHODES DE DIAGNOSTIC DE LA MAMMITE

II. 2.1. Méthodes de diagnostic de la mammite clinique

La mammite clinique a été diagnostiquée sur la base des changements de l'aspect de la mamelle et la composition du lait. Les changements dans la mamelle inclus douleur, gonflement, chaleur et pour le lait, une apparence anormale (lait teinté de sang, sécrétions aqueuses, des caillots, pus).

II. 2.2. Méthodes de diagnostic de la mammite subclinique

Les vaches dont la glande mammaire est apparemment saine ont été soumises à une enquête plus approfondie pour le diagnostic des mammites subcliniques en utilisant le California Mastitis Test (CMT). De ce fait, les 70 vaches prélevées présentent des statuts sanitaires différents :

- 10 vaches présentant des glandes mammaires saines.
- **46** vaches présentant des mammites **subcliniques** déterminées par le test (CMT).
- 14 vaches présentant des mammites cliniques.

II.2.2.1. Le Diagnostic des mammites subclinique par le test CMT

Le « California mastitis test » ou CMT permet la détection des mammites subcliniques. C'est un test qui a été développé à la fin des années 1950 à l'université de la Californie. Il est simple de réalisation. Il nécessite un réactif et un plateau comprenant 4 cupules.

Les trayons sont nettoyés, le lait des premiers jets de chaque quartier est mis dans une cupule propre, le trop plein est déversé pour ne garder environ que 2 mL de lait par quartier. Le réactif est ajouté et mélangé aux échantillons de lait par rotation.

La lecture doit être immédiate et s'effectue à l'aide d'une échelle de **couleur** et de **viscosité** (**Tableau 4**). Le CMT devrait être réalisé par la même personne pour éviter les différences d'interprétation.

Le CMT est basé sur l'action d'un détergent (solution de Teepol à 10%) et d'un colorant (pourpre de bromocresol). Le détergent provoque la lyse des cellules du lait par la destruction de leur paroi. L'ADN est libéré, il forme un réseau de très longs filaments qui s'opposent aux écoulements hydrodynamiques et qui piègent les globules gras. Ce réseau augmente la viscosité du lait jusqu'à flocculer. Plus la concentration cellulaire est élevée, plus la quantité d'ADN libéré est élevée et plus le flocculat sera important.

Le colorant change de couleur en fonction du pH. Le lait sain a un pH compris entre 6,5 et 6,7 (**DUREL et al., 2004**).

En cas de mammite, le pH devient plus alcalin et s'approche de 7. Le colorant est incolore à gris pour des pH allant de 5,2 à 6,8 et devient violet quand le pH est supérieur à 6,8 donc en cas de mammite.

Tableau n°4 : Grille de lecture du test CMT (Notice Leucocyttest)

Grade	Signification	Description de la réaction	Interprétation (cellules/mL)
0	Négatif	Le mélange est liquide, homogène et fluide.	0 – 200 000
1	Traces	Le mélange devient légèrement visqueux. La viscosité est réversible et tend à disparaître.	200 000 – 400 000
2	Faiblement positif	Le mélange devient visqueux sans formation de gel au centre et la viscosité tend à persister.	400 000 – 1 500 000
3	Clairement positif	Le mélange s'épaissit immédiatement avec la formation d'un gel au centre du godet lors des mouvements de rotation. Du liquide peut persister.	800 000 – 5 000 000
4	Fortement positif	Le mélange forme un gel au centre qui adhère au fond du godet. Il n'y a plus de liquide.	> 5 000 000

La corrélation entre les résultats du test CMT et le comptage cellulaire est meilleur pour de fort taux cellulaires (**DUREL et al., 2004**). Il convient d'interpréter avec précaution des résultats douteux ou négatifs. Un test CMT négatif ne permet pas de conclure à une absence d'infection. L'interprétation du test dépend de la subjectivité de l'opérateur et de son expérience. Des variations physiologiques du lait peuvent fausser le test surtout en début et en fin de lactation ou des colorations violacées sont normales.

Le test CMT est facile et simple d'utilisation en routine. Il permet de détecter les mammites subcliniques et d'identifier le(s) quartier(s) atteint(s) lors d'une augmentation de la concentration en cellules somatiques. En cas de doute, la répétition du test améliore l'interprétation.

II. 3.METHODES DE DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUES (voir Annexes IV)

II.3.1. ANALYSES DU LAIT

Les analyses mycologiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de parasitologie-mycologie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire - Alger. Elles consistent en un examen direct des échantillons de lait à l'état frais et après coloration au bleu lacto-phénol ; puis leur ensemencement sur milieu d'isolement et enfin une identification des champignons isolés à partir des caractères morphologiques et biochimiques (**Fig.13**).

II.3.1.1. Examen direct

Il est indispensable, car il nous permet de rechercher la forme pathogène du champignon à savoir la forme filamenteuse.

a. Eclaircissement et coloration : A l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée près d'une flemme bec bunsen, quelques gouttes du lait échantillonné sont aspirées. Une partie est déposée sur une lame à laquelle on ajoute une goutte de bleu du Lactophénol. Afin d'observer les éléments fongiques (Filaments, mycéliums, levures), Le bleu du lactophénol les imprègne en bleu. Dans le cas où la consistance de lait est très compacte, on utilise la potasse à 30 % pour la ramollir avant son observation au microscope. Une goutte de la potasse à 30 % est déposée sur la goutte de lait puis recouvrir d'une lamelle puis chauffer très légèrement près de la veilleuse du bec bunsen. Après l'éclaircissement de la préparation, on effectue la lecture au microscope optique au grossissement x100, x 400. Les levures sont reconnaissables à leur bourgeonnement et leur taille de plusieurs microns, ce qui évite une confusion avec les bactéries.



Figure n°13 : Préparation des lames pour l'examen direct au microscope. (A) : dépôt d'une goutte de la potasse à 30 % ; (B) : Dépôt du colorant bleu lactophénol ; (C) : dépôt d'une colonie sur le colorant et recouvrir d'une lamelle. (Original, laboratoire de parasitologie, ENSV-Alger, 2013).

II.3.1.2. Mise en culture

Elle est absolument nécessaire pour l'isolement et l'identification des champignons. Quelques gouttes de lait sontensemencées sur milieu Sabouraud (coulé dans des boîtes de pétri).

a. Préparation du milieu ; Chaque flacon de gélose Sabouraud déshydratée (Institut Pasteur d'Alger) de 250 g (10 g de Peptone, 20 g de Glucose et 20 g d'Agar) permet de préparer 5 litres de milieu. Les 250 grammes de gélose Sabouraud déshydratée sont versés dans 5 l d'eau distillée chaude, puis bien remuer pour dissoudre la poudre. La gélose liquide est versée dans des flacons,

le tout est stérilisé par autoclavage 1 heure à 120 °C. La gélose stérilisée est coulée sur boîtes de Pétri puis refroidie à température ambiante.

b. Ensemencement ; Le choix des boîtes de pétri est lié à leur surface avantageuse qui permet une meilleure séparation des colonies en cas d'association de champignons. Le Chloramphénicol est utilisé pour inhiber la poussée des bactéries.



Figure n°14 : Les différentes étapes de l'ensemencement. (A) : Récupération de quelques gouttes du lait ; (B) : Dépôt de ces gouttes sur la gélose Sabouraud ; (C) : Etalement de ces gouttes à l'aide du râteau sur toute la surface de la gélose Sabouraud (Original, laboratoire de parasitologie, ENSV-Alger, 2013).

c. Incubation ; Les boîtes de pétri sont incubés dans une étuve à 27 °C durant 48 h à 72 h ou plus une semaine.

d. Lecture

Aspect macroscopique

C'est une première étape dans l'orientation du diagnostic mycologique. Nous avons retenu comme critères, la forme, la couleur, la consistance et l'aspect de la colonie. L'observation des colonies obtenues a concerné le recto et le verso de chacune. Pour les levures, il est surtout important de quantifier le nombre de colonies ayant poussées. On apprécie le nombre des colonies par l'utilisation du symbole + comme suit :

(+) (< 10 colonies),

(++) (10 à 50 colonies),

(+++) (> 50 colonies bien isolées),

(+++++) (> 50 colonies en nappe).

Le dénombrement sera plus précis et il nous permettra d'exprimer le résultat en nombre de colonies (faible infection ou infection massive) (**KOENIG, 1995**).

Comme notre étude est basée sur l'identification des levures pathogènes, donc pour les champignons filamenteux nous nous sommes limités au dénombrement des prélèvements positifs.

Aspect microscopique

A l'aide d'une anse de platine, on récupère une partie de la colonie de levure, après l'avoir dilacérée et déposée dans une goutte de colorant (bleu de Lactophenol) entre lame et lamelle. La lecture s'effectue au microscope optique aux grossissements : x100, x 400.

II.3.1.3. Repiquage des colonies de levures

Après avoir noté macroscopiquement les critères suivants : La consistance de la colonie : glabre, duveteuse, poudreuse, soyeuse, laineuse, floconneuse ; La surface (plane, en dôme, plissée, cérébriforme) ; La présence de rayons fins ou larges, courts ou longs, s'enfonçant dans la gélose ; La couleur du recto et du verso et la présence d'un pigment diffusible dans la gélose. Les colonies de levures d'aspect différent sont repiquées sur milieu Sabouraud / chloramphénicol à 27°C pour une identification ultérieure.

II.3.1.4. Identification des colonies de levures

On a recours dans cette phase à différents milieux de culture et tests pour l'identification précise des levures (galeries d'identification) (**DROUHET et DUPONT, 1985**).

II.3.1.4.1. Milieu Sabouraud / Chloramphénicol à 37 °C ; Ce test permet de mettre en évidence le caractère potentiellement pathogène de la levure lorsqu'elle se développe à une température avoisinant la température corporelle. Devant un bec bunsen, un petit fragment de la colonie de levure est étalé sur la totalité de la surface de la boîte de pétri (Sabouraud), puis incubé à 37 °C dans l'étuve. La lecture est faite 48 h à 72 h plus tard ; une colonie qui pousse à 37 °C est potentiellement pathogène (+) et inversement, une colonie qui ne pousse pas à 37°C n'est pas pathogène (-).

II.3.1.4.2. Milieu Sabouraud / Actidione ; Ce test permet de mettre en évidence les colonies sensibles à l'Actidione (Cycloheximide). La colonie est ensemencée sur ce milieu dans des

tubes. L'incubation est réalisée à 27 °C. Une première lecture peut être faite 24h plus tard. Les colonies ayant poussées sur ce milieu sont considérées résistantes à l'Actidione (R) ; Les colonies n'ayant pas poussées sur ce milieu sont considérées sensibles à l'Actidione (S).

II.3.1.4.3. Milieu à base de crème de riz (Rice Cream) ; Ce milieu favorise la production de chlamydospores caractéristiques de *Candida albicans* en milieu anaérobie.

Le milieu est coulé sur boîte de pétri. Après l'étalement d'un fragment de colonie, on la recouvre d'une lamelle stérilisée à la flamme bec bunsen (elle assure la stérilité et un milieu anaérobie). Incubation à 27 °C dans l'étuve. La lecture est faite à 24 h, et 48 h plus tard (Gr. x100 et x 400).

II.3.1.4.4. Milieu à base de sérum pour blastèse ; Le sérum de bovin, est utilisé comme milieu pour favoriser la production des tubes germinatifs typiques de *Candida albicans* (test de germination). Devant un bec bunsen, on dépose 0.5 ml de sérum dans des tubes stériles ; Une colonie de levure est déposée à l'aide d'une anse de platine dans le sérum. Le tout est bien homogénéisé pour obtenir une suspension de levure homogène et incubé à 37°C pendant 4 heures. Une goutte du culot est prélevée et déposée sur une lame, recouverte d'une lamelle puis lecture au microscope (Gr. x 100 et x 400).

II.3.1.4.5. Milieu à l'urée Indole ; C'est un test physiologique qui permet de rechercher l'hydrolyse de l'urée (dégradation de l'urée et production de métabolites alcalins). 0.5 ml du milieu urée indole est versé dans un tube stérile, une colonie y est ensemencée puis incubée à 37 °C. La lecture s'effectue à 4 h et 24 h après ensemencement. Le virement du milieu du jaune orangé au rouge violet correspond à la sécrétion d'une uréase. La levure qui fait virer le milieu au rouge en 4 heures est *Cr. neoformans*. Les levures sont aussi examinées au microscope (Gr. x100 et x 400) en mélangeant les levures sur une lame avec l'encre de chine diluée au 1/5^{ème}.

II.3.1.4.6. Etude des caractères physiologiques

La majorité des tests pour l'étude des caractères physiologiques repose sur l'assimilation des carbohydrates (auxanogramme) et de leur fermentation (zymogramme) (MICHEL-NGUYEN et al., 2002). De nombreux dispositifs miniaturisés et standardisés sont commercialisés (API[®] Candida, API[®] 20C AUX ou ID[®] 32C Bio Mérieux).

Dans le cadre de l'**auxanogramme**, la levure est placée en **aérobiose** en présence d'une source de carbone fournie par l'hydrate de carbone lyophilisé déposé au fond de chaque cupule. Le

nombre de sucres testés varie selon la galerie commercialisée. Lorsque la levure assimile le sucre, celle-ci se multiplie, ce qui se traduit par **un trouble** dans la cupule.

Dans le cadre du **zymogramme**, les cupules sont placées en **anaérobiose**, et l'assimilation par voie fermentative entraîne **un virage de l'indicateur du pH** en raison de la **production de métabolites acides**.

L'identification de l'espèce est assurée après traduction du profil en un code numérique, par comparaison à des bases de données.

Selon les dispositifs commerciaux 14 à 62 espèces peuvent être identifiées dans le genre de *Candida* mais aussi *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* et *Saccharomyces*.

II.3.1.4.6.1. Assimilation de sources de carbone (auxanogramme):

Dans la présente étude, nous avons utilisé le test API[®] 20C AUX (Bio Mérieux, France) qui comprend 19 sources de carbone (MICHEL-NGUYEN et al., 2002).

Test API[®] 20C AUX (Bio Mérieux, France)

A-Objet du test

API[®] 20C AUX est un système d'identification précise des levures les plus couramment rencontrées. La liste complète des espèces qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le tableau d'identification en Annexe.

B-Principe du test API[®] 20C AUX

La galerie API[®] 20C AUX est constituée de 20 cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'effectuer 19 tests d'assimilation. Les cupules sont inoculées avec un milieu minimum semi-gélosé et les levures poussent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait par comparaison aux témoins de croissance et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

C-Présentation (coffret de 25 tests)

25 galeries API[®] 20 C AUX - 25 boîtes d'incubation - 25 ampoules d'API C Medium - 25 fiches de résultats - 1 notice. Le Milieu (voir Annexe)

D-Conditions de stockage : Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

E-Echantillons (prélèvement et préparation)

API[®] 20C AUX ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie et de mycologie.

F-Réalisation du test

F.1.Préparation de la galerie

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide.

-Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)

-Retirer la galerie de son emballage individuel et la déposer dans la boîte d'incubation.

F.2.Préparation de l'inoculum

-Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml).

-A l'aide d'une pipette, prélever une fraction de colonie par aspiration ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).

-Réaliser une suspension de levures de turbidité égale à 2 de McFarland. L'homogénéiser à l'aide d'un agitateur électrique.

-Ouvrir une ampoule d'API C Medium et y transférer environ 100 µl de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles.

F.3.Inoculation de la galerie

-Remplir les cupules avec la suspension obtenue dans API C Medium. Eviter la formation de bulles en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule. Veiller à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.

-Refermer la boîte d'incubation et incuber 48-72 heures (± 6 heures) à $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

F.4.Lecture et interprétation

Après 48 heures d'incubation, ou 72 heures (si les tests, en particulier le glucose, ne sont pas très nets après 48 heures), observer la croissance des levures comparativement à la cupule 0, témoin négatif. Une cupule **plus trouble que le témoin** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats. Afin d'éviter toute contamination lors d'une réincubation, ôter le couvercle uniquement pendant la période de lecture.

II.3.2. Analyse mycologique de l'eau de l'abreuvoir

Quelques gouttes de l'eau sontensemencées sur milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol. L'identification des colonies poussées est réalisée comme précédemment pour les échantillons de lait.

II.3.3. Analyse mycologique des écouvillons

Nous avons suivi les mêmes étapes expérimentales que celles adoptées dans l'analyse mycologique du lait à l'exception de l'examen direct. Un ensemencement sur boîte de pétri par frottement de l'écouvillon sur toute la surface du milieu. Les colonies de levures sont repiquées sur milieu Sabouraud pour identification ultérieure comme cité précédemment.

RESULTATS

RESULTATS

I. LES RESULTATS DU QUESTIONNAIRE (voir Annexe VI)

Le questionnaire transmis aux vétérinaires praticiens (voir annexe I), nous a permis d'effectuer une première analyse sur le mode de gestion des élevages bovins laitiers de la région de Sidi Lahcène (wilaya de Sidi BelAbbes) avant de passer aux analyses de laboratoire. Sur l'ensemble des élevages bovins laitiers visités, le mode d'élevage prédominant est le semi extensif à stabulation semi entravée (**Fig.15**).

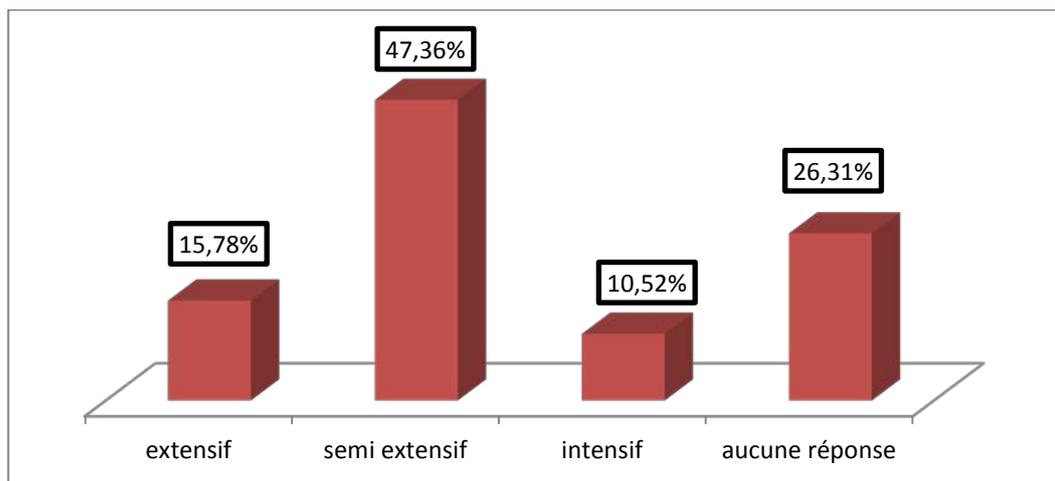


Figure n°15 : le mode d'élevage dans la région étudiée.

Cette **figure n°15** montre que les éleveurs de la région de Sidi Lahcene utilisent le mode d'élevage semi extensif plus que d'autres modes, ce qui permet aux animaux de rester quelques heures à l'air libre et de s'alimenter des pâturages.

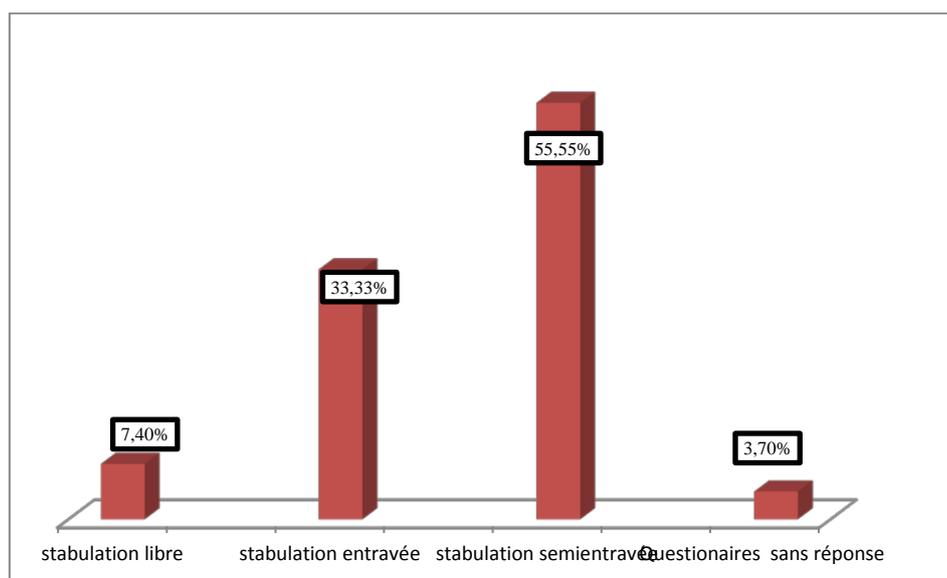


Figure n°16 : le type de stabulation dans la région étudiée.

Les éleveurs utilisent la stabulation semi entravée ce qui permet aux animaux de se déplacer librement à l'intérieur de l'étable mais il existe d'autres qui favorisent le type entravé (**Fig.16**).

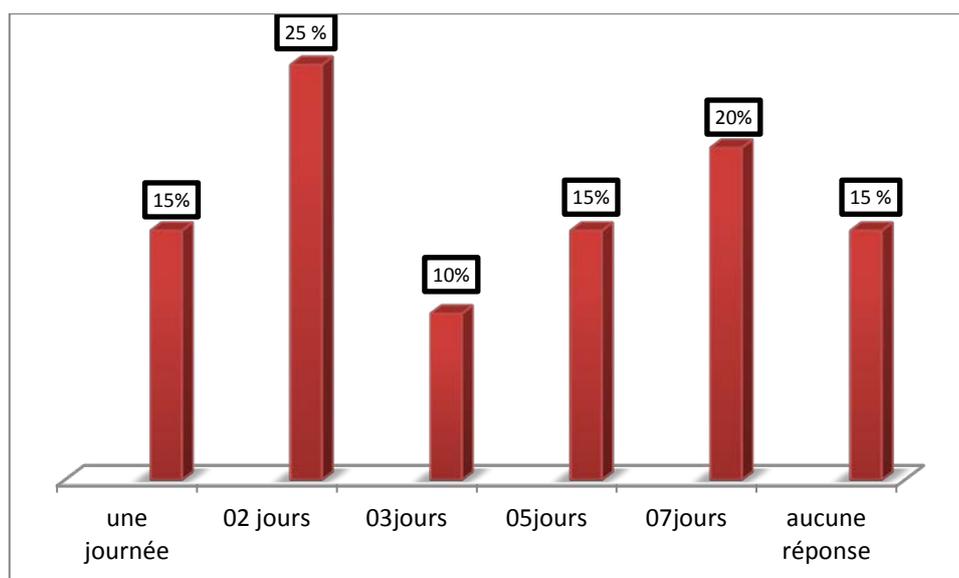


Figure n°17 : intervalle du changement de la litière.

Les éleveurs changent la litière tous les deux jours à un pourcentage de 25% et 20% changent la litière une fois par semaine (07jours) (**Fig.17**).

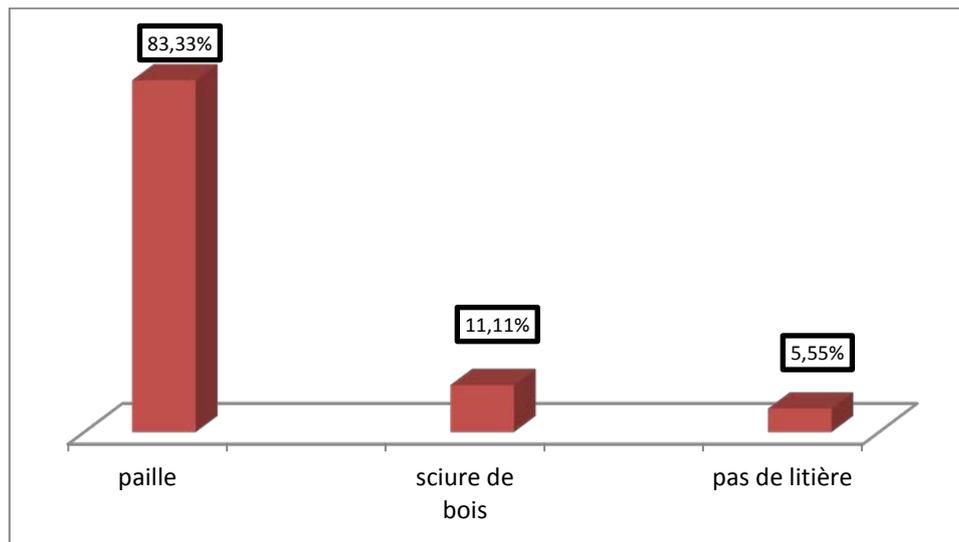


Figure n°18 : la nature de la litière.

La majorité des éleveurs utilisent la paille comme litière, c'est ce qui est recommandé car elle absorbe le liquide.

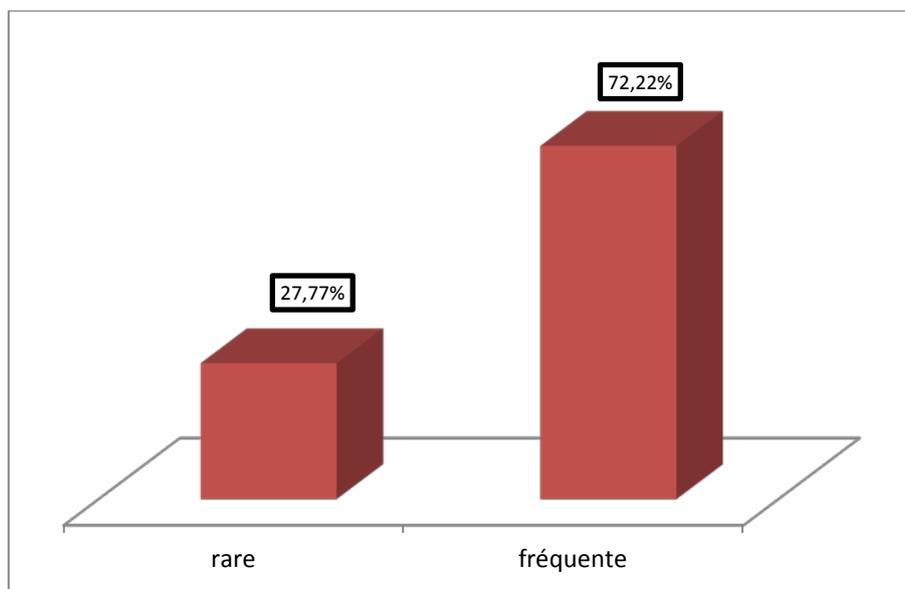


Figure n°19 : la fréquence des mammites cliniques dans la région de Sidi lahcène.

L'historgramme de **la figure n°19** de montre que dans les élevages visités, les mammites cliniques sont fréquemment rencontrées avec un taux supérieur à 70%.

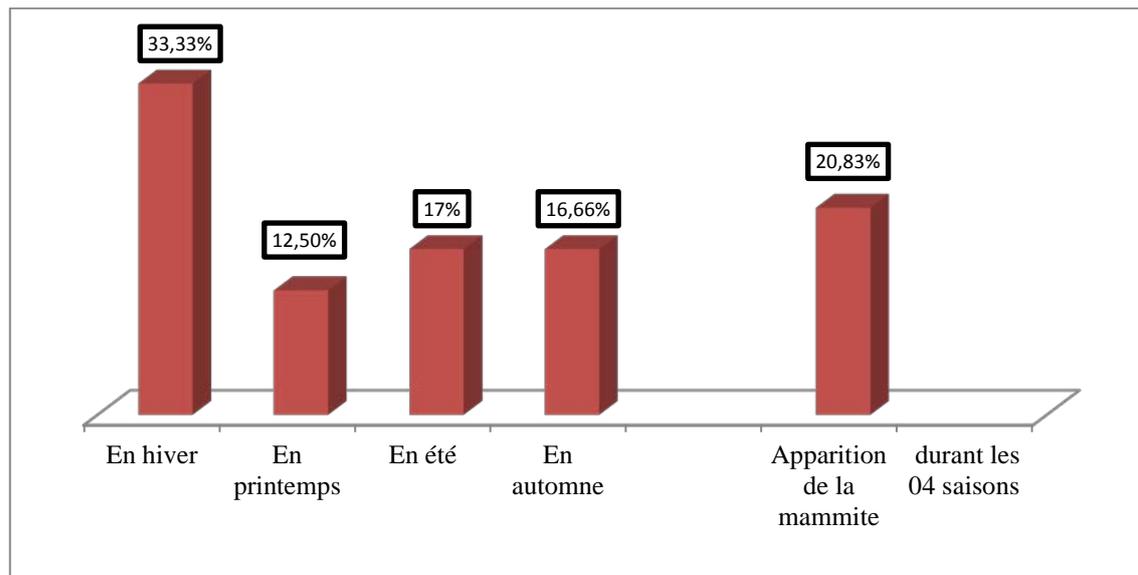


Figure n°20 : la fréquence des mammites selon les saisons.

La figure n°20 montre la fréquence élevée des mammites pendant la saison de l'hiver (Certains vétérinaires constatent des mammites durant les quatre saisons).

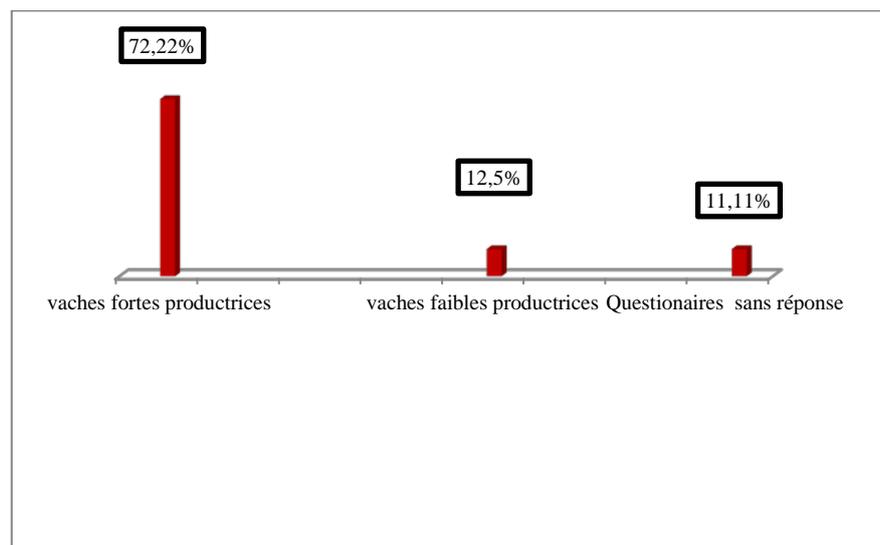


Figure n°21 : la fréquence des mammites selon le taux de production du lait.

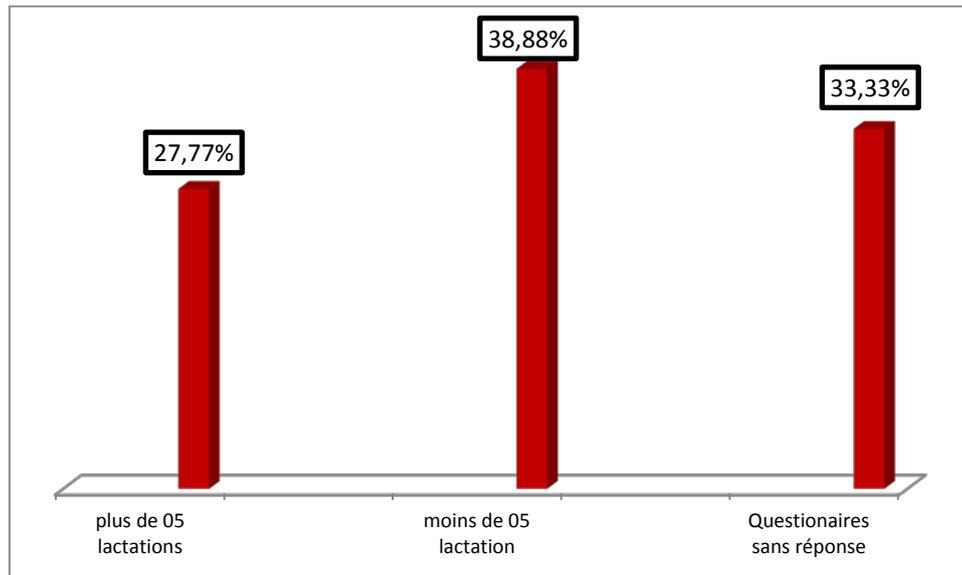


Figure n°22 : la fréquence des mammites selon le nombre de lactations.

D'après les **figures n°21 et 22**, les mammites sont fréquentes chez les vaches fortes productrices de lait avec moins de 05 lactations.

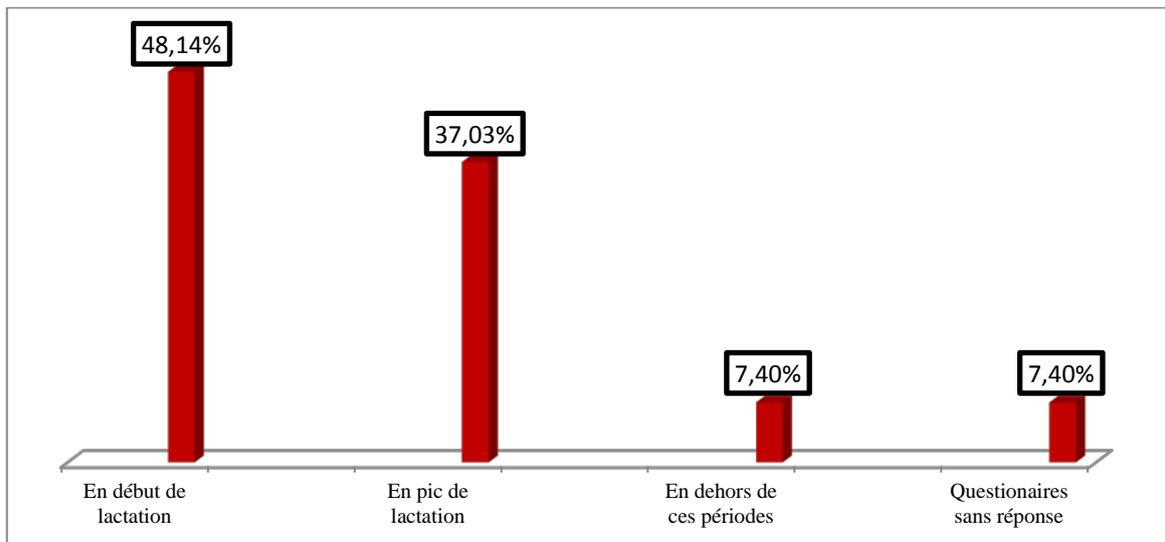


Figure n°23 : la fréquence des mammites selon le stade de lactation.

A travers l'histogramme de **la figure n°23**, nous constatons que la fréquence des mammites est plus élevée surtout en début de lactation (48,14%), puis en pic de lactation (37,03%).

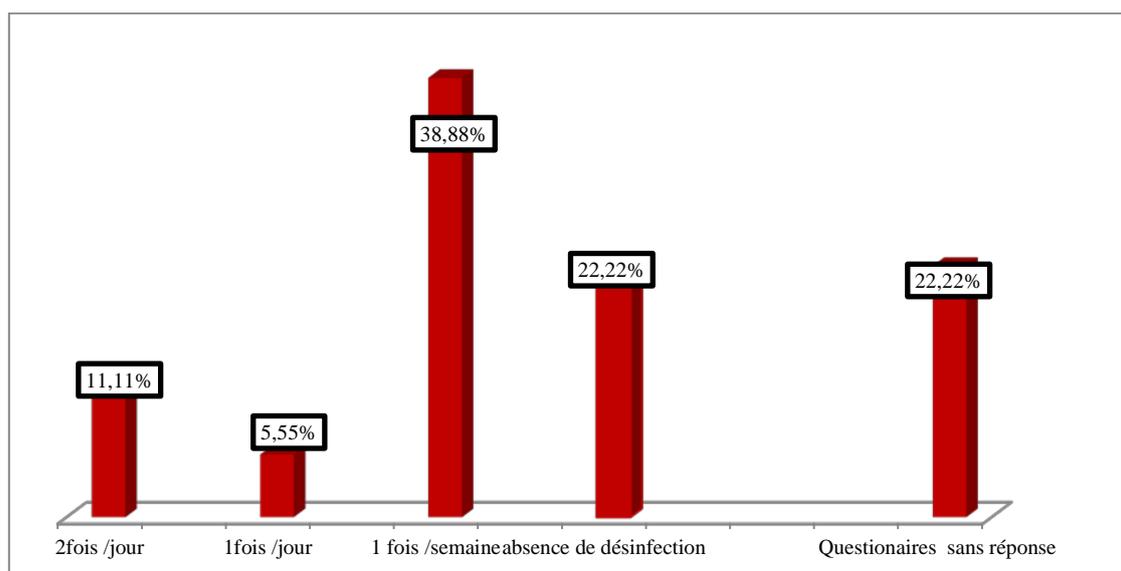


Figure n°24 : la fréquence de la désinfection du matériel de traite.

L'histogramme de la **figure n°24**, montre que 38,88 % des trayeurs désinfectent leur matériel de traite une fois par semaine, mais on remarque qu'il existe un certain pourcentage de trayeurs (22,22%) ne désinfecte jamais leur matériel de traite, par contre il existe un taux de 11,11% des trayeurs qui désinfectent ce matériel deux fois par jour.

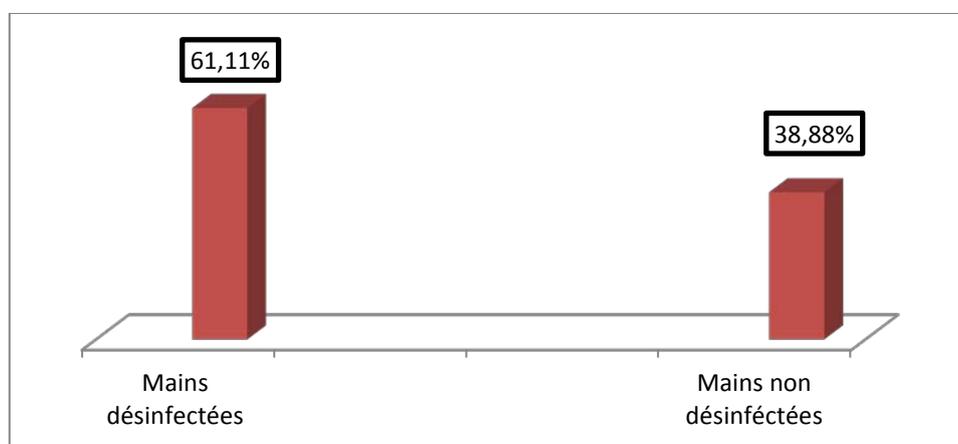


Figure n°25 : la fréquence de la désinfection des mains du trayeur.

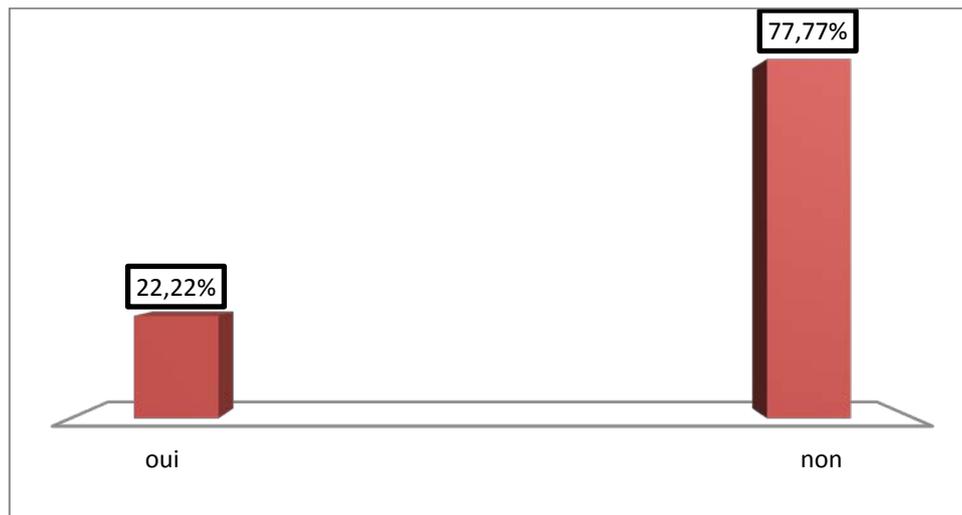


Figure n°26 : la fréquence de la désinfection des mains du trayeur après chaque vache.

Plus de 60% des éleveurs trayeurs désinfectent leurs mains avant la traite (61,11%) (**Fig.25**), toutefois, la désinfection des mains après la traite de chaque vache se fait qu'à 22,22% (**Fig. 26**), alors que le pourcentage d'éleveurs trayeurs qui ne le font pas est de 77,77%.

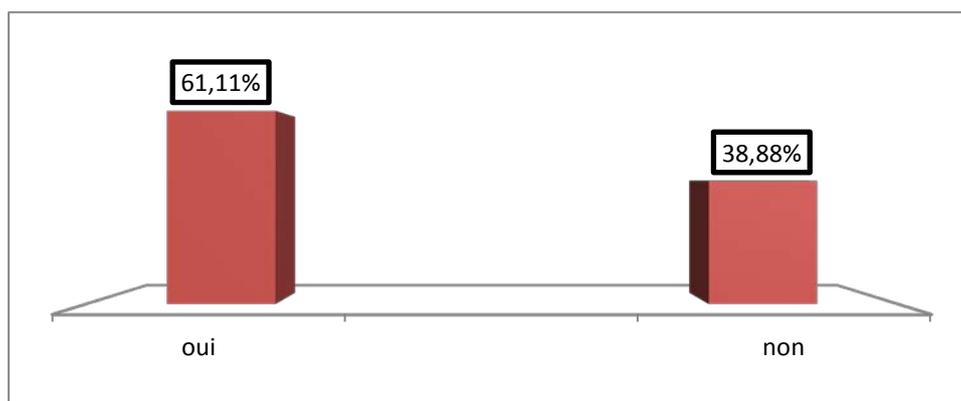


Figure n°27 : la fréquence de la désinfection de la mamelle avant chaque traite.

L'histogramme de la **figure n°27**, montre que plus de 60% des éleveurs trayeurs désinfectent la mamelle avant chaque traite.

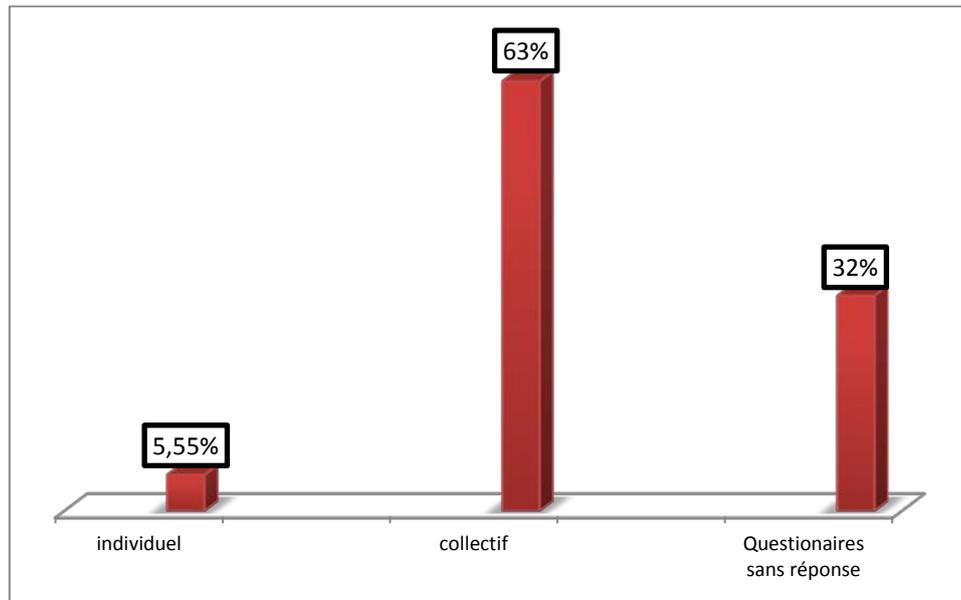


Figure n°28 : chiffon utilisé pour le nettoyage de la mamelle.

Dans **la figure n°28**, le graphe relatif à l'utilisation de lavette pour la désinfection de la mamelle, montre que seulement 5,55% des trayeurs utilisent un chiffon individuel et 63% des trayeurs utilisent un seul chiffon pour toutes les vaches.

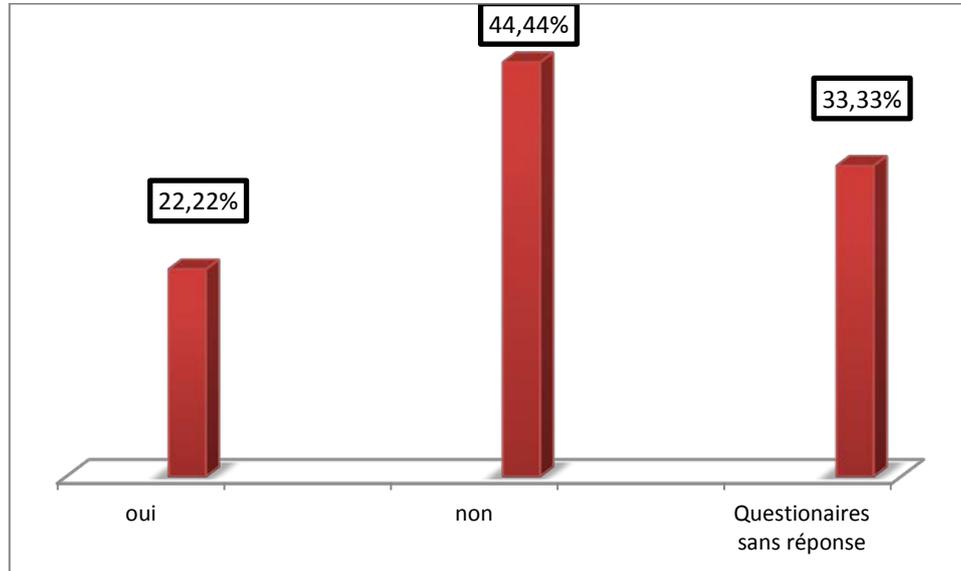


Figure n°29 : la fréquence de la désinfection du chiffon après chaque utilisation.

D'après **la figure n°29**, nous constatons que 44,44% des trayeurs ne désinfectent pas le chiffon après chaque utilisation mais malgré ça il existe des éleveurs trayeurs qui donnent une importance à cet acte (22,22%).

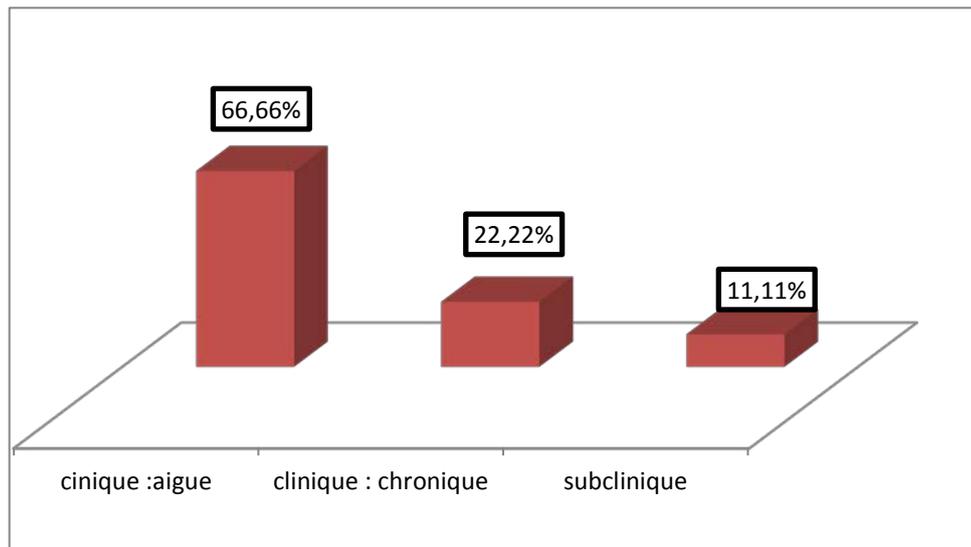


Figure n°30 : le type de mammites rencontrées.

D'après le questionnaire, le taux des mammites cliniques est plus élevé comparé au taux des mammites sub-cliniques, ce qui n'est pas la réalité car les mammites subcliniques peuvent ne pas être détecté par le CMT, le test le plus utilisé sur le terrain quant elles existent à l'état latent et cet examen complémentaire n'est pas couramment utilisé par les vétérinaires praticiens quant en cas de doute ,donc les réponses aux questionnaires ont été formulées surtout suivant ce qu'ils observent sur le terrain (**Fig.30**).

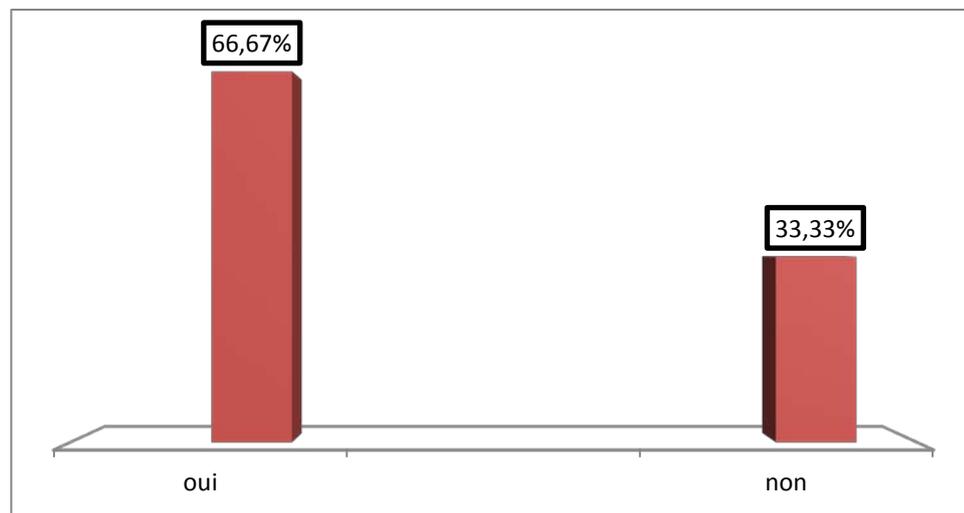


Figure n°31 : la persistance des mammites après traitement antibiotique.

Dans 66,67 % des cas, les mammites persistent après traitement antibiotique alors que dans seulement 33,33 % des cas, les mammites guérissent après traitement antibiotique (**Fig.31**).

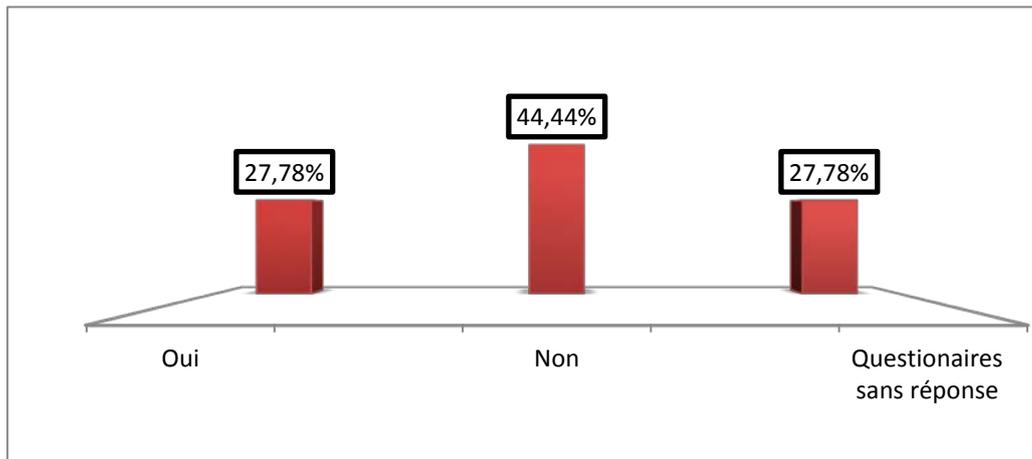


Figure n°32 : la fréquence de l'apparition des mammites mycosiques après traitement antibiotiques prolongé.

D'après la **figure n°32**, les mammites mycosiques apparaissent après traitement antibiotiques prolongé dans 27,78% des cas sans oublier les 27,78 questionnaires sans réponse. Les vétérinaires praticiens ont répondu à cette question en se basant sur la non guérison de la mammite après traitement antibiotique prolongé, ce qui signifie l'installation de mammite mycosique.

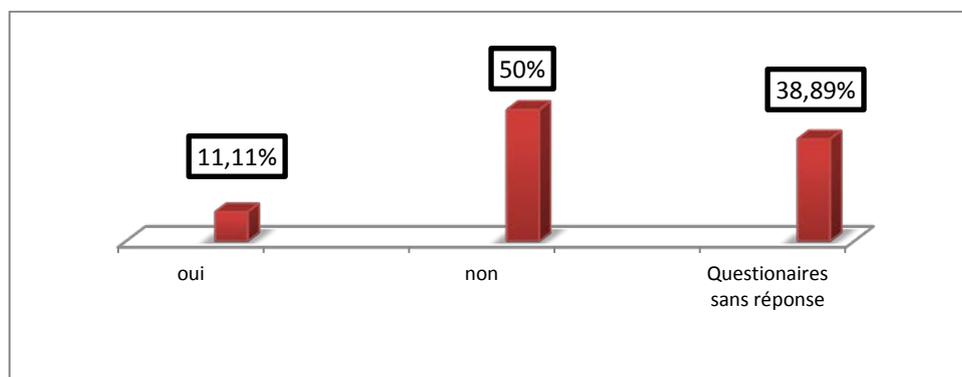


Figure n°33 : Apparition du muguet chez les veaux allaitants.

L'histogramme de la **figure n°33** montre que les éleveurs et les vétérinaires praticiens rencontre le muguet seulement dans 11,11% des cas et on remarque qu'un certains nombre de questionnaires n'ont pas eu de réponse.

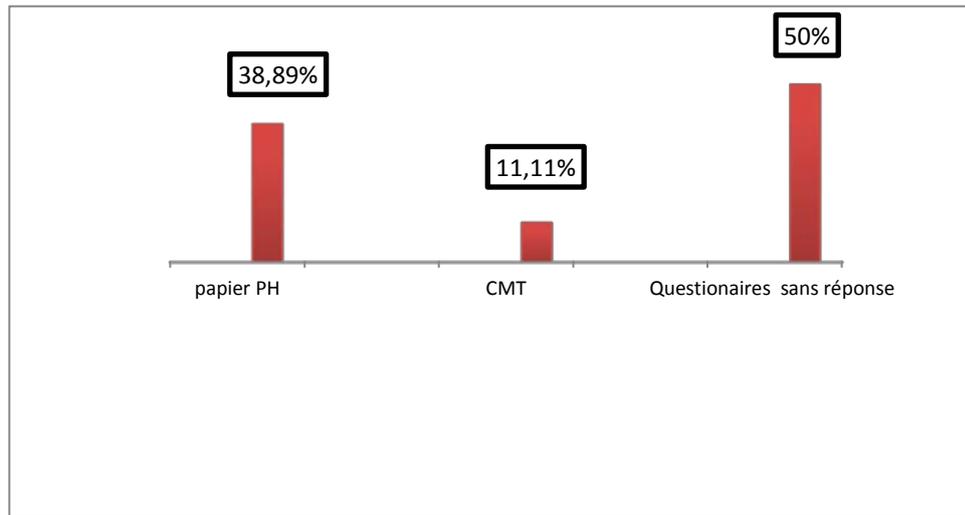


Figure n°34 : la fréquence d'utilisation de tests pour le dépistage des mammites subcliniques.

D'après l'histogramme de **la figure n°34**, un pourcentage de 38,89% des vétérinaires praticiens et éleveurs utilisent le papier PH pour la détection des mammites sur le terrain alors un nombre restreint utilise le test CMT.

II. RESULTATS DE L'ENSEMENCEMENT DES PRELEVEMENTS

II.1.RESULTATS DE L'EXAMEN DIRECT

L'examen direct des **280 échantillons de lait et 07 échantillons de l'eau de l'abreuvoir** a révélé au microscope optique (Gr. x 100 et x 400), la présence dans certains échantillons des filaments mycéliens, des levures et des cellules inflammatoires (leucocytes). Sur un total de 287 échantillons analysés, 179 se sont révélés positifs (**Tableau n°5**)

Tableau n°5 : Résultats de l'examen direct des prélèvements de lait et de l'eau de l'abreuvoir

Nombre d'échantillon ayant subi l'examen direct (lait et l'eau de l'abreuvoir)	Nombre d'échantillons positifs	Nombre d'échantillons négatifs
287	179	108

II.2.RESULTATS DE L'ANALYSE MYCOLOGIQUE

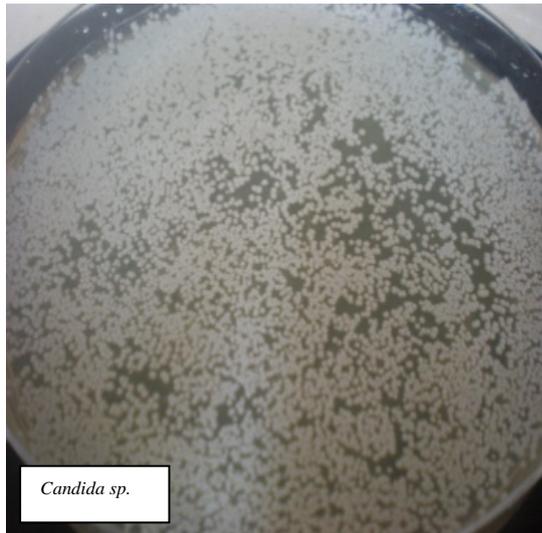
L'analyse mycologique a concerné les 562 prélèvements dont 182 prélèvements ont été positifs :

-164 prélèvements positifs pour les levures, à partir des quels, on a pu isoler 176 espèces de levures.

-19 prélèvements positifs ont concerné des champignons filamenteux.

Tableau n°6 : Nombre de prélèvements positifs

		Traite mécanique	Traite manuelle
Nombre total de prélèvements réalisés	562	402	160
Nombre de prélèvement positifs	182	130	52
Nombre de prélèvement positifs pour les levures	164	117	47
Nombre de prélèvement positifs pour les champignons filamenteux	19	13	05

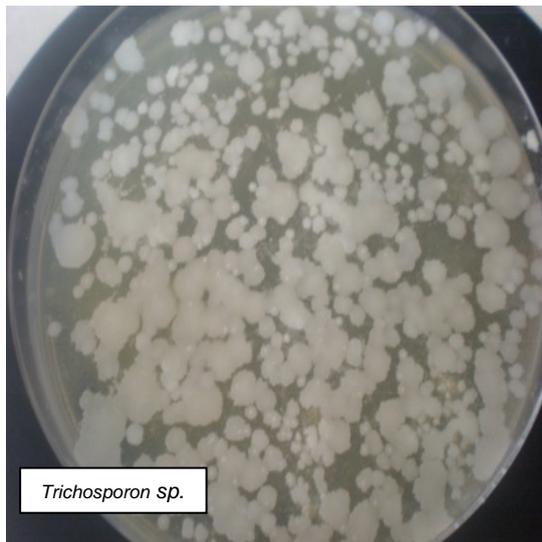


A



B

Figure n°35 : Colonies de levures innombrables poussées après ensemencement d'échantillons de lait (A, B, C). (Original, laboratoire de parasitologie, ENSV-Alger, 2013).



C

Tableau n°7: Les différentes espèces de levures isolées à partir des deux types d'exploitations

Genre	%	Espèce	Nombre	Genre	%	Espèce	Nombre
Elevage avec traite mécanique				Elevage avec traite manuelle			
<i>Candida</i> sp.	68	<i>Candida zeylanoides</i>	34	<i>Candida</i> sp	89,58	<i>Candida zeylanoides</i>	13
		<i>Candida guilliermondii</i>	11			<i>Candida guilliermondii</i>	11
		<i>Candida tropicalis</i>	10			<i>Candida tropicalis</i>	10
		<i>Candida glabrata</i>	01			<i>Candida glabrata</i>	00
		<i>Candida albicans</i>	02			<i>Candida albicans</i>	00
		<i>Candida famata</i>	03			<i>Candida famata</i>	00
		<i>Candida pseudotropicalis</i>	05			<i>Candida pseudotropicalis</i>	00
		<i>Candida rugosa</i>	07			<i>Candida rugosa</i>	04
		<i>Candida boidinii</i>	13			<i>Candida boidinii</i>	03
		<i>Candida lipolytica</i>	01			<i>Candida lipolytica</i>	01
		<i>Candida parapsilosis</i>	00			<i>Candida parapsilosis</i>	01
<i>Rhodotorula</i> sp.	14,84	<i>Rhodotorula glutinis</i>	17	<i>Rhodotorula</i> sp	2,08	<i>Rhodotorula glutinis</i>	00
		<i>Rhodotorula rubra</i>	02			<i>Rhodotorula rubra</i>	01
<i>Cryptococcus</i> sp	7,03	<i>Cryptococcus humicola</i>	05	<i>Cryptococcus</i> sp	4,17	<i>Cryptococcus humicola</i>	02
		<i>Cryptococcus terreus</i>	02			<i>Cryptococcus terreus</i>	00
		<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	02			<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	00
<i>Trichosporon</i> sp	6,25	<i>Trichosporon cutaneum</i>	04	<i>Trichosporon</i> sp	4,17	<i>Trichosporon cutaneum</i>	01
		<i>Trichosporon capitatum</i>	03			<i>Trichosporon capitatum</i>	00
		<i>Trichosporon asahii</i>	01			<i>Trichosporon asahii</i>	01
<i>Saccharomyces</i> sp	1,56	<i>Saccharomyces cerevicea</i>	02	<i>Saccharomyces</i> sp		<i>Saccharomyces cerevicea</i>	00
<i>Kloeckera</i> sp	0,78	<i>Kloeckera apis</i>	01	<i>Kloeckera</i> sp		<i>Kloeckera apis</i>	00
<i>Sporobolomyces</i> sp	0,78	<i>Sporobolomyces salmonicolo</i>	01	<i>Sporobolomyces</i> sp		<i>Sporobolomyces salmonicolo</i>	00
<i>Geotricum</i> sp	0,78	<i>Geotricum candidum</i>	01	<i>Geotricum</i> sp		<i>Geotricum candidum</i>	00
Total	100		128	Total	100		48

Dans le tableau n° 6, on remarque que les élevages à traite mécanique sont plus contaminés que les élevages à traite manuelle.

De 164 prélèvements positifs en levures, on a pu isoler 176 espèces de levures dont 128 espèces isolées des prélèvements effectués dans les élevages à traite mécanique et 48 espèces isolées des prélèvements effectués dans les élevages à traite manuelle.

Tableau n°8 : Les différents genres de levures isolés dans notre étude et leur fréquence.

Genre	Nombre d'espèces du même genre	%
<i>Candida sp.</i>	130	73,86
<i>Rhodotorula sp.</i>	20	11,36
<i>Cryptococcus sp.</i>	11	6,25
<i>Trichosporon sp.</i>	10	5,68
<i>Saccharomyces sp.</i>	02	1,13
<i>Kloeckera sp.</i>	01	0,57
<i>Sporobolomyces sp.</i>	01	0,57
<i>Geotricum sp.</i>	01	0,57
Total	176	100

Les 176 espèces ont été réparties sur 08 genres, dont le plus grand pourcentage est accordé au genre *candida*.

Tableau n°9: Les différentes espèces de levures isolées dans notre étude et leur fréquence.

	Espèce	Nombre d'isolement de la même espèce dans notre étude	%
01	<i>Candida zeylanoides</i>	47	26,70
02	<i>Candida guilliermondii</i>	22	12,5
03	<i>Candida tropicalis</i>	20	11,36
04	<i>Candida glabrata</i>	01	0,57
05	<i>Candida albicans</i>	02	1,13
06	<i>Candida famata</i>	03	1,7
07	<i>Candida pseudotropicalis</i>	05	2,84
08	<i>Candida rugosa</i>	11	6,25
09	<i>Candida boidinii</i>	16	9,09
10	<i>Candida lipolytica</i>	02	1,13
11	<i>Candida parapsilosis</i>	01	0,57
12	<i>Rhodotorula glutinis</i>	17	9,66
13	<i>Rhodotorula rubra</i>	03	1,70
14	<i>Cryptococcus humicola</i>	07	3,98
15	<i>Cryptococcus terreus</i>	02	1,13
16	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	02	1,13
17	<i>Trichosporon cutaneum</i>	05	2,84
18	<i>Trichosporon capitatum</i>	03	1,70
19	<i>Trichosporon asahii</i>	02	1,13
20	<i>Saccharomyces cerevicea</i>	02	1,13
21	<i>Kloeckera apis</i>	01	0,57
22	<i>Sporobolomyces salmonicolo</i>	01	0,57
23	<i>Geotricum candidum</i>	01	0,57
	Total	176	100

Au vu du **tableau récapitulatif n°9** :

- dans le genre *candida*, l'espèce la plus isolée est *C. zeylanoides* (26,70%).
- dans le genre *Rhodotorula*, l'espèce la plus isolée est *R. glutinis* (9,66%).
- dans le genre *Cryptococcus*, l'espèce la plus isolée est *Cr. Humicola* (3,98%).
- dans le genre *Trichosporon*, l'espèce la plus isolée est *T. cutaneum* (2,84)

III. PREVALENCE DE L'INFECTION MYCOSIQUE DANS LES ELEVAGES ETUDIES

La prévalence totale de l'infection fongique (levures et champignons filamenteux) dans notre étude est estimée à **32,79%** et l'occurrence de l'infection aux levures seules est de **29,54%**.

Tableau n°10 : la prévalence de l'infection fongique selon le mode de traite.

prévalence	traite mécanique	Traite manuelle
Infection par les levures et champignons filamenteux	32,58%	33,33%
Infection par levures seules	29,32%	30,12%

Le **tableau n° 10**, montre que toute analyse mycologique fait apparaitre deux type de champignons : - champignons sous forme de filaments.

- champignons sous forme de levures

La prévalence de ces champignons d'une manière générale est presque le même dans les deux types de traite que ce soit pour :

- les levures et les champignons filamenteux (traite mécanique : 32,58%, traite manuelle : 33,33%).

Ou pour

- les levures seules (traite mécanique : 29,32%, traite manuelle : 30,12%)

Selon le test khi deux d'indépendance, la différence est non significative, il y a une indépendance entre le taux d'infection et le type de traite avec un seuil de signification $p > 5\%$. Ceci signifie que le problème ne se pose pas au niveau de la méthode de traite mais dans les conditions de déroulement de cette traite.

IV. LES ESPECES DE LEVURES ISOLEES DANS LE LAIT ET DANS D'AUTRES ECHANTILLONS ANALYSES.

Tableau n°11 : Les espèces de levures isolées dans le lait et dans d'autres échantillons analysés.

Levures isolées dans le lait	Identification du lait dans le quel la levure a été isolée	autres échantillons analysés dans les quels la même levure a été isolée
<i>Candida tropicalis</i>	Lait prélevé de 03 trayons de la vache n°3 de l'élevage n°8: AD ; AG et PG.	L'eau de l'abreuvoir
<i>Candida rugosa</i>	Lait prélevé des trayons des vaches de l'élevage n°9: - PG de la vache n°3 ; - PG de la vache n°2 ; - AD de la vache n°1.	
<i>Cryptococcus humicola</i>	Lait prélevé du trayon AD de la vache n°1 dans l'élevage n°4.	
<i>Candida zeylanoides</i>	Lait prélevé des trayons des vaches de l'élevage n°6: - AD de la vache n°7 - AD de la vache n°6 -PG de la vache n°2 -PG de la vache n°2	Ecouvillons des mains des trayeurs
<i>Candida guilliermondii</i>	Lait prélevé des trayons des vaches de l'élevage n°12: - AD de la vache n°2 - PG de la vache n°1.	Ecouvillons du seau et de la citerne

Ce **tableau n°11**, montre que nous avons isolé par l'analyse mycologique des espèces de levures dans des échantillons de lait et autres échantillons autres que le lait tel que l'eau de l'abreuvoir, les écouvillons des mains des trayeurs ainsi que les écouvillons de la citerne.

DISCUSSION

A/L'enquête réalisée sous forme de questionnaire distribué aux vétérinaires de la région de Sidi Lahcène a révélé l'importance du respect de l'hygiène de l'environnement de l'animal. En effet, l'humidité provenant des urines et du lait ainsi que la chaleur corporelle, favorisent le développement des champignons et plus précisément les levures dans la litière, d'où l'importance du renouvellement régulier de la litière dans une étable. Aussi, il faut changer la litière une fois par jour ou une fois tous les deux jours, alors que le renouvellement une fois par semaine, est trop long et la litière devient un réservoir de germes, ce qui augmente le risque des mammites (**histogramme de la figure n°17**). Selon **KELLER et al., (2000)**, les levures qui sont retrouvées dans les endroits humides, riches en matière organique sont facilement isolées des trayons et des équipements de traite.

Dans 66,67% des cas, les mammites persistent après traitement antibiotiques (**histogramme de la figure n°31**). Selon **SLAVOLJUB STANOJEVIC et DEJAN KRNJAJIC (2011)**, si aucune recherche bactériologique dans le lait n'est effectuée, les mammites fongiques sont suspectées quand le traitement antibiotique échoue.

Après un traitement antibiotique prolongé, les mammites mycosiques apparaissent dans 27,78% des cas sans oublier les 27,78% des questionnaires sans réponse (**histogramme de la figure n°32**), ce qui a été signalé par plusieurs auteurs (**ELAD et al., 1995, GONZALEZ 1996, MALINOWSKI et al., 2002, WOLOSZYN et al., 1964**).

Les foyers de mammites causés par les levures ont été signalés dans les troupeaux gérés avec des défaillances dans l'hygiène de l'environnement ou en association avec traitement antibiotique en intra mammaire répétitif (**FARNSWORTH et al., 1972, MORETTI et al., 1998**).

B/La prévalence de la mammite associée à des champignons et des levures est généralement faible par rapport aux autres agents de mammites (**WATTS, 1988**).

Notre étude a concerné l'infection de la glande mammaire chez les bovins par les levures ; elle a été réalisée sur **13 élevages** bovins comportant en totalité **70 vaches** de la région de Sidi Lahcène, dans la wilaya de Sidi Belabbas. Les prélèvements ont été effectués durant le deuxième trimestre 2012 et ont été conservés par congélation à - 20°C jusqu'au jour de leur analyse.

L'analyse mycologique a été réalisée durant le premier semestre de l'année 2013. Les résultats de notre étude montrent que la prévalence de l'infection aux levures est de **29,54%**. Nos résultats sont concordants aux fréquences rapportés par de nombreux auteurs, comme **SIMARIA et DHOLAKIA (1986)** en Inde, **SUDARWANTO (1987)** en Indonésie, avec 29,27% et 34%

respectivement, ainsi que **COSTA et al.**, (2012) au Brésil (29,35%). D'autres auteurs ont noté des fréquences moins élevées comme, **SUKUMAR et JAMES** (2012) en Inde (13%) et **WAWRON et al.**, (2010) en Pologne (7,07%), **CZERNOMYSY-FUROWICZ et al.**, (2008) en Pologne (1,28%), **COSTA E.O. et al.**, (1993) au Brésil (10%), **SANTOS et MARIN** (2005) au Brésil (17,3%), **KRUKOWSKI et al.** (2000 et 2006) en Pologne (9,6% et 4,2%), **BOURTZI-HATZOPOULOU et al.** (2003) en Grèce (6,2%), **TÜRKYILMAZ SÜHEYLA et al.**, (2010) en Turquie (12,1%), **PENGOV** (2002) en Slovénie (5,6%) et enfin **PENGOV et ZDOVC** (1998) en Slovénie (4,1%).

La grande majorité des levures sont considérés comme des saprophytes, bien que dans certains cas, ils sont considérés comme potentiellement pathogènes (**CHENGAPPA et al.**, 1984). Les Champignons ont également été signalés comme un agent étiologique des mammites par divers chercheurs (**COSTA et al.**, 1998, **LAGNEAU et al.**, 1996). Ce phénomène est dû à l'utilisation fréquente des antibiotiques. Ils sont utilisés non seulement dans le traitement, mais également dans la période de tarissement. L'antibiothérapie conduit à une perturbation dans l'homéostasie de la mamelle, l'inhibition de lymphocytes T et de l'activité des neutrophiles et en conséquence, à la stimulation de la croissance des levures (**SHENG et al.**, 1987 ; **CORTI et al.**, 2003, **NORIS et al.**, 2007). La moitié des vaches, chez les quelles le lait est contaminé par les levures, ont été traitées avec des agents antimicrobiens (pénicilline, streptomycine, tétracycline, la lincomycine, et la nystatine).

Les agents étiologiques de mammite mycosique sont principalement des levures, notamment *Candida* sp. qui est selon plusieurs auteurs retrouvé plus fréquemment (**AALBAEK et al.**, 1994 ; **DE CASIA DOS SANTOS et al.**, 2005 ; **ELAD et al.**, 1995 ; **KELLER et al.**, 2000 ; **KIVARIA et al.**, 2007 ; **KRUKOWSKI et al.**, 2000 ; **MALINOWSKI et al.**, 2002 ; **CZERNOMYSY-FUROWICZ et al.**, 2008 ; **MORETTI et al.**, 1998 ; **SPANAMBERG et al.**, 2008 ; **SWINNE et al.**, 1997 ; **COSTA et al.**, 1993 ; **WATTS** , 1988 ; **PENGOV** , 2002). Nos résultats concordent avec les données de la littérature ; en effet, le genre *candida* sp. a été isolé dans **73,86%** des levures isolées, ce qui correspond à environ 130 espèces isolées.

Suivi par le genre *Rhodotorula* sp. dont *Rhodotorula glutinis* (9,66%), *Rhodotorula rubra* (1,70%), en troisième position le genre *Cryptococcus* sp. dont *Cryptococcus humicola* (3,84%), *Cryptococcus terreus* et *Cryptococcus uniguttulatus* (1,13%). En quatrième position le genre

Trichosporon sp. avec une fréquence de 2,84% pour l'espèce *Trichosporon cutaneum*, 1,70% pour *Trichosporon capitatum* et 1,13% pour *Trichosporon asahii*. *Saccharomyces cervicea* est isolée dans 1,13% et en fin *Kloeckera apis* (0,57%), *Sporobolomyces salmonicolo* (0,57%), *Geotrichum candidum* (0,57).

La plupart des espèces de levures isolées dans cette étude ont également été rapportés par de nombreux auteurs comme cause de mammite (MONGA et KALRA, 1971 ; JAND et DHILLON, 1975 ; SHARMA et al., 1977 ; SHAH et al., 1986 et SINGH et al., 1998). Les quatre genres de levure : *candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* ont été également isolées dans l'étude menée en Pologne (2010) par WAWRON et al.

Les levures les plus couramment isolées des mammites mycosiques sont les genres suivants: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Torulopsis*, et *Geotrichum* (AALBAEK et al., 1994) ; COSTA et al., 1993 ; KRUKOWSKI et al., 2000 ; LAGNEAU (1996), MORETTI et al., 1998 ; RICHARD et al., 1980 ; SPANAMBERG et al., 2008 ; WOLOSZYN et al., 1964).

De nombreuses espèces de levure ont été signalées comme agent causal de la mammite (COSTA et al., 1993 ; BOURTZI-HATZOPOULOU et al., 2003 ; SANTOS et MARIN , 2005 ; KRUKOWSKI et al., 2006 ; SEKER , 2010 ; TÜRKYILMAZ et KAYNARCA 2010). Ainsi, BOURTZI-HATZOPOULOU et al., (2003) ont rapporté que les levures isolées appartenaient aux genres *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*. KRUKOWSKI et al., (2000) ont signalé que toutes les levures isolées appartenaient aux genres *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* et dans une autre étude KRUKOWSKI et al., (2006) ont isolé *Candida*, *Trichosporon*, *Saccharomyces*, et *Rhodotorula*, alors que celles isolées par TÜRKYILMAZ et al., (2010) sont les genres *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* et *Saccharomyces*.

Dans notre présente étude, les levures que nous avons isolées appartiennent aux genres *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *Trichosporon*. Ainsi, 23 espèces de levures ont été identifiées dont 07 ont également été isolées durant une étude menée en inde par SUKUMAR et al., en 2012 ; à savoir,

1. *C. tropicalis* (26,92%) largement supérieur à ce qui a été trouvé dans notre travail (11,36%).
2. *C. parapsilosis* (7,69%) supérieur à nos résultats (0,57%)

3. *C. guilliermondii* (3,84%) inférieur à la fréquence de 12,5% trouvée dans notre étude.
4. *R. rubra* (3,84%) supérieur à ce qui a été trouvé dans notre travail (1,70%)
5. *T. cutaneum* (11,53%) supérieur à nos résultats (2,84%)
6. *G. candidum* (15,38%) largement supérieur aux résultats de notre étude (0,57%)
7. *Saccharomyces cerevisiae* (3,84%) supérieur à ce qui a été trouvé dans notre étude (1,13%)

Par contre, **TÜRKYILMAZ et al.**, (2010) ont isolé durant leur étude, 41 espèces de levures en Turquie dont *C. guilliermondii* (7.3%), et *C. rugosa* (2,4%) inférieurs au taux trouvé durant notre étude (12,5 % et 6,25%), (4.9%) *Tr. mucoides*, espèce non isolée dans notre enquête, (4,9%) *Tr. asahii*, (2.4%) *S. cerevisiae* (2,4%) supérieurs au pourcentage signalé dans la présente étude (1,13 pour les deux espèces).

De plus, il est intéressant de noter que dans notre étude :

- Une même espèce a été isolée à partir des quatre trayons d'un même animal (exemple : *Candida zeylanoides* et *Candida tropicalis*).
- Des espèces différentes appartenant au même genre ont été isolées à partir des trayons d'un même animal (exemple : *Candida zeylanoides*, *Candida tropicalis*, et *Candida parapsilosis*)
- Des genres différents de levures isolés à partir des trayons d'un même animal (exemple: *Candida zeylanoides* et *Trichosporon cutaneum*)
- Des genres différents de levures isolés à partir d'un même trayon (exemple : *Candida zeylanoides*, et *Cryptococcus humicola*)
- Des levures isolées de deux trayons et les deux autres étés indemnes d'infection.

Ceci indique que plusieurs agents fongiques peuvent infecter le même animal comme dans l'infection bactérienne et que chaque quartier est indépendant de l'autre.

Les levures pathogènes comme *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Geotricum candidum* et *Candida kefir* montrent une grande activité biochimique. Elles changent le pH dans la mamelle par la fermentation des glucides. En conséquence, elles acidifient l'environnement et inhibent le développement de la flore bactérienne (**CZERNOMYSY-FUROWICZ et al., 2008**).

Chez les vaches, la mammite mycosique est principalement causée par des levures du genre *Candida*, *Cryptococcus* et *Trichosporon* (JENSEN et al., 1996 ; SPANAMBERG et al., 2009).

Le genre *Candida*

Candida est un commensal des espaces cutanéomuqueuses, en particulier des voies intestinales et génitales. Il a été rapporté que la distribution des espèces de *Candida* isolées à partir de lait de mammite bovine a montré la diversité dans plusieurs enquêtes (KRUKOWSKI et al., 2000 ; PENGOV, 2002 ; SANTOS et MARIN, 2005; WAWRON et al., 2010).

PENGOV, (2002) a souligné que *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. albicans* et *C. kefyr* ont été principalement isolées de lait de vaches atteintes de mammite. Bien que KRUKOWSKI et al., (2000) ont montré que les espèces les plus fréquemment isolés étaient *C. kefyr*, *C. ciferrii*, et *C. krusei*. WAWRON et al., (2010) ont rapporté que *C. krusei*, *C. kefyr*, et *C. lusitaniae* étaient les espèces les plus communes. Dans une autre étude, *C. krusei* et *C. rugosa* ont été signalés comme les espèces les plus communément isolées du lait mammite chez les bovins (SANTOS et MARIN ; 2005). SEKER, (2010) a isolé dans son étude : *Candida krusei* (27,3%), *Candida rugosa* (16,7%), *C. kefyr* (12,1%) et *C. tropicalis* (10,6%) fréquemment rencontrées chez les buffles d'Anatolie atteints de mammite.

SUKUMAR et JAMES, (2012) ont isolé durant leur étude réalisée en Inde, les espèces suivantes : *Candida tropicalis* (26.92%), *Candida parapsilosis* (7.69%), *Candida guilliermondii* (3.84%).

Dans notre présente étude nous avons isolées plusieurs espèces de *Candida* ; à savoir ; *candida zeylanoides* (26,70%), *Candida guilliermondii* (12,5%) , *Candida tropicalis* (11,36%), *Candida boidinii*(9,09%) , *Candida rugosa* (6,25%), *Candida pseudotropicalis*(1,70%) , *Candida famata* (1,70%), *Candida albicans*(1,13%), *Candida lipolytica* (1,13%), *Candida glabrata*(0,57%) ,*Candida parapsilosis* (0,57%). Selon certains auteurs, les espèces animales et les variations géographiques peuvent être la raison de cet écart dans la distribution des espèces (SEKER et al., 2011).

Des études antérieures sur plusieurs troupeaux ont également montré que le genre *Candida* était plus souvent isolé lors de mammite bovine avec une grande diversité d'espèces (AALBAEK ,

1994 ; KRUKOWSKI et al., 2006 ; COSTA et al., 1993 ; SANTOS et al., 2005). Autres Chercheurs ont également rapporté *Candida* sp. comme un agent causal de la mammite bovine (PENGOV, 2002 ; DWORECKA-KASZAK et al., 2012). D'autres auteurs ont rapporté que la fréquence d'isolement la plus élevée est attribuée à *Candida tropicalis* dans les mammites à levure comparé aux autres espèces (RICHARD et al., 1980; GUPTA et al., 1981 ; SIMARIA et DHOLAKIA , 1986).

Contrairement à nos résultats, la fréquence la plus élevée est attribuée à *Candida zeylanoides* (26,72%), *Candida tropicalis* étant classée troisième avec une fréquence de 11,36%.

Pour l'espèce *C. guilliermondii*, elle est souvent isolée soit à partir du lait sain (LAGNEAU et al., 1996) ou chez des vaches malades (MORETTI et al., 1998) car cette levure est très répandue dans la nature, et également présente chez la plupart des animaux et chez l'homme.

Il est bien établi que les levures du genre *Candida*, par exemple, sont capables d'utiliser des antibiotiques tels que la pénicilline et la tétracycline comme sources d'azote (LOFTSGARD et al., 1960). De plus, de fortes doses d'antibiotiques peut provoquer une réduction de la vitamine A, causant des lésions de l'épithélium de la mamelle, facilitant l'invasion des champignons (KRUKOWSKI et al., 2000). Diverses études signalent la présence et l'isolement des levures dans des échantillons de lait provenant d'animaux avec mammite (KUO et al., 1993 ; KRUKOWSKI et al., 2006 ; SANTOS et MARIN , 2005) et également dans les réservoirs de stockage de lait (RUZ-PEREZ et al., 2004 ; SPANAMBERG et al., 2004), ce qui correspond aux résultats que nous avons obtenus durant notre étude ; puisque *Candida guilliermondii* a été isolée dans le seau et la citerne du stockage du lait.

En cas d'apparition de la mammite bovine, certains rapports indiquent une cause fongique non-*albicans*, représentée par des espèces telles que *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida catenulata*, *Candida zeylanoides*, *Candida lambica* et *Candida inconspicua* (BENESI et al., 1983 ; COSTA et al., 1993 ; LAGNEAU et al., 1996 ; LOKEN et al., 1959 ; MOS et al., 1978 ; SANTOS et MARIN , 2005 ; SWINNE et al., 1997) quatre espèces de *candida* rapportées par ces auteurs ont été isolées dans la présente étude (*Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* , *Candida rugosa* et *Candida zeylanoides*)

KRUKOWSKI et al., (2000) ont noté que l'isolement des levures telles que *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* peut être lié à des traitements antibiotiques chez les animaux souffrant de mammites.

RICHARD et al., (1980) ont constaté que *C. tropicalis* et *C. rugosa* sont les espèces les plus communément isolées à partir des glandes mammaires des vaches infectées à New York et en l'Iowa.

Il a été rapporté que les espèces du genre *Candida* peuvent provoquer une mammite clinique caractérisée par la douleur, de la fièvre prolongée et une réaction inflammatoire dans la glande mammaire et les ganglions lymphatiques associés à une réduction de la production laitière chez les animaux (**SINGH et al.**, 1998). Ils peuvent également être isolés à partir d'animaux souffrant d'une mammite subclinique (**ÖZENÇ et al.**, 2008; **SEKER** , 2010). Outre les facteurs de virulence bien connus chez *Candida* tels que les enzymes hydrolytiques, les toxines, le dimorphisme et la production d'hémolysine (**HAYNES, 2001; YANG, 2003 ; PENGOV, 2002**) ont souligné que *C. krusei*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. albicans* et *C. kefyr* ont été principalement isolées de vaches atteintes de mammite.

Le genre *Rhodotorula*

C'est une levure qui est très répandue dans la nature, retrouvée au niveau du sol, dans l'air, dans l'eau et dans les aliments. Les deux espèces souvent isolées sont *R. rubra* et *R. glutinis* ; ce qui est le cas dans la présente étude.

La fréquence d'isolement du genre *Rhodotorula* dans notre étude est de 11,36 % (n=20) ce qui est largement supérieur au pourcentage signalé par **WAWRON** en Pologne en 2010 (1,33% équivalent à 02 isollements). **SUKUMAR et JAMES** ont isolé dans leur enquête réalisée en inde en 2012, une seule espèce ; *Rhodotorula rubra* (3.84%).

Le genre *Cryptococcus*

Les levures du genre *Cryptococcus* vivent en saprobiose dans le milieu extérieur, dans le sol riche en matières organiques, notamment les excréments de pigeons, qui constituent la principale source. *Cryptococcus* est présent également dans la poussière, la peau, les muqueuses, le tractus intestinal des animaux sains.

Dans cette enquête, *Cryptococcus* sp. représente 6,25% des isollements, ce qui est inférieur à la fréquence (10,3%) retrouvée dans l'étude réalisée au Brésil par **SPANAMBERG et al.**, (2008), mais nettement supérieure au pourcentage signalé par **WAWRON** en Pologne en 2010 (0.67% équivalent à 01 isolement). *Cryptococcus neoformans* est considérée comme la plus dangereuse espèce de ce genre, elle n'a pas été identifiée.

Le genre *Trichosporon*

Les levures du genre *Trichosporon* sont largement répandues dans la nature, saprophytes du sol, du bois, des fruits, des matières fécales. Ce genre a été cité par plusieurs auteurs comme étant des champignons pathogènes, notamment les espèces *Tr. capitatum*, et *Tr. cutaneum*. (**FAMEREE et al., 1970; LOFTSGARD et LINDQUIST, 1960**).

Notre étude a mis en évidence ce genre avec un taux de 6,25% supérieur au pourcentage signalé par **WAWRON** en Pologne en 2010 (1,33%). Trois espèces ont été isolées : *Trichosporon cutaneum* (2,84%), *Trichosporon capitatum* (1,70%), *Trichosporon asahii* (1,13%).

SUKUMAR et JAMES a isolé *Trichosporon cutaneum* avec une fréquence de 11.53% en Inde (2012).

Le genre *Saccharomyces*

Cette levure est répandue dans la nature. Rarement impliquée en pathologie. La présente étude a mis en évidence l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* avec un faible taux : 1,13 %. La même espèce a été isolée par **SUKUMAR et JAMES** (3.84%) en Inde en 2012.

Le genre *Geotrichum*

MISRA et PANDA (1986), **COSTA et al.**, (1993) ont isolé *Geotrichum candidum* à partir des échantillons de lait, nous avons également isolé cette espèce mais avec une faible fréquence (0,57%).

Les levures isolées de l'eau de l'abreuvoir ne sont pas impliquées dans les cas de mammites fongiques car on se basant sur notre enquête, les éleveurs ne lavent pas les mamelles à partir de cette eau mais ils utilisent directement l'eau du robinet ; par contre, les levures isolées des écouvillons des mains des trayeurs peuvent contaminer les mamelles directement.

SUKUMAR et JAMES ont isolé dans leur étude réalisée en Inde, *Geotrichum candidum* avec une fréquence très élevée (15.38%) en la comparativement à celle trouvée dans notre étude (0.57%).

CONCLUSION

CONCLUSION

L'étude bibliographique ainsi que les résultats que nous avons obtenus, nous permettent de compléter les données recueillies sur les mammites fongiques en Algérie. L'absence de demande d'examen de laboratoire précis lors de mammité et la non spécificité des symptômes lors de mammites fongiques et mammites bactériennes, entraînent une mauvaise prise en charge de cette affection puisque sur le terrain elle est systématiquement traitée aux antibiotiques et aux anti-inflammatoires (voie diathétique). Entraînant ainsi, une possible rupture de l'équilibre myco-bactérien, déjà perturbé et aggraver ainsi l'inflammation de la mamelle d'origine fongique.

A la lumière de notre étude, nous avons constaté que les mammites fongiques sont surtout observées sur des vaches en lactation. Ceci est probablement en relation directe avec la modification de l'intégrité des mécanismes de défense basse de la mamelle pendant la lactation.

La particularité des mammites fongiques tient du fait que leurs formes épidémiologiques dépendent de l'intervention d'un ensemble de facteurs et de leurs combinaisons entre eux, plus que de l'agent causal. De plus, les mammites fongiques ayant la plus part du temps une tendance à l'autolimitation et à la guérison spontanée, ce sont d'autres facteurs d'intervention qui généralement en assurent la persistance ou l'extension de l'affection.

La prévalence globale a été estimée à 29,54 % avec une grande diversité des espèces. Ce taux élevé d'infection révèle l'importance des mammites en général et des mammites d'origine fongique en particulier dans nos élevages bovins laitiers, et confirme de ce fait, que les mammites quelque soit l'étiologie est l'une des principales pathologies dans un élevage bovin laitier.

L'analyse du questionnaire distribué aux vétérinaires praticiens de la région de Sidi Lahcène, wilaya de Sidi BelAbbas, a mis en évidence de nombreuses lacunes en matière de conduite d'élevage et notamment le respect des règles générales de l'hygiène, des conditions de traite et de l'ambiance générale. L'hygiène dans les étables ne doit pas être un acte supplémentaire dans la conduite de l'élevage mais en être constitutive.

Il ressort de notre étude que la pénétration par voie endogène des levures est rare, mais il faut attacher une grande importance à la pénétration exogène et les facteurs favorisants, déclenchant le mécanisme d'apparition des mammites fongiques chez les bovins.

En dépit de ce qui a été rapporté dans la littérature sur la prédominance des mammites mycosiques iatrogènes et d'exposition, pour lesquelles les antibiotiques ont un rôle prépondérant, nous signalons l'importance de l'environnement contaminé, toujours fondamentale, qui est à l'origine de formes latentes et infracliniques et les formes cliniques n'en sont le plus souvent qu'un épiphénomène apparaissant à la faveur d'une augmentation de l'exposition.

La traite, à travers l'homme ou la machine à traire, constitue un facteur d'entretien, de transmission de l'infection et d'apparition de nouveaux cas. Durant notre étude, nous avons eu l'occasion de montrer que ces mammites fongiques sont opportunistes, largement tributaires du milieu extérieur, de la réceptivité des animaux, du pouvoir pathogène de l'agent fongique en cause et aussi des interventions extérieures comme celle de la machine à traire ou encore celle de l'homme ; sachant que les champignons sont des germes d'environnement, qui se multiplient peu à la température du corps, qu'ils n'ont pas d'affinité spécifique pour le lait et n'ont donc aucune raison de provoquer seuls de façon autonome l'apparition, le développement et l'extension des mammites mycosiques. Cependant, l'entretien de ces affections peut être lié à l'existence de sources secondaires : animaux infestés cliniquement ou de façon latente, sources liées à la traite et le trayon se trouve en être la clef.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

A travers notre enquête, nous avons pu constater que l'incidence des mammites fongiques varie beaucoup suivant les régions et les enquêtes. Dans le but de minimiser ces affections et les pertes économiques qu'elles engendrent, on propose les recommandations suivantes :

A. Le praticien, confronté à un problème de mammite dans un cheptel laitier, doit être alerté face à une anamnèse suivante : un récent traitement antibiotique intra-mammaire suivi de l'apparition, de la persistance ou même de l'aggravation des signes cliniques. L'échec d'un tel traitement doit faire suspecter une infection fongique de la mamelle.

B. L'environnement, constitue un point capital dans la genèse des mammites mycosiques, ce qui rend difficile la mise au point d'une stratégie de lutte pour éradiquer ou diminuer leur incidence.

Toutefois, il faut insister sur les mesures d'hygiène concernant l'habitat de l'animal, à savoir : le milieu extérieur, les interventions humaines, la traite et l'animal lui-même.

Il ne faut pas créer des conditions favorables au développement fongique (obscurité, humidité et chaleur), ce qui signifie un entretien correct et une bonne utilisation d'un habitat bien conçu car un habitat mal entretenu donne aux champignons des conditions favorables à leur développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

AALBAEK B., STENDERUP J., JENSEN H. E., VALBAK J., NYLIN B. et HUDA A. (1994).

Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark.

Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, vol. 102, n. 6, p. 451-456.

ABOUL-GABAL M., HOGLE R.M. et WEST J.K. (1977).

Pyometra in a mare caused by *Candida rugosa*.

Journal of the American Veterinary Medical Association.170: 177-178.

AINSWORTH G.C. et AUSTWICK P.K.C. (1959).

Fungal diseases of farm animals.

Review Series 6. Common wealth Agricultural Bureau, England.

AKIYAMA T. E., SAKAI S., LAMBERT G., NICOL C. J., MATSUSUE K., PIMPRALE S., LEE Y. H., RICOTE M., GLASS C. K., BREWER H. B., JR., et GONZALEZ F. J. (2002).

Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux.

Molecular and cellular biology 22:2607-2619

ANDERSON J.C. (1978).

The problem of immunization against staphylococcal mastitis.

British Veterinary Journal, 134,412-420;

B

BENESI F J., BIRGEL E.H., GANDRA C.R.P., ARAÚJO W.P. et FANUCCHI M.V.S. (1983).

Mastite bovina causada por levedura – *Candida rugosa*.

São Paulo, Anais da 2a. Semana de Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária Zootecnia da USP; 1: 67.

BERRY A. et BALARD P., COSTE A., OLAGNIER D., LAGANE C., AUTHIER H., BENOIT-VICAL F., LEPERT J. C., SEQUELA J. P., MAGNAVAL J. F., CHAMBON P., METZGER D., DESVERGNE B., WAHLI W., AUWERX J. ET PIPY B.(2007).

IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR-gamma activation. European Journal of Immunology.

BERTHELOT X., LEBRET P. et PETIT C. (1987).

Les infections mammaires de la vache laitière.

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 192p.

BOURTZI-HATZOPOULOU E., ZDRAGAS A., PETRIDOU E. et FILIOUSIS G. (2003).

Yeasts as a causative agent of bovine mastitis in Greece.
Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society 54: 105-110.

BRADLEY A. J. (2002).

Bovine mastitis: an evolving disease.
Veterinary Journal, v. 164, n. 2, p. 116-128.

BRADLEY A. J. et al. (2004).

The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention.
Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 20: p547-568.

BURVENICH C., GUIDRY A.J. et PAAPE M.J. (1995).

Natural defence mechanisms of the lactating and dry mammary gland.
Proceedings of the 3rd Intern. Congress Mastitis, Tel Aviv , 3-13.

C

CALDERONE R., DIAMOND R., SENET J. M., WARMINGTON J., FILLER S. ET AL. (1994).

Host cell/fungal cell interactions.
Journal of medical and veterinary mycology 32 Suppl 1: 151-68.

CHABASSE D., GUIGUEN C. et CONTET-AUDONNEAU N. (1999).

Mycologie médicale.
Paris: Masson; 161-5.

CHAWLA A., BOISVERT W. A., LEE C. H., LAFFITTE B. A., BARAK Y., JOSEPH S. B., LIAO D., NAGY L., EDWARDS P. A., CURTISS L. K., EVANS R. M. et TONTONNOZ P. (2001).

A PPAR gamma- LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. Molecular Cell. 7: 161-171.

CHENGAPPA M.M., MADDUX R.L., GREER S.C., PINCUS D.H. et GEIST L.L. (1984).

Isolation and Identification of yeasts and yeastlike organisms from clinical veterinary sources.
Journal of Clinical Microbiology 19: 427-428.

CLOHISY D. R., BAR-SHAVIT Z., CHAPPEL J. C. et TEITELBAUM S. L. (1987).

1, 25-Dihydroxyvitamin D3 modulates bone marrow macrophage precursor proliferation and differentiation. Up-regulation of the mannose receptor.

The Journal of biological chemistry 262:15922-15929.

CORTI S., SICHER D., REGLI W. et STEPHAN R. (2003).

Current data on antibiotic resistance of the most important bovine mastitis pathogens in Switzerland.

Schweiz Archiv. Tierheilkd 145, 571–575.

COSTA G. M., PEREIRA U. P., SOUZA-DIAS M. A. G. et SILVA N. (2012).

Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd.

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science . São Paulo, v. 49, n. 3, p. 239-243.

COSTA E. O., RIBEIRO A. R., WATANABE E. T. et MELVILLE P. A. (1998)

Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms.

Journal of Veterinary Medicine Series B, 45(2): 65-71.

COSTA E. O., GANDRA C. R., PIRES, M. F., COUTINHO S. D., CASTILHO W. et TEIXEIRA C. M. (1993).

Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. Mycopathologia, vol. 124, n. 1, p. 13-17.

COSTE A., DUBOURDEAU M., LINAS M. D., CASSAING S., LEPERT J. C., BALARD P., CHALMETON S., BERNAD J., ORFILA C., SEGUELA J. P. et PIPY B. (2003).

PPAR γ promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13.

Immunity 19:329-339.

COSTE A., LINAS M. D., CASSAING S., BERNAD J., CHALMETON S., SEGUELA J. P. et PIPY B. (2002).

A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon- γ - and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages.

The Journal of antimicrobial chemotherapy 49:731-740.

CRAVEN N. et WILLIAMS M.R. (1985).

Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 10, 71-127.

CRAWSHAW W. M., MCDONALD N. R., DUNCAN G. (2005).

Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. Veterinary Record, v. 156, n. 25, p. 812-813.

CRISTÈLE SAS-NICOLAS. (2001).

Manifestations Cutanées des Cryptococcoses: a propos de quatre observations chez des patients séropositifs pour le VIH. .p33-36

CZERNOMYSY-FUROWICZ D., KARAKULSKA J. et SILECKA A. (2008).

Etiological agents of mastitis in dairy cows on a farm in the west pomeranian region. Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica 7 (1), 3–10.

D**DALE D. C. et TETON DATA SYSTEMS. (2007).**

Infectious Diseases: The Clinician's Guide to Diagnosis, Treatment and Prevention (17th ed.). New York: WebMD Corporation.

DE CASIA DOS SANTOS R., MARIN J.M.(2005).

Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. Mycopathologia, 159, 251-253.

DEEPA K., JEEVITHA T. et MEACHAEL A. (2015).

In vitro evolution of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. Journal of microbiology and antimicrobial.vol.7 (3).p28-32.

DUREL L., FAROULT B., LEPOUTRE D., BROUILLET P. et LE PAGE P. (2004).

Mammites des bovins (cliniques et subcliniques). Demarches diagnostiques et therapeutiques. Supplément technique, Dépêche Vétérinaire, 87, 42 p.

DWORECKA-KASZAK B., KRUTKIEWICZ A., SZOPA D., KLECZKOWSKI M. et BIEGANSKA M. (2012)

High Prevalence of *Candida* Yeast in Milk Samples from Cows Suffering from Mastitis in Poland. The Scientific World Journal, vol.10, Article ID 196347.

E**EBERHART R.J. (1986).**

Management of dry cows to reduce mastitis. Journal of Dairy Science, 69, 1721-1732.

EDENS H. A., PARKOS C. A., LIANG T. W., JESAITIS A. J., CUTLER J. E., et MIETTINEN H. M. (1999).

Non-serum-dependent chemotactic factors produced by *Candida albicans* stimulate chemotaxis by binding to the formyl peptide receptor on neutrophils and to an unknown receptor on macrophages. Infection and immunity 67:1063-1071

ELAD D., SHPIGEL N. Y., WINKLER M., KLINGER I., FUCHS V., SARAN A. et FAINGLOD D. (1995).

Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows.

Journal of American Veterinary Medical Association, v. 207, n. 5, p. 620-622,

EL-KIRAT-CHATEL S. (2010).

Développement d'outils cellulaires et moléculaires pour l'étude des interactions *Candida* – phagocytes ; Application à la caractérisation du gène OLE2 codant une désaturase chez *C. lusitaniae*.

Thèse de Doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux 2, p12.

EUZEBY J. (1994).

Mycologie médicale comparée, Les mycoses des animaux et leur relation avec les mycoses de l'homme.

Edition Vigot Frères, Tome 2, Lyon. 6-29

EZEKOWITZ R. A., WILLIAMS D. J., KOZIEL H., ARMSTRONG M. Y., WARNER A., RICHARDS F. F. et ROSE R.M. (1991).

Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor *Nature* 351:155-158

F

FAMEREE L., SWINNE-DESGAIN D. et COTTELEER C. (1970).

Mammites, antibiotiques, levures.

Annales de Medecine Veterinaire, 114 :389-409.

FARNSWORTH R. J. et SORENSEN D. K.(1972).

Prevalence and species distribution of yeasts in mammary glands of dairy cows in Minnesota. *Canadian Journal Comparative Medicine*, v. 36, n. 4, p. 329-332.

FINKELMAN F. D., SHEA-DONOHUE T., MORRIS S. C., GILDEA L., STRAIT R., MADDEN K. B., SCHOPF L. et URBAN J. F., JR.(2004).

Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites.

Immunological reviews 201:139-155.

FLEET G.H. (1990)

Yeasts in dairy products, A Review.

Journal of Applied Microbiology; 68:199-211.

FORTIER G. (1990).

Mammites Mycosiques des bovins, flore fongique du lait, pathogénie et moyen de lutte.

Thèse AlFort. P. 130.

G**GUERIN P. et GUERIN-FAUBLEE V. (2007)**

Les mammites de la vache laitière. Cours en ligne, Laboratoire Reproduction et Laboratoire Microbiologie et Immunologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon-France. P. 54-58.

GONZALEZ R.N. (1996)

Prototheca, yeast and Bacillus mastitis.

Proceedings of the National Mastitis Council (U.S.), Nashville, USA, pp. 82-92.

GUPTA P.R.K., KALRA D.S., VERMA P.C. et LODHA B.C. (1981).

Final Technical Report on studies on mycotic mastitis in domestic animals with particular reference to its incidence.

Pathology and diagnosis, HAU, Hissar.

H**HAYNES K. (2001).**

Virulence in *Candida* species.

Trends in Microbiology. 9, 591-596.

HEYDECK D., THOMAS L., SCHNURR K., TREBUS F., THIERFELDER W. E., IHLE J. N., et KUHN H.(1998).

Interleukin-4 and -13 induce upregulation of the murine macrophage 12/15- lipoxygenase activity: evidence for the involvement of transcription factor STAT6. Blood 92:2503-2510.

HUANG J. T., WELCH J. S., RICOTE M., BINDER C. J., WILLSON T. M., KELLY C., WITZTUM J. L., FUNK C. D., CONRAD D. et GLASS C. K.(1999).

Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase.

Nature 400:378-382.

J**JAND S.K. et DHILLON S.S. (1975).**

Mastitis caused by fungi.

Indian Veterinary Journal,52:125-128.

JENSEN H.E., MONTEIROS A.E. et CARRASCO L.(1996).

Caprine Mastitis due to Aspergillosis and Zygomycosis: a Pathological and Immunohistochemical Study.

Journal of Comparative Pathology. 114: 183-191.

K**KABHA K., NISSIMOV L., ATHAMNA A., KEISARI Y., PAROLIS H., PAROLIS L. A., GRUE R. M., SCHLEPPER-SCHAFFER J., EZEKOWITZ A. R., OHMAN D. E. et Al. (1995).**

Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*.

Infection and immunity 63:847-852.

KAUL D. et ANAND P. K. (2003).

Regulation of PPAR-gamma gene in human promyelocytic HL-60 cell line.

Leukemia research 27:683-686

KELLER B., SCHEIBEL P., BLECKMANN E. et HOEDEMAKER M. (2000).

Differentiation of yeast in mastitis milk. Mycoses, 43 n. 1, p. 17-19.

KIVARIA F.M. et NOORDHIZEN J.P.T.M.(2007).

A retrospective study of the aetiology and temporal distribution of bovine clinical mastitis in smallholder dairy herds in the Dar es Salaam region of Tanzania.

The Veterinary Journal,173, 617-622.

KOENIG H. (1995).

Guide de mycologie médicale.

Paris, Ellipses, 240-7.

KRUKOWSKI H.; LISOWSKI A.; ROZANSKI P. et SHORKA A. (2006).

Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in south eastern part of Poland.

Poland Journal Veterinary Science, v. 9, n. 3, p. 181-184.

KRUKOWSKI H., TIETZE M., MAJEWSK T. et ROZANSKI P. (2000).

Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in Lublin region, Poland.

Mycopathologia 150, 5-7.

KUO C.C. et CHANG C.H. (1993).

Isolation from mastitis milk of dairy cattle.

Journal of the Chinese Society of Veterinary Science.19: 221-227.

L

LAGANE C., 2007.

Role de l'IL-13 et des ligands de ppar- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-a-vis de *Candida albicans*. Implication de ppar- γ .

Thèse d'Université Toulouse III – Paul Sabatier .U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Santé.

LAGNEAU P.E., LEBTANI K. et SWINNE D. (1996).

Isolation of yeast from bovine milk in Belgium.

Mycopathologia. 1996:135:99–102.

LEBLANK S. J.; LISSEMORE K. D.; KELTON D. F.; DUFFIELD T. F. et LESLIE K. E. (2006).

Major advances in disease prevention in dairy cattle.
Journal of Dairy Sciences, v. 89, n. 4, p. 1267-1279.

LOFTSGARD G., LINDQUIST K. (1960).

Bovine mycotic mastitis.
Acta Veterinaria Scandinavica; 1: 201-220.

LOKEN H.I., THOMPSON E.S., HOYT H.H. et BALL R.A.(1959)

Infection of the bovine udder with *Candida tropicalis*.
American Journal of Veterinary Medicine ; 134: 401-403.

M

MAHIEU H. (1985).

A propos de la teneur des laits individuels et de mélange e, matières minérales et urée. Le lait., N 561-562, 55-112

MALINOWSKI E. et KLOSSOWSKA A. (2002).

Diagnostics of intramammary infections.
National Veterinary Research Institute Edition. Pulawy (Poland).

MC DONALD J. S., RICHARD J. L., ANDERSON A. J. et FICHTNER R. E. (1987).

In vitro antimycotic sensitivity of yeasts isolated from infected bovine mammary glands.
American Journal of Veterinary Research. 41.

MEUNIER D. (1999).

Infections mammaires à *S. aureus*, caractérisation et évaluation d'antigènes pour le diagnostic immunologique.
Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire de l'université de Tours.

MICHEL-NGUYEN A., FAVEL A. et REGLET P. (2002).

Identification des levures de laboratoire : comment allier performance et simplicité.
Feuillets de biologie .43 :41-52.

MIDDELHOVEN W.J., SCORZETTI G., FELL J.W. (2004).

Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species.
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54 (Pt 3): 975–986.

MISRA P.R. et PANDA S.N.(1986).

Some observation on the occurrence of mycotic mastitis in cows in Orissa.
Indian veterinary journal.63,886-888.

MONGA D.P., KALRA D.S. (1971).

Prevalence of mycotic mastitis among animals in Haryana.
Indian Journal of Animal Sciences, 41(9): 813-816.

MORETTI A., PASQUALI P., MENCARONI G., BONCIO L., PIERGILI-FIORETTI D. (1998.)

Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria).

Journal of Veterinary Medicine, Series B, v. 45, n. 3, p. 129-132.

MORGANTI L.E. et SANGUINITTI V. (1976).

Sopravivenza di cryptococcus neoformans in prodotti caseari.

Atti.Societa Italiana di Scienze veterinaire.29, 671-6772.

MOS E.M., BIRGEL E.H., ARAÚJO W.P., MENDES M.J. S. (1978).

Mamite bovina devida a levedura do gênero Candida.

Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 150: 161-164.

MURPHY J.M. et DRAKE C.H. (1947).

Infection of the bovine udder with yeast-like fungi.

American Journal of Veterinary Research 8,43-51.

N**NAGLIK J., ALBRECHT A., BADER O. et HUBE B. (2004).**

Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions.

Cellular Microbiology 6(10): 915-26.

NOIRETERRE P. (2006).

Suivis de comptages cellulaires et d'examens bacteriologiques lors de mammites cliniques chez la vache laitiere. Etude experimentale au centre d'elevage lucien bizet de poisy.

Thèse ENV - LYON .

NORIS M., CASIRAGHI F., TODESCHINI M., CRAVEDI P., CUGINI D., MONTEFERRANTE G.,AIELLO S., CASSIS L.,GOTTI E., GASPARI F., CATTANEO D., PERICO N., REMUZZI G.(2007).

Regulatory T cells and T cell depletion: role of immunosuppressive drugs.

Journal of the American Society of Nephrology. 18, 1007-1018.

O**ODDS F. C.(1988).**

Candida and Candidosis.

A Review and Bibliography (Second Edition).

OLIVER S.P et al.(1990).

Persistence of antibiotics in bovine mammary secretions following intramammary infusion at cessation of milking.

Preventive Veterinary Medicine. , 9, 301-311.

ÖZENÇ E., VURAL M. R., ŞEKER E. et UÇAR M. (2008)

An evaluation of subclinical mastitis during lactation in Anatolian buffaloes.

The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 32, 359-368.

P

PANKEY J.W.(1989).

Premilking udder hygiene.

The Journal of Dairy Science, 72, 1308-1312.

PENGOV A. (2002).

Prevalence of mycotic mastitis in cows.

Acta Veterinaria-Beograd 52, 133-136.

PENGOV A., ZDOVC I.(1998).

Diagnostic of bovine yeast adder infections.

2nd congress of Slovenian microbiologists, portoroz.

POUDEN W.D., AMBERSON J.M. et JAEGER R.F.(1952).

A severe mastitis problem associated with *cryptococcus neoformans* a large dairy herd.

American Journal of Veterinary Research.13,121.

PRAMAYON S. (2001).

Les candidoses systémiques en réanimation : difficultés diagnostiques et thérapeutiques, attitude consensuelle actuelle. Pharmaceutical sciences.

HAL Id: dumas-00784982.

Q

QUESADA M., CENIS J.(1995).

Use of Random Amplified Polymorphic DNA in the characterization of wine yeasts.

The American Journal of Enology and Viticulture . 46, 2,204-208.

R

RAINARD P. et POUTREL B. (1984).

Non-random distribution of udder infections among cows. Evaluation of some contributing factors.

Annales de Recherches Vétérinaires., 16, 119-127.

RANJAN R., SWARUP D., PATRA R. C. et NANDI D. (2006).

Bovine protothecal mastitis: a review. Perspectives in Agriculture, Veterinary Sciences, Nutrition and Natural Resources, v. 17, n. 1, p. 1-7.

RAVEH D., KRUSKAL B. A., FARLAND J. et EZEKOWITZ R. A. (1998).

Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. Journal of leukocyte biology 64:108-113.

REMY D. (2007).

Les mammites.

Cours de DCEV 3 de l'ENVA.

RICHARD J.L., MACDONALD J.S., FICHTNER R.E. et ANDERSON A.J. (1980).

Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle.

American Journal of Veterinary Research. 48: 1991-1994.

ROOSTITA R. et FLEET G.H. (1996).

Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition.

Int. J. Food Microbiol; 31: 205-219.

RUZ-PEREZ M., YOKOYA E., PASSARELLI D., CANTARINO S.C., BENITES N.R. et MELVILLE P.A. (2004).

Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira.; Arquivos do Instituto Biológico .71: 663-665.

S**SANTOS R. C. et MARIN J. M. (2005).**

Isolation of Candida spp. From mastitic bovine milk in Brazil.

Mycopathologia, v. 159, n. 2, p. 251-253.

SCHELL W. A. (2006).

Mycotic Agents of Human Disease.

In D. O. Fleming, & D. L. Hunt (Eds.), Biological Safety: principles and practices (4th ed., pp. 163-178). Washington, USA.

SCHREIBER S., PERKINS S. L., TEITELBAUM S. L., CHAPPEL J., STAHL P. D., ET BLUM J. S. (1993).

Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN-gamma.

The Journal of Immunology. 151:4973-4981.

SEKER E. (2010).

Identification of Candida species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in Western Turkey.

Mycopathologia 169, 303-308.

SEKER E. et ÖZENÇ E. (2011).

In vitro biofilm activity of Candida species.

The journal Veterinarski arhiv. 81 (6), 723-730.

SERGHIDES L. et KAIN K. C. (2001).

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF-alpha secretion by monocytes/macrophages.

The Journal of Immunology .166:6742-6748.

SERIEYS F. et al. (1985).

Conditions de logement et infections mammaires.

Recueil de Médecine Vétérinaire, 161 (6-7) : p 519-526.

SHAH N.M., DHOLAKIA P.M. et SIMARIA M.B. (1986).

In vitro drug sensitivity trails against yeasts and moulds isolated from bovine udder.
Indian Veterinary Journal, 63 (1): 5- 8.

SHARMA S.D., RAI P. et SAXENA S.C. (1977).

A survey of mycotic infection of udder in clinical and subclinical cases of mastitis in cows and buffaloes.
Indian Veterinary Journal, 54 (4): 284-287.

SHEA Y. R. (2007).

Algorithms for Detection and Identification of Fungi.

In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller & M. L. Landry (Eds.), Manual of Clinical Microbiology. (9th ed., pp. 1745-1761). Washington, USA.

SHENG F.C., FREISCHLAG J., BACKSTROM B., KELLY D. ET BUSUTTIL R.W.(1987).

The effects of in vivo antibiotics on neutrophil (PMN) activity in rabbits with peritonitis.
Journal of Surgical Research.43, 239–245

SIMARIA M.B. et DHOLAKIA P.M. (1986).

Incidence and diagnosis of mycotic mastitis in Cattle.
Indian Journal of Animal Science,56 (10): 995-1000.

SINGH P., SOOD N., GUPTA P. P., JAND S. K. et BANGA H. S. (1998).

Experimental candidal mastitis in goats: Clinical, haematological, biochemical and sequential pathological studies.
Mycopathologia 140, 89-97.

SLAVOLJUB STANOJEVIC et DEJAN KRNJAJIC (2011).

Yeast mastitis in cows. Faculty of Veterinary Medicine-Beograd, Yugoslavia.
Internet Journal of Food Safety V.1. 8-10.

SMITH B. P. (2008).

Mammary gland health and disorders.
Large animal internal medicine, fourth edition: 1112-1119.

SPANAMBERG A., SANCHES E.M.C., SANTURIO J. et FERREIRO L. (2009).

Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras.
Ciência Rural. 39: 282-290.

SPANAMBERG A., WUNDER JR E.A., PEREIRA D.I.B., ARGENTA J., SANCHES E.M.C., VALENTE P. et FERREIRO L. (2008)

Diversity of yeast from bovine mastitis in Southern Brazil.
Revista Iberoamericana de Micología.25, 154-156.

SPANAMBERG A, HARTFELDER CC, FUENTEFRIA AM, VALENTE P. (2004)

Diversity and enzyme production by yeasts isolated from raw milk in Southern Brazil.

Acta Scientiae Veterinariae.32: 195-199.

SUDARWANTO M. (1987).

Mycotic mastitis in dairy cows in the districts of Bogor, Sukabumi and Cianjur of West Java. *Penyakit Hewan*, 19 (34): 70-73.

SUKUMAR K. et JAMES P.C. (2012),

Incidence of fungal mastitis in cattle.

Tamil Nadu Journal of Veterinary and Animal Sciences.8 (6) 356 - 359, November - December, 2012.

SWINNE D., DEKA K.E. et ASSOGBA A. (1997)

Desmet P. Identification of yeasts from individual farm tank milk samples in Belgium. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr* ; 66: 129-130.

T

TONTONOZ P., NAGY L., ALVAREZ J. G., THOMAZY V. A. et EVANS R.M.(1998).

PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93:241-252.

TONTONOZ P., SPIEGELMAN B.M. et HU E. (1995).

Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor.

Current Opinion in Genetics & Development .5, 571-576.

TÜRKYILMAZ SÜHEYLA et KAYNARCA SEYHAN. (2010).

The Slime Production by Yeasts Isolated from Subclinical Mastitic Cows.

Acta Veterinaria Brno, 79: 581-586.

V

VANDAMME D.M. (1983).

Use of miconazole in treatment for bovine mastitis.

Veterinary medicine, small animal clinician, 1425.

VAN VEEN H.S. et KREMER W.D. (1992).

Mycotic mastitis in cows.

Tijds Diergenesk 117: 414-416.

VILLEGAS I., MARTIN A. R., TOMA W., et DE LA LASTRA C. A.(2004).

Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemiareperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *European journal of pharmacology* 505:195-203

W

WATSON D.L., 1992,

Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in dairy heifers.

Research in Veterinary Science; 53(3):346-53.

WATTS J. L. (1988).

Etiological agents of bovine mastitis.
Veterinary Microbiology. 16, 41-66.

WAWRON W., BOCHNIARZ M. et PIECH T. (2010).

Yeast mastitis in dairy cows in the middleeastern part of Poland.
Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 54, 201-204.

WOLOSZYN S., KRZYŻANOWSKI J. et ZIOŁO T. (1964).

Investigations of mastitis blastomycelica in cows.
Medycyna Weterynaryjna, 20, 332-342.

Y**YANG Y. (2003).**

Virulence factors of Candida species.
Journal of Microbiology, Immunology and Infection.36, 223-228.

Sites Web

(1) : (<http://www.arnobio2.com>) (Arnaud Delahaye) consulté le 20 /02/2012.

(2) : <http://www.medschool.lsuhsu.edu> (consulté le 20 /05/2012).

(3): <https://www.mikrobiologia-aordycz.blogspot.com> (consulté le 20 /05/2012).

(4): <https://www.Flabmed.ucsf.edu> (consulté le 25 /05/2012).

(5) : www.microbiologie_medicale.fr (VERON Brigitte) (consulté le 25 /05/2012).

(6) : <https://www.studyblue.com> (consulté le 26 /05/2012).

(7): <http://www.didier-pol.net/1IND-LEV.html> (consulté le 06/06/2012).

ANNEXES

Annexe I

Questionnaire

Questionnaire distribué aux vétérinaires praticiens :

En vous basant sur vos constatations sur le terrain, veuillez répondre aux questions suivantes :

Date de l'enquête :

Question 1:

Le mode d'élevage : extensif semi extensif intensif

Le type d'élevage : laitier viandeux mixte

La race des vaches élevées :

Le nombre d'animaux : - Male : jeunes adultes

- Femelles : jeunes adultes

La litière utilisée est faite de : sciure foin

autres :

La litière est changée chaque intervalle de :

Question 2:

Les cas de mammites que vous rencontrez sont :

Rares fréquents

Question 3:

Les mammites que vous rencontrez sont celles qui apparaissent :

*Chez les vaches de race :

Locale Holstein : 1. Pie rouge

2. Pie noire

Autres

races:

*Chez les fortes productrices chez les faibles productrices

*Chez les vaches : laitières allaitantes

*Chez les primipares

*Chez les vaches avec moins de 5 lactations

*Chez les vaches avec plus de 5 lactations

*En début de lactation

*En pic de lactation

En dehors de ces périodes

Autres précisions :

- *En hivers en printemps en été en automne
- *En stabulation libre entravés semi entravés

Question 4 :

Dans le cas où c'est la traite mécanique qui est utilisée :

- *La traite se fait dans la salle de traite : oui non
- *Le matériel de traite est désinfecté : oui non

Si oui, la désinfection se fait :

- 2 fois / jour 1 fois / jour 1 fois / semaine
- 1 fois / quinzaine 1 fois / mois 1 fois / semestre

*Quels sont les produits utilisés pour la désinfection :.....

.....

*Nombre de traites par jour pour chaque vache au moyen:.....

Question 5 :

Dans le cas où c'est la traite manuelle qui est utilisée :

- *Le trayeur désinfecte –il ses mains avant la traite ? Oui non
- *Le trayeur désinfecte-il ses mains après chaque vache ? Oui non
- *La mamelle est désinfectée avant chaque traite ? Oui non
- *Le chiffon utilisé pour le nettoyage de la mamelle :
- Un chiffon par vache Un chiffon pour toutes les vaches
- Le chiffon est-il désinfecté après chaque utilisation ? Oui non

Question 6 :

Les mammites fréquemment rencontrées sont :

Clinique : 1. Aigue 2. Chronique sub-clinique

*La clinique s'accompagne de :

Symptômes généraux

Les quels ?

.....

Symptômes locaux

Les quels ?

.....

Avez-vous rencontré le muguet chez les veaux allaitants ? Oui non

Question 7:

*Sur le terrain vous détectez les mammites en vous basant sur :

Les symptômes généraux : fièvre, inappétence, etc.

Les symptômes locaux

Diminution de la production

Modification du lait

Autres :

* Utilisez-vous les tests suivants pour le dépistage des mammites :

Papier PH

CMT

Autres:.....

Question 8 :

*Prescrivez - vous un traitement général ? Oui non

Le quel ?.....

* Prescrivez-vous un traitement local ? Oui non

Le quel ?.....

* Demandez-vous un antibiogramme systématiquement avant d'instaurer le traitement ? Oui non

*Parmi les vaches traitées, y a-t-il celles qui ont présentées une antibiorésistance

Oui non

*A quel antibiotique ?

.....

Y a-t-il des mammites qui persistent après traitement antibiotique ?

Oui non

*Y a-t-il des mammites fongiques qui apparaissent après :

Traitement antibiotique normal ? Oui non

Traitement antibiotique prolongé ? Oui non

Question 9 :

*Quelles sont les mesures hygiéniques que vous recommandez aux éleveurs ?

.....

.....

* Prescrivez-vous un traitement préventif ? Oui non

Le quel ?

.....

Annexe II

Technique du prélèvement de lait

La réalisation correcte du prélèvement est une nécessité, vu l'ubiquité des champignons pouvant fausser le diagnostic ; Nous avons veillé à ce que l'atmosphère environnant de la vache ne soit pas chargée de poussières (foins remués à proximité, animaux agités). Si tel était le cas, nous avons sortis les animaux du local empoussiéré.

Un « protocole de prélèvement » a été remis à nos confrères praticiens et aux éleveurs en vue d'entretenir l'opération avec soin. Le prélèvement de lait a été réalisé selon le protocole de **GUERIN et GUERIN-FAUBLEE V. (2007) (Fig. 3)**, comme suit :

- 1 - Se laver les mains avec un savon désinfectant.
- 2 - Identifier le flacon (à ouverture large) au feutre indélébile : numéro de la vache, quartier (AD, AG, PD ou PG), date et heure.
- 3 - Laver et essuyer soigneusement le trayon.
- 4 - Eliminer un ou 2 jets de lait afin de rincer le canal du trayon (pas plus de 2 jets si non risque de prélèvement très pauvre en germes).
- 5 - Désinfecter l'ostium du trayon avec une compresse imbibée d'alcool à 70°.
- 6 - Ouvrir le flacon (stérile) en maintenant l'ouverture dirigée vers le bas. Le bouchon étant tenu dans la même main sans toucher l'intérieur.
- 7 - Prélever quelques millilitres de lait et reboucher le flacon.
- 9 - Les prélèvements de lait sont acheminés dans une glacière (+4°C).

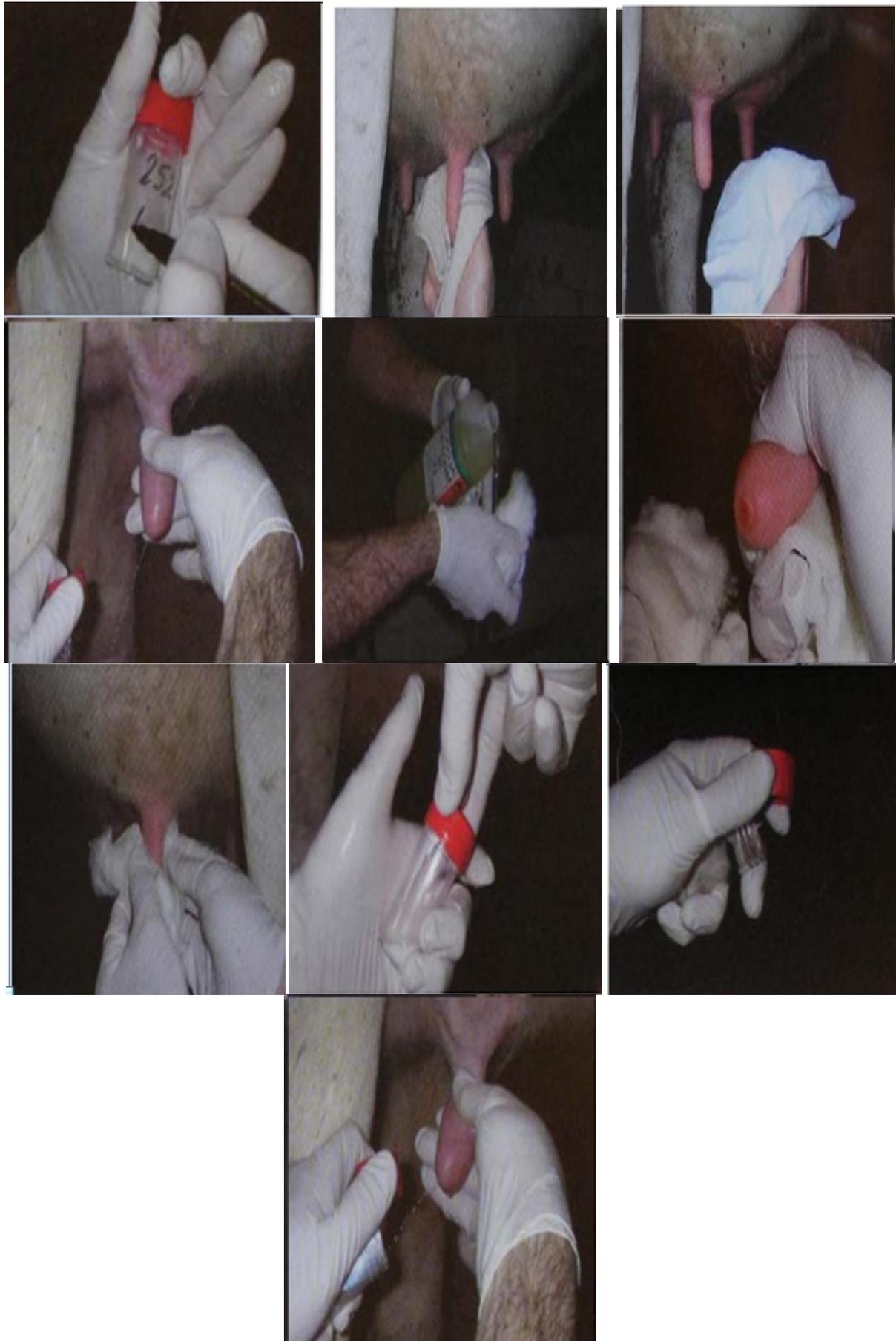


Figure n°36 : Technique de prélèvement du lait (original, 2012).

Annexe III

MATERIELS UTILISES POUR LE PRELEVEMENT DU LAIT

- Lavette avec un récipient.
- Solution désinfectante (eau de javel diluée à 10%).
- Papier absorbant pour essuyage.
- Coton.
- Flacons stériles sous vide de 10 ml.
- Ecouillons stériles.
- Récipient stérile.
- Etiquettes pour chaque prélèvement.
- Sachets accumulateurs de froid.
- Glacière isotherme.

MATERIELS ET PRODUITS CHIMIQUES UTILISES DANS LE LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE DE L'E.N.S.V. - ALGER.**1. Matériel multi usage**

- Réfrigérateur.
- Autoclave.
- Portoirs pour tubes.
- Anse de platine.
- Etuves (27°C - 37°C)
- Microscope photonique.
- Bec bunsen.
- Agitateur.
- Appareil photo numérique.

2. Matériel à usage unique

- Boites de pétri stériles
- Pipettes pasteur
- Tubes à essais stériles
- Lames
- Lamelles
- Gants d'examen

3. Colorant

- Bleu lacto-phénol

4. Milieux de culture**4.1. Milieux solides**

- Sabouraud Chloramphénicol (0.5g/l).
- Sabouraud Actidione.
- Rice Cream.

4.2. Milieux liquides

- Milieu Urée – Indole.
- Sérum (bovin).

5. Réactifs

- Potasse à 30%.

6. Tests

A- Le test C.M.T. (LEUCOCYTEST - Synbiotics Europe-France).

B- Test APT 20C AUX (Bio Mérieux, France) :

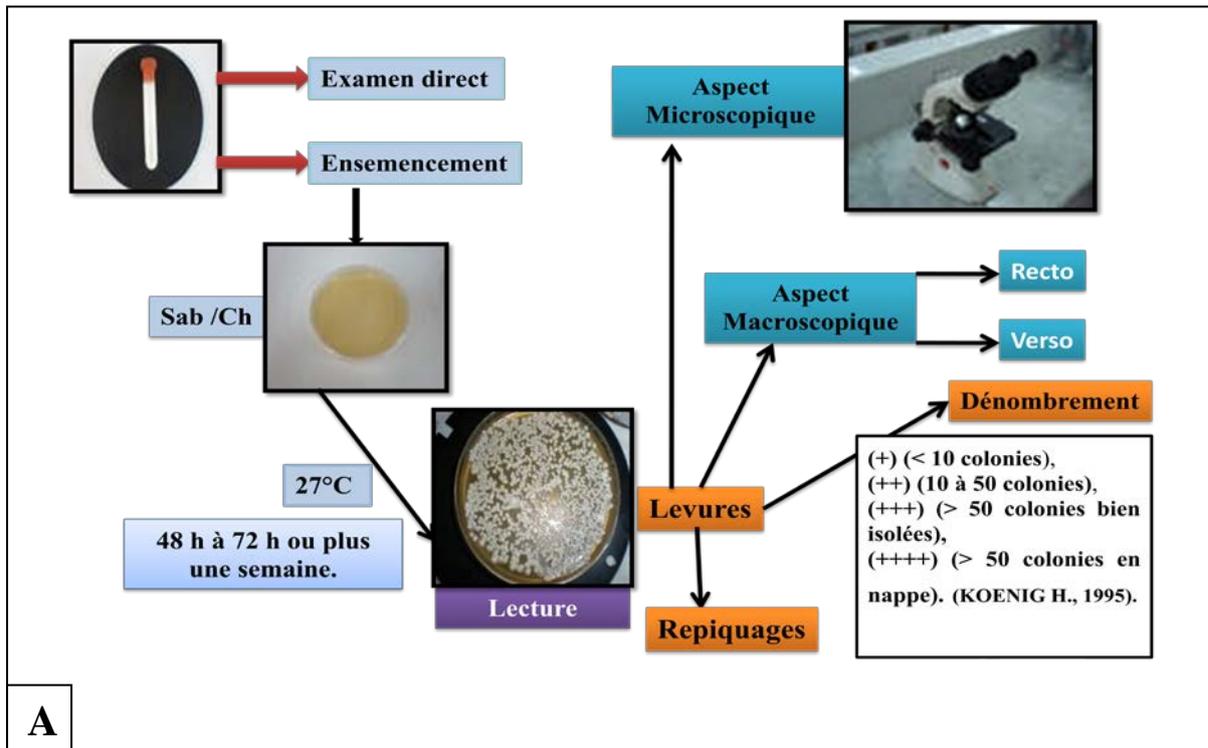
Tableau n°12 : Le milieu du Test APT 20C AUX (Bio Mérieux, France)

API C Medium 7 ml	Sulfate d'ammonium 5 g Phosphate monopotassique 0,31 g Phosphate dipotassique 0,45 g Phosphate disodique 0,92 g Chlorure de sodium 0,1 g Chlorure de calcium 0,05 g Sulfate de magnésium 0,2 g L-Histidine 0,005 g L-Tryptophane 0,02 g L-Méthionine 0,02 g Agent gélifiant 0,5 g Solution de vitamines 1 ml Solution d'oligo-éléments 10 ml Eau déminéralisée qsp 1000 ml pH final : 6,4-6,8 (à 20-25°C)
-------------------	---

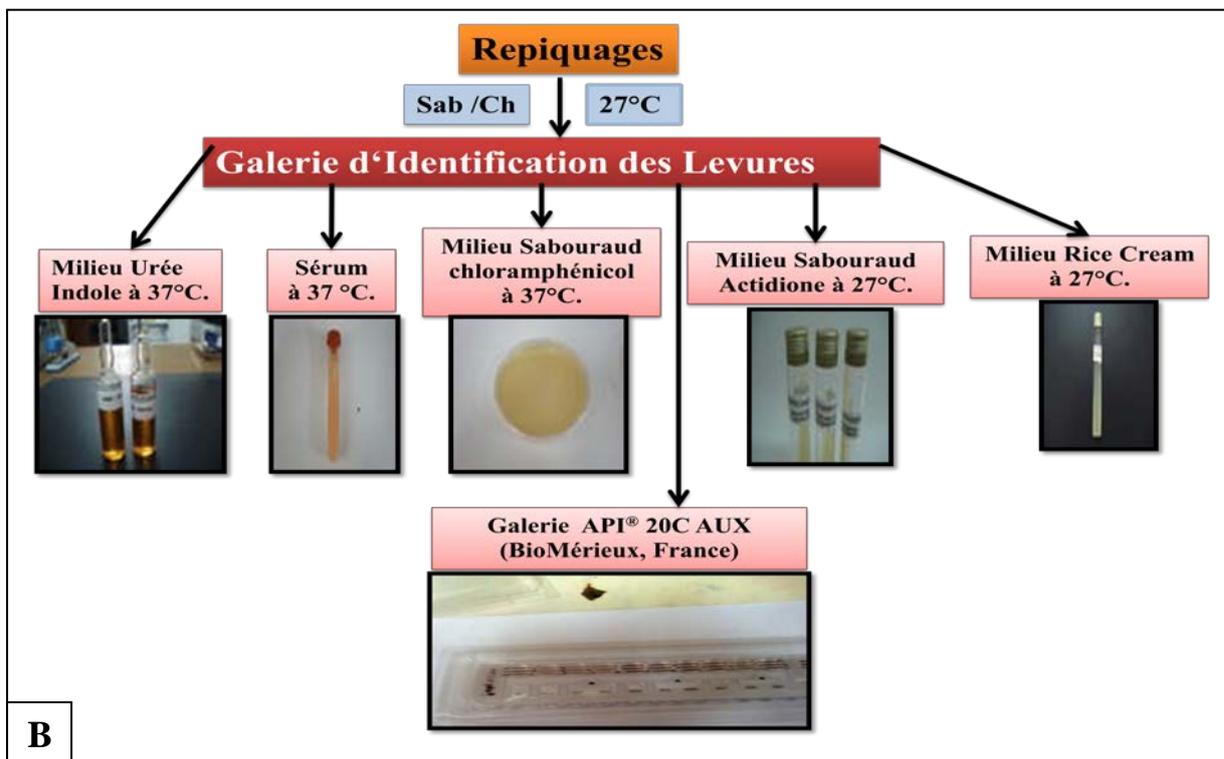
McFarland : standard de turbidité pour préparer les suspensions de microorganismes.

Annexe IV

Protocole de suivi pour le diagnostic mycologique



A



B

Figure n°37 : Protocole de suivi pour le diagnostic mycologique (photos A, B) (Original ,2013).

Annexe V

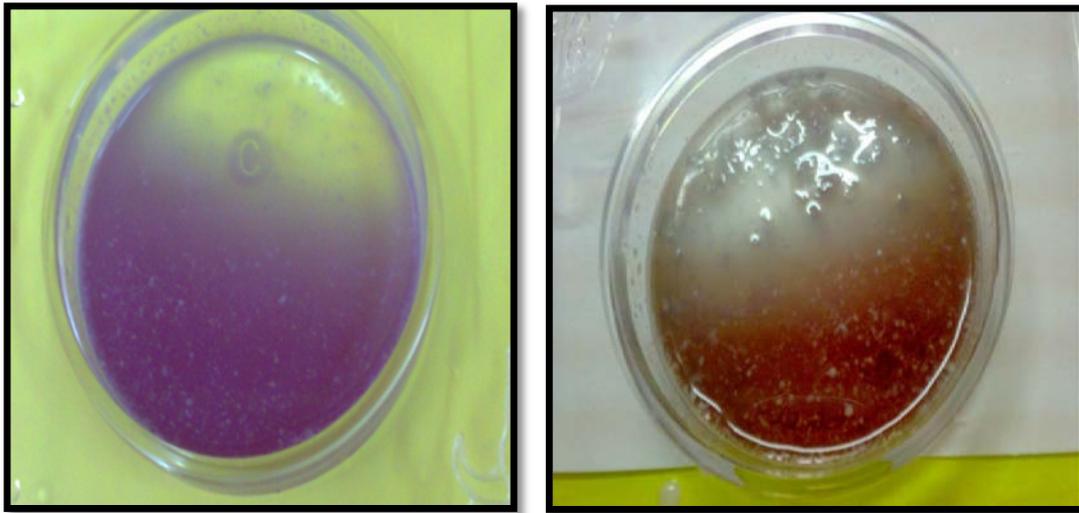
Tableau n° 14: tableau d'identification des levures de la galerie API 20 AUX V4

TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / QUADRO DE IDENTIFICACAO / ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ / IDENTIFIERINGSTABELL / IDENTIFIKATIONSTABELL / TABELA IDENTYFIKACJI

% de réactions positives après 48-72 h (± 6 h) à 29°C ± 2°C / % of reactions positive after 48-72 hrs. (± 6 hrs) at 29°C ± 2°C / % der positiven Reaktionen nach 48-72 Std. (± 6 Std) bei 29°C ± 2°C / % de las reacciones positivas después de 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C / % di reazioni positive dopo 48-72 ore (± 6 ore) a 29°C ± 2°C / % das reacções positivas após 48-72 H (± 6 H) a 29°C ± 2°C / % θετικών αντιδράσεων μετά από 48-72 ώρες (± 6 ώρες) στους 29°C ± 2°C / % positiva reaktioner efter 48-72 h. (± 6 h) vid 29°C ± 2°C / % af positive reaktioner efter 48-72 timer ved 29°C ± 2°C / % pozytywnych reakcji po 48-72 godzinach (± 6 godzin) w 29°C ± 2°C

API 20 C AUX V4.0	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	HYPH	
<i>Candida albicans 1</i>	0	100	14	99	2	88	94	90	99	0	94	85	99	0	0	99	97	97	5	1	0	99
<i>Candida albicans 2</i>	0	100	1	99	1	90	1	75	99	0	70	1	99	0	0	90	1	1	1	0	0	100
<i>Candida boidinii</i>	0	100	55	1	0	89	70	89	25	0	95	1	55	0	0	3	99	60	0	96	25	
<i>Candida colliculosa</i>	0	100	96	100	0	0	0	5	13	0	60	1	0	0	0	100	60	1	0	0	99	
<i>Candida dubliniensis</i>	0	100	96	99	0	1	99	50	100	1	99	0	40	0	0	100	100	96	78	75	1	
<i>Candida famata</i>	0	100	96	98	60	60	98	75	99	0	100	99	99	89	70	100	100	96	78	75	1	
<i>Candida glabrata</i>	0	100	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	1	
<i>Candida guilliermondii</i>	0	100	99	97	79	85	97	92	99	0	97	88	99	95	0	94	100	99	90	95	46	
<i>Candida kefyr</i>	0	100	27	0	1	18	1	25	100	0	34	0	0	1	95	1	100	1	1	96	75	
<i>Candida krusei/inconspicua</i>	0	99	73	0	0	0	0	0	6	0	2	0	64	0	0	0	0	0	0	0	0	79
<i>Candida lusitanae</i>	0	100	90	95	1	65	95	20	30	0	99	60	95	80	0	100	99	100	99	0	75	
<i>Candida magnoliae</i>	0	100	32	50	0	0	0	0	10	0	68	0	0	0	0	2	97	10	1	75	1	
<i>Candida norvegensis</i>	0	100	85	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	93
<i>Candida parapsilosis</i>	0	100	94	88	89	89	93	3	99	0	99	89	99	0	0	100	100	93	99	1	99	
<i>Candida pelliculosa</i>	0	100	99	0	0	67	1	1	56	0	70	95	1	70	0	97	99	87	96	30	70	
<i>Candida rugosa</i>	0	100	74	0	1	70	1	26	99	0	94	0	59	0	35	1	95	100	99	29	76	99
<i>Candida sphaerica 1</i>	0	100	31	2	0	2	0	62	99	0	99	68	0	31	99	80	100	53	80	64	1	
<i>Candida sphaerica 2</i>	0	100	88	1	0	1	0	36	94	0	99	50	0	31	99	80	100	53	80	64	1	
<i>Candida tropicalis</i>	0	100	9	99	1	96	99	12	99	0	99	69	99	17	1	99	73	100	72	5	99	
<i>Candida utilis</i>	0	100	99	0	0	60	0	1	5	0	1	3	0	37	0	98	96	16	72	79	69	
<i>Candida zeylanoides</i>	0	100	100	87	0	0	1	0	1	0	99	0	99	0	0	0	0	74	0	0	75	
<i>Cryptococcus albidus</i>	0	100	0	98	80	81	0	0	6	30	60	65	0	99	10	98	100	82	81	51	1	
<i>Cryptococcus humicola</i>	0	100	82	100	100	100	36	64	100	100	95	100	100	98	100	100	99	99	95	99	99	
<i>Cryptococcus laurentii</i>	0	100	6	92	99	99	69	76	99	84	53	76	92	96	99	92	99	92	96	99	25	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	100	0	100	14	91	71	1	93	97	100	99	88	10	0	99	99	75	97	88	25	
<i>Cryptococcus terreus</i>	0	100	0	100	87	100	0	0	45	50	99	0	96	96	36	0	0	54	0	0	1	
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	0	100	3	99	99	99	3	0	1	99	50	99	100	0	0	100	100	75	100	7	25	
<i>Geotrichum capitatum</i>	0	95	92	0	0	0	0	0	25	0	10	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Geotrichum klebahnii</i>	0	100	100	0	0	92	0	0	75	0	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	
<i>Kloeckera spp</i>	0	100	0	50	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0	100	99	96	0	0	66	0	84	0	93	98	99	56	0	99	99	93	0	80	84	
<i>Pichia angusta</i>	0	100	84	0	1	1	66	36	0	0	90	1	1	20	0	94	90	46	97	0	2	
<i>Prototheca wickerhamii</i>	0	100	100	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	1	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	100	15	91	0	0	8	0	50	0	84	3	0	1	0	91	100	59	84	96	1	
<i>Rhodotorula minuta</i>	0	100	100	100	98	95	3	0	0	0	5	0	85	60	1	0	95	95	95	0	1	
<i>Rhodotorula mucilaginosa 1</i>	0	100	5	4	15	33	92	61	10	0	5	0	0	0	0	33	100	5	1	87	25	
<i>Rhodotorula mucilaginosa 2</i>	0	100	60	1	80	80	64	52	80	0	60	1	0	1	0	98	100	95	86	98	25	
<i>Saccharomyces cerevisiae 1</i>	0	100	8	0	0	0	0	0	78	0	1	13	0	0	0	75	90	2	1	62	30	
<i>Saccharomyces cerevisiae 2</i>	0	100	1	0	0	0	0	0	99	0	1	29	0	0	0	99	99	99	85	81	25	
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	0	100	1	0	0	0	0	0	5	0	80	0	0	0	0	0	100	85	0	70	90	
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	0	100	80	80	100	100	71	60	100	100	43	0	99	60	0	99	100	99	0	99	100	
<i>Trichosporon asahii</i>	0	100	20	100	100	100	0	5	100	0	1	94	100	100	100	100	98	66	20	0	95	
<i>Trichosporon inkin</i>	0	100	4	100	0	98	0	0	95	98	0	100	57	100	95	100	100	95	89	0	95	
<i>Trichosporon mucoides</i>	0	100	40	99	74	100	53	65	100	92	78	100	94	100	100	100	100	100	78	82	99	95

Annexe VI

Photos originales (Akdouche L.2014)**Figure n°38** : test CMT positif. (Akdouche L., 2014)**Figure n°39** : préparation des lames pour l'examen direct. (Akdouche L., 2014)**Figure n°40** : la lecture des résultats de l'analyse mycologique (Akdouche L., 2014)

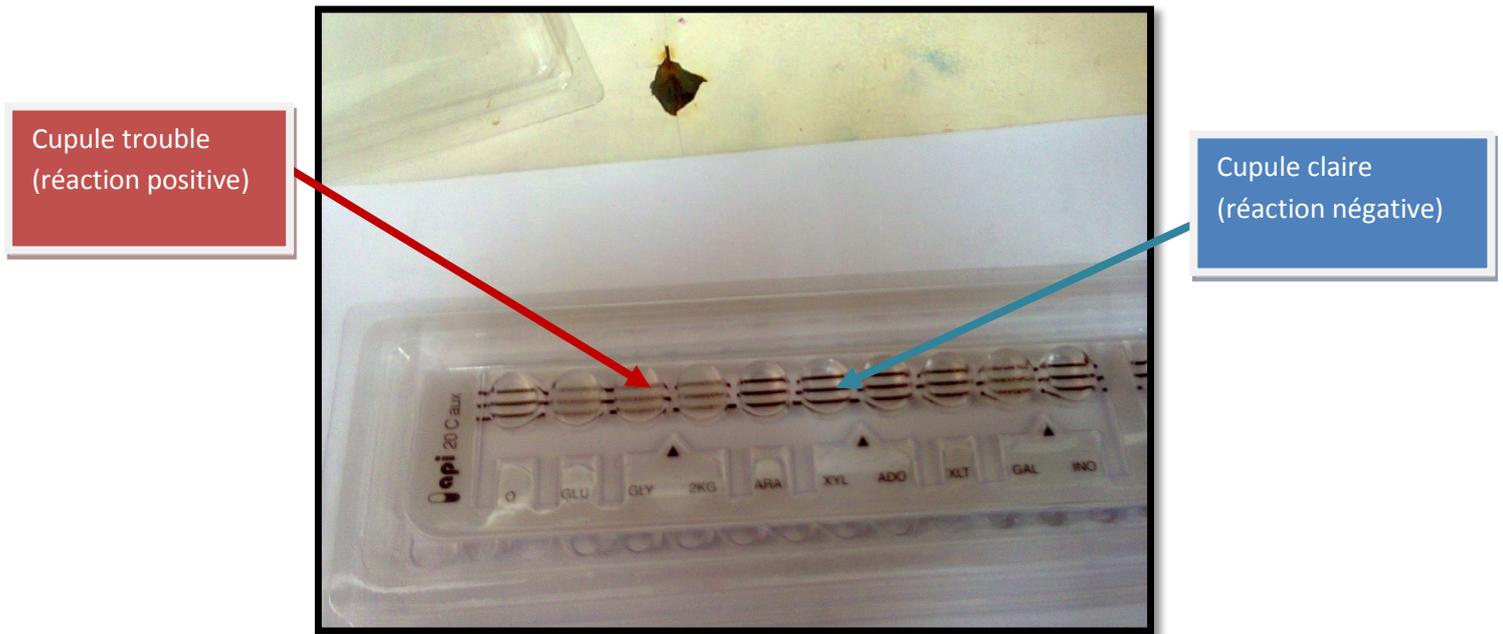


Figure n°41 : galerie API®20C AUX (Akdouche L., 2014)

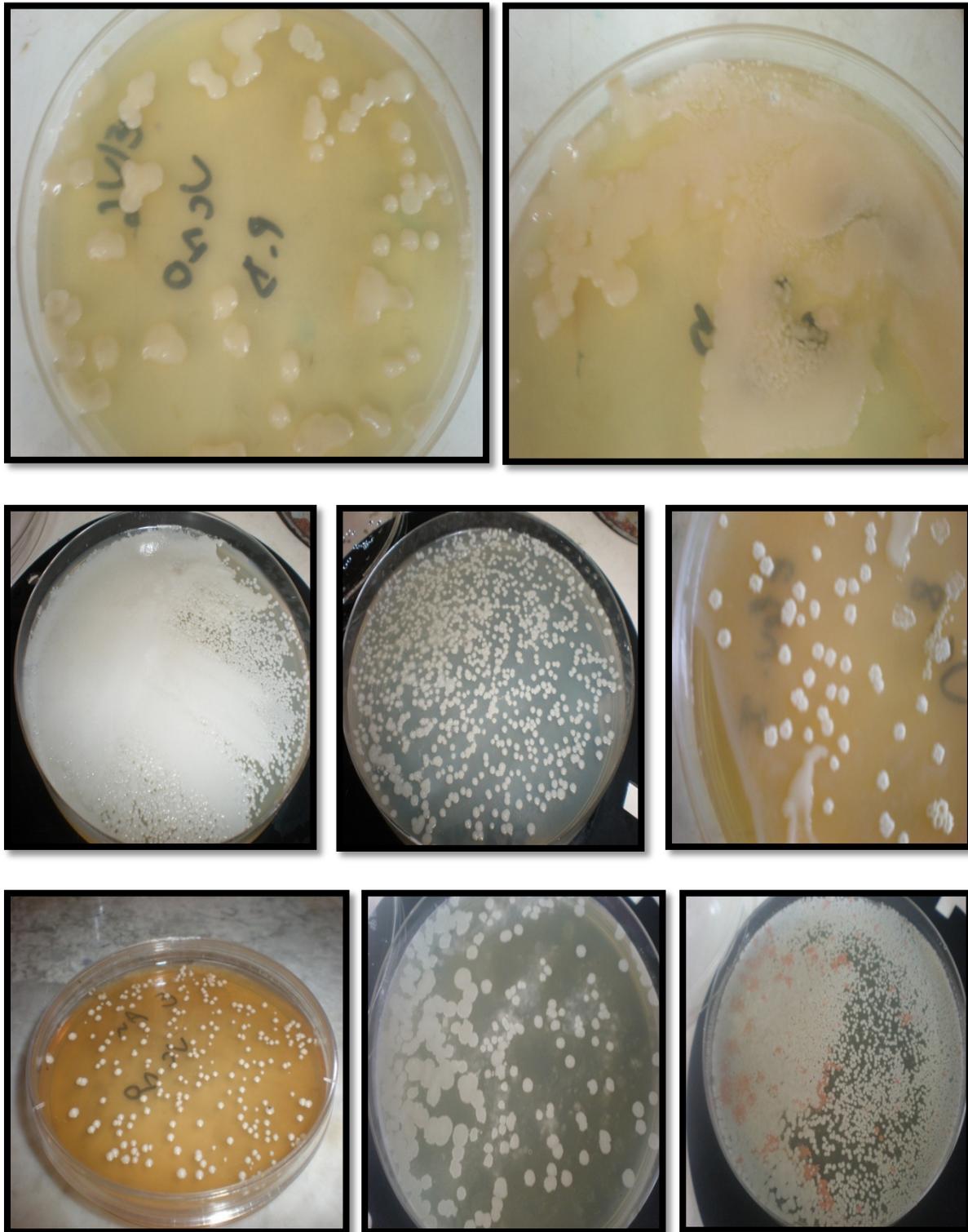


Figure n°42 : isolement des levures sur milieu sabouraud additionné de chloramphénicol.
(Akdouche L., 2014)

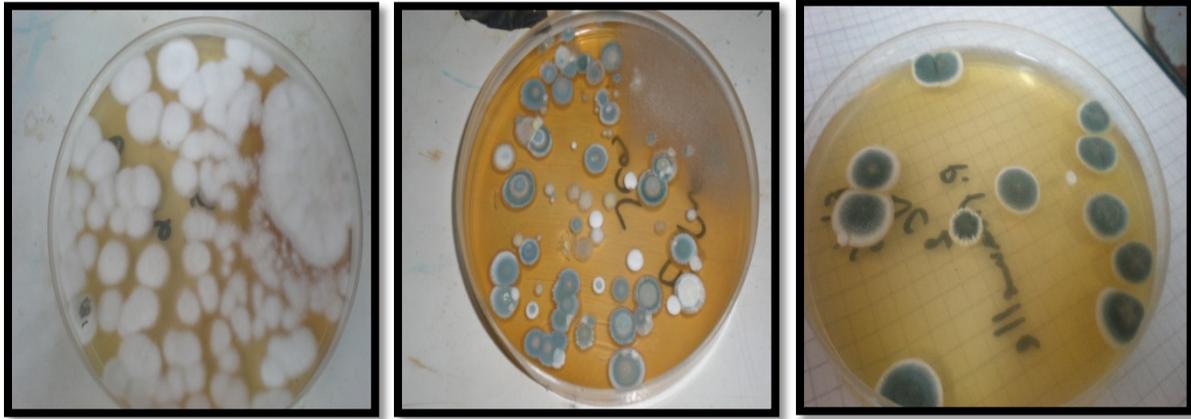


Figure n°43 : isolement des champignons filamenteux sur milieu sabauraud additionné de chloramphénicol (Akdouche L., 2014)



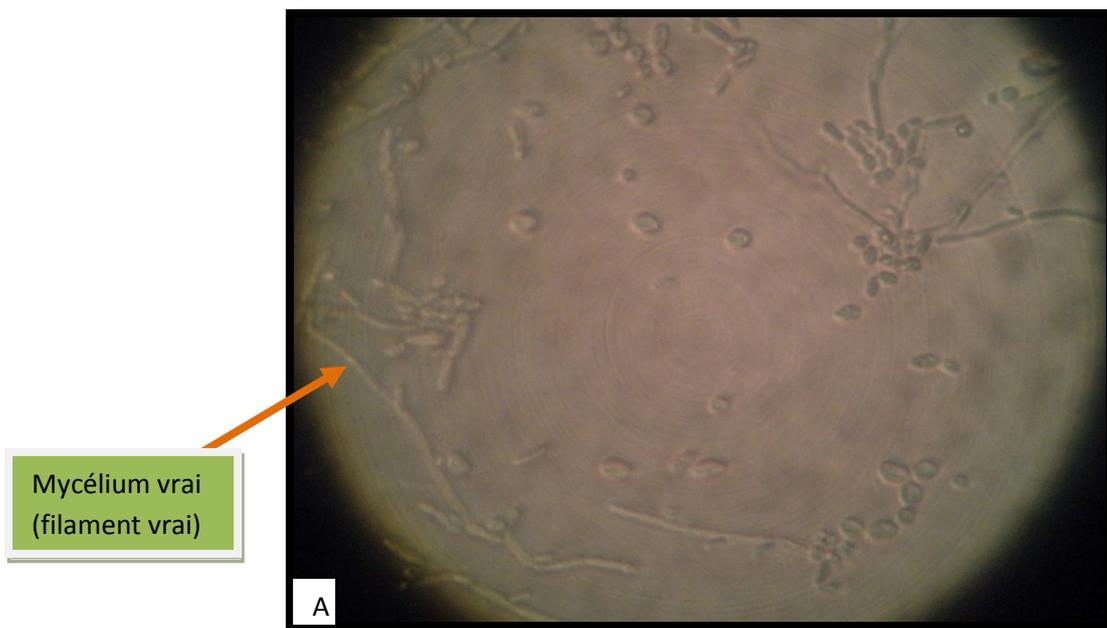
Figure n° 44: Repiquage des levures sur milieu sabauraud additionné de chloramphénicol pour identification ultérieure (Akdouche L., 2014)

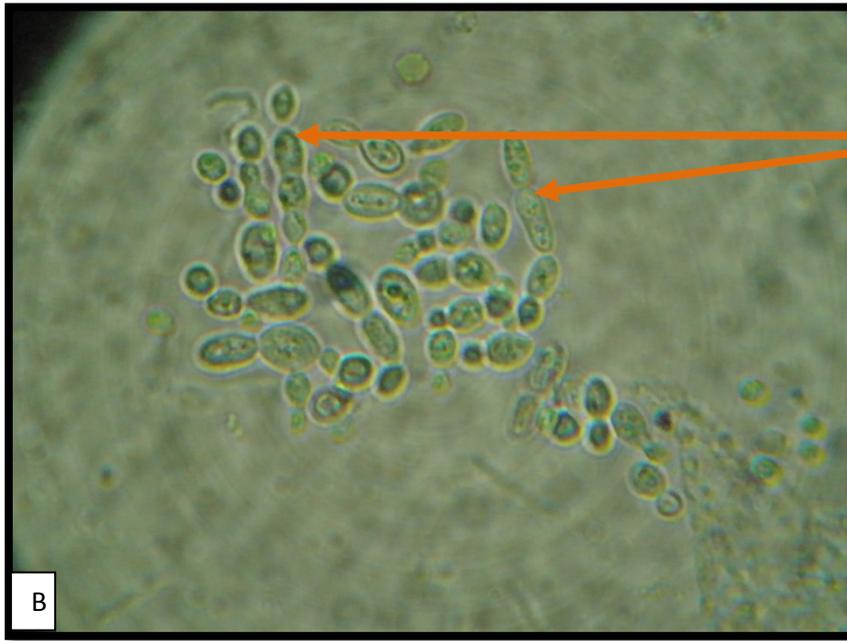


Figure n°45 : réalisation du test de blastèse (test de germination) (Akdouche L., 2014)

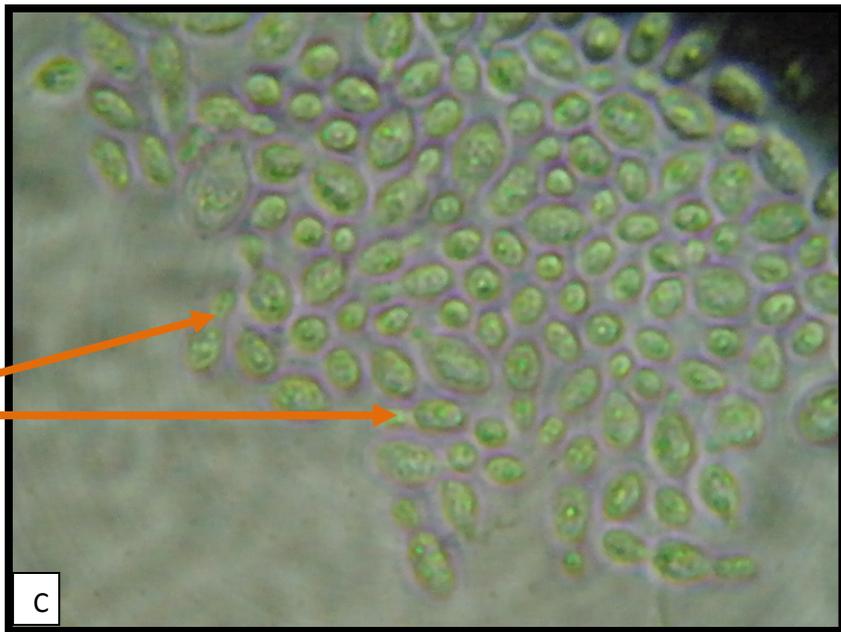


Figure n°46 : Test Sabauraud actidione positif. (Akdouche L., 2014)

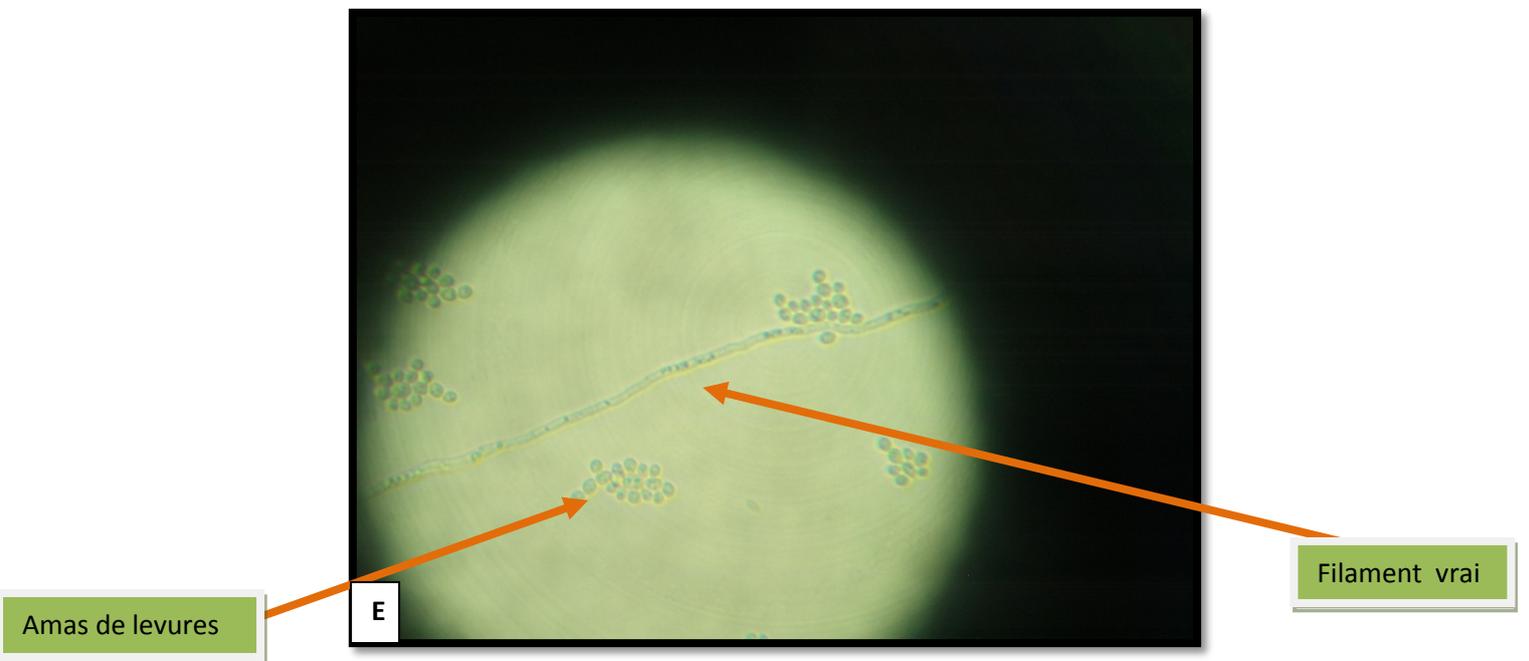
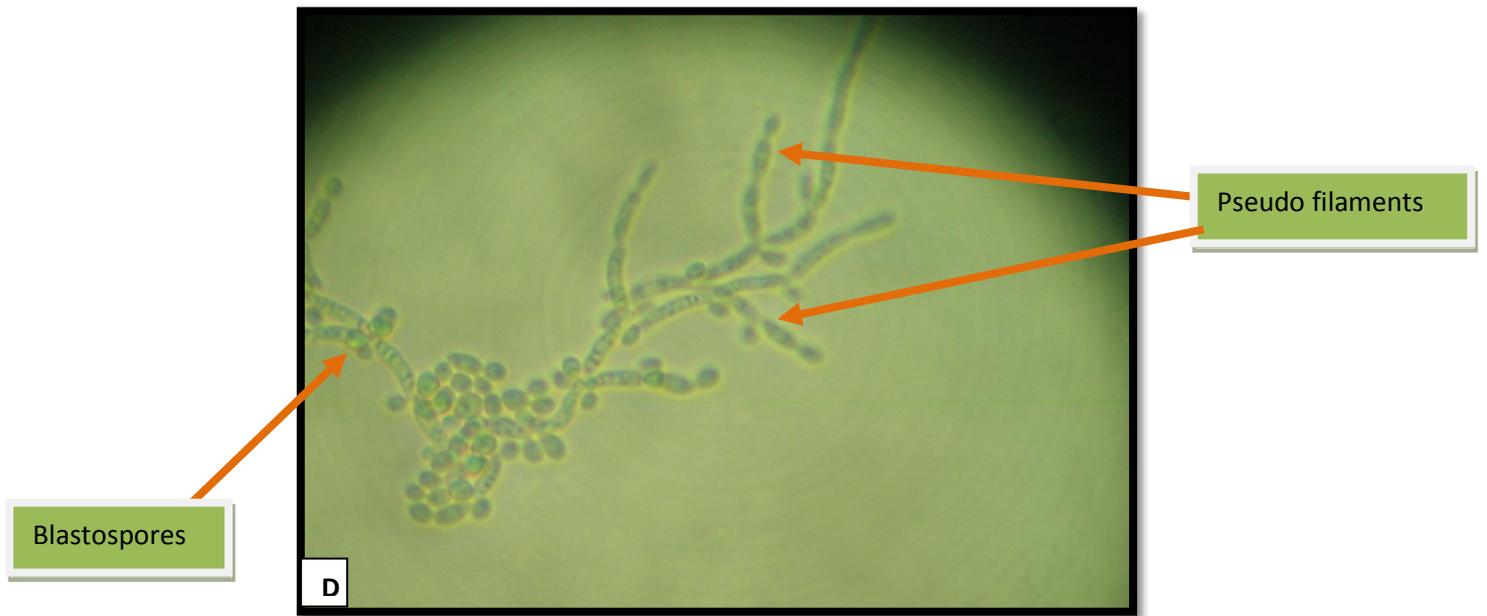




Pseudo filaments

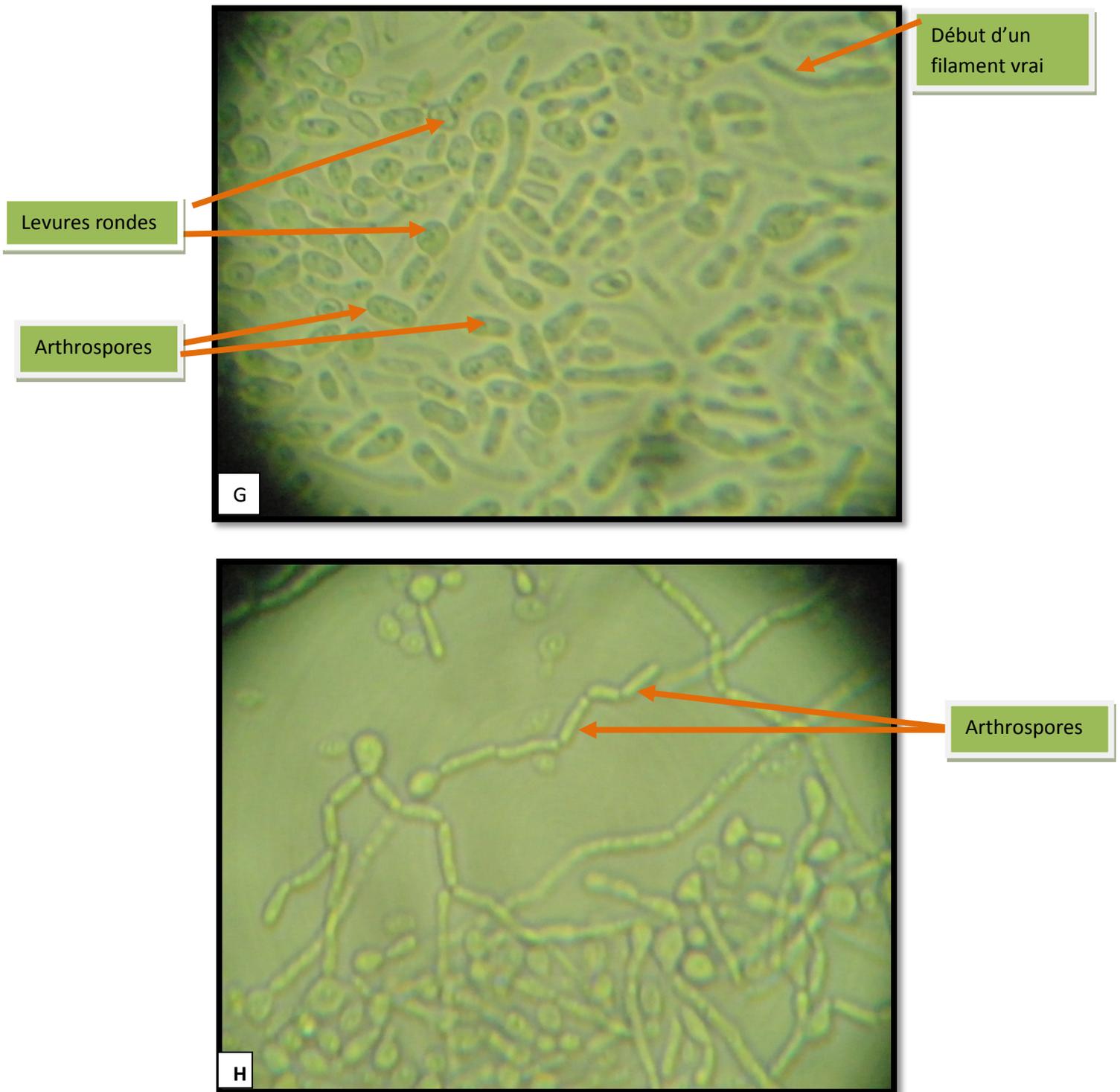


Levures
bourgeonnantes





Levures rondes
globuleuses



Figures n°47: Levures, filaments, pseudofilaments et arthrospores vues au microscope optique. (Gr. x400)(Photos : A, B, C, D, E, F, G, H.)(Akdouche L., 2014)

Annexe VII

Tableaux et résultats du questionnaire

Sur les 50 questionnaires distribués, nous avons eu les résultats suivants :

Tableau n °15 : le mode d'élevage dans la région étudiée.

mode d'élevage	nombre d'élevage	%
extensif	8	15,78%
semi extensif	24	47,36%
intensif	5	10,52%
aucune réponse	13	26,31%

Tableau n °16 : le type de stabulation dans la région étudiée.

le type de stabulation	nombre d'élevage	%
stabulation libre	3	7,40%
stabulation entravée	17	33,33%
stabulation semientravée	28	55,55%
Questionnaires sans réponse	2	3,70%

Tableau n °17 : intervalle du changement de la litière.

le type de stabulation	nombre d'élevage	%
une journée	8	16,00%
02 jours	13	25,00%
03jours	5	10,00%
05jours	7	15,00%
07jours	10	20,00%
aucune réponse	7	15,00%

Tableau n °18 : la nature de la litière.

La nature de la litière	nombre d'élevage	%
paille	42	83,33%
sciure de bois	5	11,11%
pas de litière	3	5,55%

Tableau n °19: la fréquence des mammites cliniques dans la région de Sidi lahcène.

la fréquence des mammites cliniques dans la région de Sidi Lahcène	nombre d'élevage	%
rare	14	27,77%
fréquente	36	72,22%

Tableau n°20 : la fréquence des mammites selon les saisons.

les saisons	nombre d'élevage	%
En hiver	17	33,33%
En printemps	6	12,50%
En été	9	17%
En automne	8	16,66%
Apparition de la mammité durant les 04 saisons	10	20,83%

Tableau n°21 : la fréquence des mammites selon le taux de production du lait.

taux de production du lait	nombre d'élevage	%
vaches fortes productrices	37	72,22%
vaches faibles productrices	7	12,5%
Questionnaires sans réponse	6	11,11%

Tableau n°22 : la fréquence des mammites selon le nombre de lactations.

nombre de lactations	nombre d'élevage	%
plus de 05 lactations	14	27,77%
moins de 05 lactations	19	38,88%
Questionnaires sans réponse	17	33,33%

Tableau n°23 : la fréquence des mammites selon le stade de lactation.

le stade de lactation	nombre d'élevage	%
En début de lactation	24	48,14%
En pic de lactation	18	37,03%
En dehors de ces périodes	4	7,40%
Questionnaires sans réponse	4	7,40%

Tableau n°24 : La fréquence de la désinfection du matériel de traite.

La fréquence de la désinfection du matériel de traite	nombre d'élevage	%
2fois /jour	6	11,11%
1fois /jour	3	5,55%
1 fois /semaine	19	38,88%
absence de désinfection	11	22,22%
Questionnaires sans réponse	11	22,22%

Tableau n°25: la fréquence de la désinfection des mains du trayeur.

la fréquence de la désinfection des mains du trayeur.	nombre d'élevage	%
Mains désinfectées	31	61,11%
Mains non désinfectées	19	38,88%

Tableau n°26 : la fréquence de la désinfection des mains du trayeur après chaque vache.

la fréquence de la désinfection des mains du trayeur après chaque traite	nombre d'élevage	%
oui	11	22,22%
non	39	77,77%

Tableau n°27: la fréquence de la désinfection de la mamelle avant chaque traite

la fréquence de la désinfection de la mamelle avant chaque traite.	nombre d'élevage	%
oui	31	61,11%
non	19	38,88%

Tableau n°28: chiffon utilisé pour le nettoyage de la mamelle.

Chiffon utilisé pour le nettoyage de la mamelle	nombre d'élevage	%
individuel	3	5,55%
collectif	31	63%
Questionnaires sans réponse	16	32%

Tableau n°29 : la fréquence de la désinfection du chiffon après chaque utilisation.

Désinfection du chiffon après chaque utilisation.	nombre d'élevage	%
oui	11	22,22%
non	22	44,44%
Questionnaires sans réponse	17	33,33%

Tableau n°30: le type de mammites rencontrées.

Le type de mammites rencontrées.	nombre d'élevage	%
clinique :aigue	33	66,66%
clinique : chronique	11	22,22%
subclinique	6	11,11%

Tableau n°31 : la persistance des mammites après traitement antibiotique

La persistance des mammites après traitement antibiotique	nombre d'élevage	%
oui	33	66,67
non	17	33,33

Tableau n°32 : la fréquence de l'apparition de mammites mycosiques après traitement antibiotiques prolongé.

La fréquence de l'apparition de mammites mycosiques après traitement antibiotiques prolongé	nombre d'élevage	%
Oui	14	27,78
Non	22	44,44
Questionnaires sans réponse	14	27,78

Tableau n°33 : Apparition du muguet chez les veaux allaitants

Apparition du muguet chez les veaux allaitants.	nombre d'élevage	%
oui	6	11,11%
non	25	50%
Questionnaires sans réponse	19	38,89%

Tableau n°34 : la fréquence d'utilisation de tests pour le dépistage des mammites subcliniques.

La fréquence d'utilisation de tests pour le dépistage des mammites subcliniques.	nombre d'élevage	%
papier PH	19	38,89%
CMT	6	11,11%
Questionnaires sans réponse	25	50%

Annexe VIII

Tableau n°35 : Les espèces de levures isolées dans le lait et dans d'autres échantillons analysés.

Levures isolées dans le lait	Identification du lait dans le quel la levure a été isolée	autres échantillons analysés dans les quels la même levure a été isolée	Remarques
<i>Candida tropicalis</i>	Lait prélevé de 03 trayons de la vache n°3 de l'élevage n°8: AD ; AG et PG.	L'eau de l'abreuvoir	Les levures isolées de l'eau de l'abreuvoir ne sont pas impliquées dans les cas de mammites fongiques car on se basant sur notre enquête, les éleveurs ne lavent pas les mamelles à partir de cette eau mais ils utilisent directement l'eau du robinet.
<i>Candida rugosa</i>	Lait prélevé des trayons des vaches de l'élevage n°9: - PG de la vache n°3 ; - PG de la vache n°2 ; - AD de la vache n°1.		
<i>Cryptococcus humicola</i>	Lait prélevé du trayon AD de la vache n°1 dans l'élevage n°4.		
<i>Candida zeylanoides</i>	Lait prélevé des trayons des vaches de l'élevage n°6: - AD de la vache n°7 - AD de la vache n°6 -PG de la vache n°2 -PG de la vache n°2	Ecouvillons des mains des trayeurs	Les levures isolées des écouvillons des mains des trayeurs peuvent contaminer les mamelles directement.
<i>Candida guilliermondii</i>	Lait prélevé des trayons des vaches de l'élevage n°12: - AD de la vache n°2 - PG de la vache n°1 .	Ecouvillons du seau et de la citerne	Diverses études signalent la présence et l'isolement des levures dans les réservoirs de stockage de lait (RUZ-PEREZ et al., 2004 ; SPANAMBERG et al., 2004),

Annexe IX

Tableau n°36 : La comparaison des résultats de la présente étude avec d'autres études menées dans d'autres pays.

Les levures isolées dans la présente étude et leur %.	Les levures isolées dans l'étude menée en inde par SUKUMAR K. et al., (2012) et leur %.	Les levures isolées dans l'étude menée en Turquie par TÜRKYILMAZ S. et al., (2010) et leur %.	Les levures isolées dans l'étude menée en Pologne par WAWRON W. et al., (2010) et leur %.	Les levures isolées dans l'étude menée en Slovénie par PENGOV A., (2002)
<i>C. tropicalis</i> (11,36%)	<i>C. tropicalis</i> .(26,92%)		<i>C. tropicalis</i> (1,33%)	<i>C. tropicalis</i> (10%)
<i>C. parapsilosis</i> (0,57%)	<i>C. parapsilosis</i> (7,69%)			
<i>C. guilliermondii</i> (12,5%)	<i>C. guilliermondii</i> (3,84%)	<i>C. guilliermondii</i> (7.3%),		<i>C. guilliermondii</i> (06%)
<i>C. famata</i> (1,7%)		<i>C. famata</i> (4,9 %)	<i>C. famata</i> (4,67%)	
<i>C. rugosa</i> (6,25%)		<i>C. rugosa</i> (2,4%)	<i>C. rugosa</i> (2,67%)	<i>C. rugosa</i> (11%)
<i>C. glabrata</i> (0,57%)			<i>C. glabrata</i> (1,33%)	<i>C. glabrata</i> (03%)
<i>C. parapsilosis</i> (0,57%)				<i>C. parapsilosis</i> (2%)
<i>R. rubra</i> (1,70%)	<i>R. rubra</i> (3,84%)			
<i>Tr. cutaneum</i> (2,84%)	<i>Tr. cutaneum</i> (11,53%)			
<i>Tr. Asahii</i> (1,13)		<i>Tr. asahii</i> (2.4%)		
<i>G. candidum</i> (0,57%)	<i>G. candidum</i> (15,38%)			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1,13%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (3,84%)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2,4%)		
<i>Tr. Asahii</i> (1,13)		<i>Tr. asahii</i> (2.4%)		

Full Length Research Paper

Yeasts in the mammary environment of the cattle in the region of Sidi M'hammed Ben Ali, Wilaya of Relizane, Algeria

Akdouche L.*, Aissi M., Zenia S. and Saadi A.

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire-Alger, BP.161, cinq Maisons, Alger, Algeria.

Received 7 January, 2014; Accepted 20 May, 2014

Mastitis is one of the principal pathologies in the dairy bovine exploitation. Most of the cases are caused by bacteria, but some are caused by fungi. The objective of our study was to evaluate the occurrence of these fungi in mammary glands of 39 cows (mastitic and clinically healthy cows) belonging to two farms (four exploitations using manual milking and three exploitations using milking machine) in the area of Sidi M'hammed Ben Ali, Wilaya of Relizane and to assess some risk factors (the tubes of drug, animal excretion, goblets-milkers, the milkers' hands and the litter). For this purpose, 150 samples of milk and 94 swabs were used. Our results reveal the presence of a heavy load of fungi cells in healthy and mastitic milks, with a strong frequency of *Trichosporon* sp. (43, 58%) followed by *Candida* sp. (30.76%). The same yeasts were isolated from swabs.

Key words: Mastitis, fungi, antibiotics, milking machine, the milker, Algeria.

INTRODUCTION

Mycotic mastitis was described from the beginning of the last century (Klein, 1901). This mastitis aroused some skepticism and numerous debates because the incriminated agents are often contaminants of the outside or the common saprophytes. Although still inadequately known, they seem to draw the attention of pathologists, especially since the acceptance of everyday treatment (intra-mammary antibiotic). The rates of the observed mycotic mastitis vary from 0.34 (Loftsgard et al., 1960) to 3.9%. Swinne-Desgain (1971) and Fortier (1990) said yeasts are responsible for 1.76 % cases of mastitis (clinic and sub-clinic). Milk from a healthy udder does not

contain either mushrooms or bacteria. It is better to speak about a fungal basic flora, resulting from the environment (dust resulting from feeds, equipment of collection as well as those of animals and even man). It is very common to find in the unpasteurized milk yeasts of the genre, *Candida* and mold, *Penicillium*, which can alter some dairy products.

Mycotic mastitis is split into two big groups according to the moment of appearance: primary mycotic Mastitis (bacterial preliminary mastitis) and secondary mycotic mastitis. The latter appears often straightaway, without antibiotic treatment or generally follows a bacterial

*Corresponding author. E-mail: leilakdouche@yahoo.fr. Tel: 0662.54.92.49.

Table 1. Sampling plan.

Nature of the sampling	Number of samples		
	Manual milking	Milking machine	Total
Number of cows	17	22	39
Numbers of milk samples	65	85	150
Numbers of anal swabs	17	22	39
Numbers of vaginal swabs	13	22	35
Number of swabs	0	2	2
Number of swabs on the hands of the milker	3	0	3
Number of swabs on creams Antibiotics	12	0	12
Numbers of litter samples	0	3	3

mastitis or an intramammary administration of antibiotics by diathétique way. According to some authors (Bertslinger et al., 1964), the first ones would represent 30% cases and the second 70% cases.

In Algeria, very few studies have been done on the prevalence of the fungal mastitis in the dairy bovine farms as well as on various factors favoring their appearance and development (Mebarki, 2007; Ksouri, 2008). So, the objective of the study is to determine the prevalence of mastitis caused by yeasts and to know the number of risk factors in some dairy bovine farms in Relizane.

MATERIALS AND METHODS

Distribution of a questionnaire

Pre-investigation was done in the last quarter of the year 2007 and the first half of 2008 to estimate the epidemiological situation of this pathological entity within the dairy beef herd in the region of Relizane. For that purpose, a questionnaire was distributed to the veterinarian practitioners. This investigation is on the breeding technique, frequency of the clinical mastitis in this breeding and the percentage use of antibiotics in the treatment of clinical mastitis.

Choice of farms

Four dairy farms with manual milking and tree with machine milking were used in this study. This selection was based on the comparison of both types of milking. All the farms exist in the same region- Sidi M'hammed Ben Ali, Wilaya de Relizène.

Nature and number of samples

A total of 244 samples were collected by the veterinarian practitioners of Sidi M'hammed Ben Ali's region. That is 150 samples of milk taken from 39 existing cows in 7 farms. The samples were obtained with different mammary glands health status: 19 cows with healthy mammary glands, 15 cows with subclinical mastitis as determined by the California Mastitis Test (CMT) and 05 cows with clinical mastitis, defined as follows: swelling, reduced milk flow and abnormal milk appearance, fever, inappetence, ataxia. CMT was used to identify subclinical mastitis on mammary gland of the cows. For this study, milk samples from gland affected with subclinical mastitis were included when the reaction to CMT was at least grade 1. This corresponds with an

appearance of viscous milk that does not adhere to the bottom of CMT plate, and correlates with 400,000-1,500,000 somatic cells/ml (Scott et al., 1986) (6 milk sampling emptied of their tube because they were badly kept), 91 swabs [39 anal swabs and 35 vaginal swabs of which four were badly kept), two swabs on milking machine, 3 on the hands of the milkers and 12 swabs of antibiotic creams. And at the end, three samples of litter were got back.

From every cow during lactation, four takings of milk (a taking of milk of every trayon), an anal swab, and a vaginal swab were taken once during all the period.

In every breeding with manual milking, swabbing was done by the hands of the milker before the milking (factor of contamination), there was recovery of the tubes of antibiotic cream (factor of release) used for the treatment of cows clinically and a sample of the litter was collected just before its renewal (factor of enrichment). Some takings were made in the breeding with machine milking except swabbing of the milkers' tumblers of the milking machine (factor of contamination) (Table 1).

Milk sampling

The correct realization of the sampling procedure was a necessity, in terms of the ubiquity of fungi which can contaminate the milk. The characteristics of the surrounding atmosphere were noted. The cows' environment was not loaded with dust (hays moving nearby and agitated animals). If such was the case, the animals of the dusty premises must have gone out. The milk sampling was realized according to the protocol of Guerin and Guerrin-Fauble (2007), which consists of washing the milkers' hands with a disinfecting soap, identifying the flask (in wide opening) with indelible felt-tip: number of the cow, the mammary gland quarter (FR, FL, RR or RL), date and time. The udder was carefully washed and wiped; the rough drafts of milk for rinsing the canal of the udder were eliminated (not more than 2 jets, otherwise there would be risk of the taking having germs). The teat canal of the udder was disinfected with a compress soaked with alcohol at 70°C; the sterile flask was opened to maintain the openings managed downward. The rubber was kept in the same hand without touching the inside; some milliliters of milk were taken and recorded in the flask. Every udder was disinfected before taking the milk of the corresponding district. Finally, the takings of milk were kept in - 20°C until the day of their analysis.

Mycological analyses of the milk

Mycological analysis was realized in the laboratory of Parasitology - Mycology of the Veterinary Graduate School- Algiers. It consists of a direct examination of the samples of milk, after vital staining. Milk

samples were centrifuged and the sediment was inoculated on the surface of Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (QUELAB, Laboratories INC and code: QB-39-3806) added of chloramphénicol (QUELAB, Laboratories INC and code: QB-39-3806) and incubated for 3 days at 25 °C. Finally, isolated yeasts and filamentous fungi were identified using microscopic characterization. Yeasts isolated were identified by the gallery Pasteur (gallery Auxanogramme) (DIMED, code: 15300Algeria). This identification was performed taking into consideration morphological characteristics, like formation of chlamydoconidium, pseudohyphae and germinal tube development. This gallery is composite due to its various cultural middle and various tests for the precise identification of yeasts.

1. Middle Sabouraud/Chloramphénicol at 37°C: this test allows one to highlight the potential pathogenic character of the yeast when it develops in a temperature, bordering the corporal temperature.
2. Middle Sabouraud/Actidione; this test allows one to highlight colonies sensitive to Actidione (Cycloheximide). Colonies having grown on this middle are considered resistant to Actidione (R); colonies not having grown on this middle are considered sensitive to Actidione (S).
3. Middle with cream of rice (rice cream): this middle favors the production of chlamydoconidia characteristics of *Candida albicans* in anaerobic middle.
4. Middle with serum for blastèse: the serum of bovine is used as middle to favor the production of *Candida*'s typical germinal albicans tubes (test of germination).
5. Middle in the urea Indole: this test allows one to look for the hydrolysis of the urea. The change of the middle colour of yellow-orange to purple-red corresponds to the secretion of an uréase. The yeast which turns the middle to red in 4 h is *C. neoformans*.

A quantitative search for mushrooms (counting of colonies) and qualitative search (the various tests for identification) are made. For the identification of the genre and species of yeasts, the key of identification of yeasts proposed by Drouhet and Dupont (1985) was used.

The anal, vaginal swabs and the material of milking

The vaginal and the anal excretions were collected by swabbing in the perineum and vaginal regions. Swabbing of goblets was done-milkers of milking machines only in two dairy cow farms and swabbing of the hands of the milking men before the milking.

Swabbings were made by direct scattering of the swab on the surface of the SDA plates added to chloramphenicol. After incubation for 3 days at 25°C, the colonies of yeasts were identified as previously.

The litter samples

The collected litter was deposited in one sterilized conical glass cup containing sterile physiological water, then the whole was homogenized and the rest was left for 30 min. Some gouts of the sediment are then inoculated on SDA added to chloramphénicol. Cultures were incubated for 3 days at 25°C.

RESULTS

Results of the questionnaire distributed to the veterinarian practitioners

The veterinarians in charge of the follow-up of the bovine breeding note that the measures of hygiene are absent.

Indeed, 60% of the milkers do not disinfect their hands before and after every milking. The udder is not disinfected before the milking in 45.71% cases. The majority of the breeding are done in hindered stall (54.85%); 57.14% of the breeders use the same rag for the disinfection of the udder and in 65.71% cases, this rag is not disinfected after each use; 25.71% of the farmers disinfect their milking material once a week; 17.14% of the breeders change the cow litters only once a week.

This report thus incited us to start a study on prevalence of the mastitis of fungal origin.

Results of the mycological analysis of the samples collected

Of the 244 samples realized, 91 are positive, that is, 37.3% and 78 fungal species were identified: 35 species in the breeding with manual milking namely *Candida* sp. (25.7%), *Trichosporon* sp. (48.6%), *Rhodotorula* sp. (8.6%), *Cryptococcus* sp. (2.9%), *Torulopsis* sp. (2.9%), *Penicillium* sp. (8.6%), *Aspergillus* sp. (2.9%) (Table 4); 43 species in the breeding with machine milking namely *Candida* sp. (34.9%), *Trichosporon* sp. (39.5%), *Rhodotorula* sp. (9.3%), *Cryptococcus* sp. (4.6%), *Torulopsis* sp. (2.3%), *Penicillium* sp. (7%) and *Aspergillus* sp. (2.3%) (Table 2).

DISCUSSION

Fungal cultures were observed in 68 samples of milk (Table 3). A study was done on the mammary infection of dairy cows in Sidi M' Hammed Be Ali's region, Wilaya of Relizane, from December 2007 to May 2008.

In our survey, the mycological examination of the milk samples and the realized swabs showed the presence of yeasts and filamentous fungi, with a higher frequency of yeasts (Table 3). This is in line with that of the literature. Indeed, the most frequent yeasts genus were *Candida* (30.76%) and *Trichosporon* (43.58%) (Table 4). Many authors noted that the fungal bovine mastitis is predominantly caused by yeasts (Swinne-Desgain, 1971; Kuo and Chang, 1993; Aalbaek et al., 1994; Watts, 1988; Lagneau et al., 1996; dos Santos and Marin, 2004).

The mycological analysis also revealed that, the same genre of yeasts was found in both types of exploitations namely *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* and *Torulopsis* (Costa et al., 1993; Krukowski et al., 2001; Krukowski et al., 2006); with a higher frequency for *Candida* and *Trichosporon* genres (30.76; 43.58%) and then *Rhodotorula* (7.69%) and *Cryptococcus* (3.84%) (Table 4). All these fungal agents, with the exception of *Rhodotorula* have been detected before as pathogenic agents in numerous inquiries on fungal mastitis (Moulinier, 2003). Prevalence of the

Table 2. Various species of yeasts and molds isolated.

Genre	%	Species	Number
Breeding with manual milking			
	25.7	<i>Candida zeylanoides</i>	1
		<i>Candida pseudotropicalis</i>	5
<i>Candida</i> sp.		<i>Candida guilliermondii</i>	1
		<i>Candida tropicalis</i>	1
		<i>Candida parapsilosis</i>	1
<i>Trichosporon</i> sp.	48.6	<i>Trichosporon cutanium</i>	10
		<i>Trichosporon capitatum</i>	7
<i>Rhodotorula</i> sp.	8.6	<i>Rhodotorula rubra</i>	3
<i>Cryptococcus</i> sp.	2.9	<i>Cryptococcus terreus</i>	1
<i>Torulopsis</i> sp.	2.9	<i>Torulopsis pulcherrima</i>	1
<i>Penicillium</i> sp.	8.6	<i>Penicillium</i> sp	3
<i>Aspergillus</i> sp.	2.9	<i>Aspergillus</i> sp	1
Total	100		35
Breeding with machine milking			
	34.9	<i>Candida zeylanoides</i>	1
		<i>Candida pseudotropicalis</i>	2
<i>Candida</i> sp.		<i>Candida guilliermondii</i>	7
		<i>Candida tropicalis</i>	4
		<i>Candida lusitanae</i>	1
<i>Trichosporon</i> sp.	39.5	<i>Trichosporon cutanium</i>	8
		<i>Trichosporon capitatum</i>	6
		<i>Trichosporon fermentens</i>	3
<i>Rhodotorula</i> sp.	9.3	<i>Rhodotorula glutinis</i>	4
<i>Cryptococcus</i> sp.	4.6	<i>Cryptococcus terreus</i>	2
<i>Torulopsis</i> sp.	2.3	<i>Torulopsis glabrata</i>	1
<i>Penicillium</i> sp.	7	<i>Penicillium</i> sp	3
<i>Aspergillus</i> sp.	2.3	<i>Aspergillus</i> sp	1
Total	100		43
Total			78

Table 3. Frequency positive samples according to the milking procedure.

Milking procedure	Number of milk samples	Positive samples	Frequency (%)
Manual milking	65	30	46.15
Machine milking	85	38	44.70
Total	150	68	45.3

fungal mastitis varies from 1 to 44% according to authors' number (Loftsgard et al., 1960; Monga et al., 1971; Swinne-Desgain, 1971; Farnsworth et al., 1972; Kumer et al., 1975; Fenizzia et al., 1976; Awad et al., 1980; Ramisse et al., 1982).

Global frequency observed on the present study was considered at 45.33% for the exploitations with clinical mastitis and subclinical mastitis (Table 3), which is similar to those of Swinne and Desgain (1971). This frequency may be explained by the animal management put in place in the visited dairy farms in the region of Sidi M'hammed Ben Ali (results of the questionnaire).

The genus *Trichosporon* was quoted by several authors as being a potential pathogenic fungus; in particular, *T. capitatum*, and *T. cutaneum* (Loftsgard et al., 1960; Fameree et al., 1970). The present study highlighted these species with a 43.58% rate (23, 06% for *T. cutaneum*, 16.66% for *T. capitatum*), higher than the rates found in a survey done by Mebarki (2005) in Algiers (19.25 %) on dairy exploitations of subclinical mastitis. Other authors pointed to lower rates, such as Moretti et al. (1998), who isolated *T. capitatum* in 31.2% cases and *T. cutaneum* in 18.72% cases in Italy. Aalbaek et al. (1994) described five cases of mastitis caused by *Tr*

Table 4. Frequency of fungi isolations in the samples.

Genre	Percentage (%)
<i>Candida</i> spp.	30.76
<i>Trichosporon</i> spp.	43.58
<i>Rhodotorula</i> spp.	8.97
<i>Cryptococcus</i> spp.	3.84
<i>Torulopsis</i> spp.	2.56
<i>Penicillium</i> spp.	7.69
<i>Aspergillus</i> spp.	2.56

Table 5. Summary of the number of yeasts and filamentous fungi isolated from milk.

Fungi	Manual milking	Machine milking
Yeasts	40	46
Moulds	08	06
Total	48	52

capitatum in Denmark, which is lower than that of this present result (13 cases). Costa et al. (1993) have described 21 mastitis cases caused by *T. cutaneum* in Brazil.

Concerning the genus, *Candida*, its strong predominance (30.76 %) in the whole of the positive samples confirms the importance of this yeast, often evoked as the main genus in the etiology of mycotic mastitis (Fameree et al., 1970; Farnsworth et al., 1972; Richard et al., 1980; Yeh et al., 1988; Kuo and Chang, 1993; Aalbaek et al., 1994; Lagneau et al., 1996; dos Santos et al., 2004). This frequency of *Candida* isolation was lower than that recorded in the region of Algiers by Mebarki (2005) (52.07%) and in the South of Brazil by Spanamberg et al. (2008) (37.9%), but superior to that (17.3%) noted by Sailor et al. (2004) in Brazil.

Prevalence of the fungal mastitis according to the milking modality was almost the same: in the manual milking, it is 46.15% and in the machine milking, it is 44.70%. This means that there is independence between the positive milk samples and the milking procedure at the beginning. The difference is not significant ($p > 5$). The Chi-square test of independence was used for the comparison of both methods (manual milking and machine milking). This indicates that the problem does not settle at the level of the method of milking but in the conditions of the milking progress (the factors of enrichments, factors of releases and factors of contamination) (Table 5).

Conclusion

The frequency of fungal mastitis is underestimated in Algeria. The present study shows cases of fungal mastitis found in two types of exploitations (manual milking or

machine milking). The isolation of the same genus of fungi in an almost similar percentage in both milking systems confirms the idea. This leads one to conclude that the problem of the fungal mastitis is not only connected to the milking modality but is connected to the conduct of farmers and the hygienic practices applied during the milking. The hygiene practices in the stables of the dairy farm do not have to be an additional act in the conduct of the farmers but a regular component of the farm management. With the aim of limiting the increase of the fungal mastitis, it is important to establish a specific diagnosis on healthy and pathological milk to modulate a treatment according to the etiology and clinical aspect of mastitis.

Conflict of Interests

The author(s) have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Aalbaek B, Stenderup J, Jensen HE, Valbak J, Nylin B, Huda A (1994). Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. *APMIS*, 102:451-456.
- Awad FI, El moula A, Fayed A (1980). Studies on mycotic mastitis in Egypt. *J. Egypt. Vet. Med. Assoc.* 40(3):35-41.
- Bertslinger HU, Schweizer R, Scholer HJ (1964). Hefen als mastitis erregere beim rind. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* pp.106, 158,166.
- Costa EO, Gandra CR, Pires MF, Teixeira CM (1993). Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of S.o Paulo, Brazil. *Mycopathologia.* 124(1):13-17.
- Dos santos RC, Marin JM (2004). Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*, 59:251-253.
- Drouhet E, Dupont B (1985). Les champignons levuriformes d'intérêt médical. *Laborama, Revu d'information.* Avril, N° 21 :3-12.
- Fameree L, Swinne-desgain D, Cotteleer C (1970). Mammites, antibiotiques, levures. *Ann. Med. Vet.* 114:389-409.
- Farnsworth RJ, Sorensen DK (1972). Prevalence and species distribution of yeast in mammary glands of dairy cows in Minnesota. *Can. J. Comp. Med.* 36(4):329-332.
- Fenizzia D, De anseris P, Cicala G (1976). Mastitis bovina subclinica attri buibile ad *Aspergillus fumigatus*. *Atti Soc.Ital.Sci .Vet.* n°29 :664-668.
- Fortier G (1990). Mammites Mycosiques des bovins, flore fongique du lait, pathogénie et moyen de lutte. Thèse AIFort. Paris, France, p. 130.
- Guerin P, Guerin-fauble V (2007). Les mammites de la vache laitière. Thèse docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de Lion. pp. 54-58.
- Klein E (1901). *J. Hyg.* 11,665. Quoted by: Loftsgard G, Lindquist K (1960). Bovine mycotic mastitis. *Acta. Vet.Scand.*
- Krukowski H, Tietze M, Majewski T, R.ZAŚSKI P (2001). Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia*, 150(1):5-7.
- Krukowski H, Lisowski A, Rozanski P, Skorka A (2006). Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 9(3):181-184.
- Ksouri S (2008). Contribution à l'étude des mammites fongiques des bovins dans deux élevages laitiers de la région de guelma. Thèse de Magistère. ISV EL Taref. p.154.
- Kumer S, Dhillon SS (1975). Mastitis caused by fungi. *Indian Vet. J.* 52:125-128.
- Kuo CC, Chang CH (1993). Isolation of fungi from the mastitic milk of dairy cattle. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* 19:221-227.
- Lagneau PE, Lebtahi K, Swinne D (1996). Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia* 135:99-102.

- Loftsgard G, Lindquist K (1960). Bovine mycotic mastitis. *Acta. Vet. Scand.* 1:201-220.
- Mebarki M (2007). Contribution à l'étude des mammites mycosiques dans quelques élevages bovins laitiers de la région d'Alger. Thèse de Magistère. ENSV, Alger. 183p.
- Monga DP, Kalra DS (1971). Prevalence of mycotic mastitis among animals in Haryana. *Ind. J. Sci.* 41:813-816.
- Moretti A, Pasquali P, Mencaroni G, Boncio L, Piergili FD (1998). Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). *Zentralbl Veterinarmed B.*, 45(3):129-132.
- Moulinier C (2003). Parasitologie et mycologie médicale, éléments de morphologie et de biologie. E.M. Inter-édition Médicales internationales. France: pp. 698, 699, 703, 704, 780.
- Ramisse J, Brement AM, Lamarre C, Viaud MA, Breard A (1982). Résultats d'une enquête sur les mammites Vendée. *Point Vétérinaire.* 13:63:63-73.
- Richard JL, Mac Donald JS, Fichtner RE, Anderson AJ (1980). Identification of yeasts from infected bovine mammary gland and their experimental infectivity in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41(12):1991-1994.
- Scott EM, Gorman SP, McGrat SJ (1986). An assessment of the fungicidal activity of antimicrobial agents for hard-surface and skin disinfection. *J. Clin. Hosp. Pharm.* 11:199-205.
- Spanamberg A, Wüender A, Brayer PDI, Argenta J, Cavallini SEM, Valente P, Ferreiro L (2008). Diversity of yeasts from bovine mastitis in Southern Brazil. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:154-156.
- Swinne-Desgain D (1971). Isolement de levures à partir de laits de vaches. *Cahiers de Med. Vet.* 40:57-63.
- Watts JL (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 16:41-66.
- Yeh SG, Chung KY, Cho HT (1988). Prevalence of yeasts in bovine mammary gland infections and teat cups of milking machines. *Korean J. Vet. Res.* 28:361.

Résumé :

Les mammites représentent l'une des principales pathologies chez les vaches laitières ((**MAHIEU H., 1985**). En Algérie, très peu d'études ont été menées sur l'occurrence de la mammite fongique dans les fermes de bovins laitiers ainsi que divers facteurs favorisant leur apparition et leur développement.

Dans la majorité des cas, les facteurs déclenchant cette infection sont des bactéries. Un nombre croissant de champignons est actuellement associé à cette pathologie. Ceci est lié à une antibiothérapie trop largement utilisée dans le traitement de ces agents bactériens. Donc, nous nous sommes fixés comme objectifs, la détermination de la prévalence de la mammite causée par les levures et l'étude d'un certain nombre de facteurs de risque dans certains élevages bovins laitiers de la région de Sidi Lahcène, wilaya de Sidi Belabbes.

Les prélèvements de notre étude ont été effectués durant le deuxième trimestre 2012 (Mars, Avril, Mai, 2012) sur **13 élevages** comportant en totalité **70 vaches** (vache mammiteuse et vache cliniquement saine) appartenant à deux types d'exploitations (06 exploitations à traite manuelle et 07 exploitations à traite mécanique). Les facteurs de risque inclus, les sécrétions animales, les gobelets trayeurs, les mains des trayeurs, la peau de la glande mammaire, l'abreuvoir, le mangeoire, la citerne de stockage du lait, le sceau de collecte du lait.

A cet effet, **562** prélèvements ont été réalisés dans les 13 élevages à savoir : **490** prélèvements effectués sur les vaches (280 prélèvements de lait et 210 écouvillons) et **65** écouvillons du matériel d'élevage et **07** échantillons de l'eau de l'abreuvoir. L'analyse mycologique a été réalisée durant le premier semestre de l'année 2013 (de Janvier 2013 jusqu'à Juillet 2013) au niveau du laboratoire de Parasitologie - Mycologie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire - Alger.

Les levures isolées ont été identifiées en utilisant la caractérisation microscopique, et un auxanogramme réalisé dans des galeries biochimiques (la galerie Pasteur de l'Institut Pasteur d'Alger et le test API[®] 20C AUX de Bio Mérieux, France).

Nos résultats ont révélé une prévalence de l'infection aux levures seules de **29,54%** avec une forte fréquence d'isolement pour le genre *Candida sp.* (73,86%) suivit du genre *Rhodotorula sp.*(11,36%) suivit par les deux genres *Cryptococcus sp.* et *Trichosporon sp.*(6,25%,5,68% respectivement).

Mots clés : Bovin - Mammite – Levures – Machine à traire – Trayeur- Antibiotiques.

Summary

Mastitis represents one of the main diseases in dairy cows ((MAHIEU H., 1985). In Algeria, very few studies have been conducted on the prevalence of fungal mastitis in dairy cattle farms as well as various factors favoring their appearance and development. In most cases, the triggers this infection is bacteria. A growing number of fungi is currently associated with this pathology.

This is related to antibiotics too widely used in the treatment of these bacterial agents. So we set as objectives, determining the prevalence of mastitis caused by yeasts and the study of a number of risk factors in some dairy farms in the region of Sidi Lahcène, wilaya of Sidi Bel Abbès .

The samples of this study were carried out during the second quarter of 2012 (March, April, May, 2012) on 13 farms with 70 cows entirely (mastitic cow and clinically healthy cow) belonging to two types of farms (06 farms manual milking and 07mechanical milking farms).

The risk factors included, animal secretions, the teat cups, the hands of the milkers, the skin of the mammary gland, the drinker, the manger, the milk storage tank, the milk collection seal. For this purpose, 562 samples were collected in 13 farms are: 490 samples taken from cows (280 milk samples and 210 swabs) and 65 swabs livestock equipment and 07 samples of drinker water.

Mycological analysis was conducted during the first half of 2013 (from January 2013 until July 2013) at the Laboratory of Parasitology - Mycology from the higher National Veterinary School - Alger.

The isolated yeasts were identified using microscopic characterization, and auxanogramme realized in biochemical galleries (gallery Pasteur Institut Pasteur Algiers and testing API® 20C AUX Bio Merieux, France).

Our results showed a prevalence of infection with yeast only 29.54% with a high frequency of isolation for the genus *Candida* sp. (73.86%) followed by the genus *Rhodotorula* sp. (11.36%) followed by the two genera *Cryptococcus* sp. and *Trichosporon* sp. (6.25%, 5.68% respectively).

Keywords: Cattle - Mastitis - Yeasts - Milking machine - Trayeur- Antibiotics.

ملخص

إن التهاب الضرع يمثل واحدة من الأمراض الرئيسية عند الأبقار (MAHIEU H.1985)، وفي الجزائر، أجريت دراسات قليلة جدا على مدى انتشار التهاب الضرع الفطري في مزارع الأبقار الحلوب وعوامل مختلفة تساعد على ظهوره وتطويره.

في معظم الحالات، محفزات هذه العدوى هي البكتيريا. ويرتبط عدد متزايد من الفطريات حاليا مع هذه الحالة المرضية. ويرجع هذا الأمر إلى استخدام المضادات الحيوية على نطاق واسع جدا في علاج هذه الأمراض البكتيرية. لذلك نحن وضعنا كهدف لنا، تحديد مدى انتشار التهاب الضرع الناجم عن الخمائر ودراسة عدد من عوامل الخطر في بعض مزارع الألبان في منطقة سيدي لحسن، ولاية سيدي بلعباس .

أجريت عينات هذه الدراسة خلال الربع الثاني من عام 2012 (مارس، أبريل، ماي، 2012) على 13 مزرعة مع 70 بقرة في الكامل (بقرة مريضة وبقرة سليمة مظهريا) ينتمون إلى نوعين من المزارع (06 مزارع الحلب اليدوي و 07 مزارع الحلب الميكانيكي). شملت عوامل الخطر ، إفرازات الحيوانات، الكؤوس الحالبة لحلمة الضرع ، ايدي الحالب، وجلد الضرع، والمشرب، موضع الأكل، و خزان الحليب ، وبرميل جمع الحليب.

لهذا الغرض، تم جمع 562 عينة في 13 مزرعة هي: 490 عينة مأخوذة من حلمة الضرع (280 عينة حليب و 210 مسحة) و 65 مسحة معدات تربية المواشي و 07 عينات من ماء المشرب. أجري تحليل الفطريات خلال النصف الأول من عام 2013 (خلال الفترة من جانفي 2013 إلى جويلية 2013) في مختبر علم الطفيليات - علم الفطريات في المدرسة الوطنية العليا للطب البيطري - الجزائر العاصمة.

تم التعرف على الخمائر المعزولة باستخدام الخصائص المجهرية، و مدى استعمالها لأنواع السكر المحقق في المعارض البيوكيميائية (معرض باستور، معهد باستور الجزائر واختبار API® 20C AUX بيو ميريو، فرنسا).

وأظهرت النتائج التي توصلنا إليها أن نسبة الإصابة بالخمائر على انفراد هي 29.54% مع نسبة مرتفعة للنوع كنديدا (73.86%) يليه النوع رودوتوغيل (11.36%) متبوع بالنوعين كريبتوكوكيس و تريكوسبورون (6.25%)، 5.68% على التوالي).

الكلمات الدالة: التهاب الضرع - الخمائر - آلة الحلب - الحلاب - المضادات الحيوية.