

N° d'ordre :040/PFE/2024

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

THÈME

Recherche et caractérisation phénotypique des souches de *Pseudomonas* isolées du lait cru

Présenté par :

Melle : MERABET Nedjet.

Melle : MESRANE Rania.

Soutenu publiquement, le 08-07-2024 devant le jury :

Mme BAKOUR L.

MCB (ENSV)

Présidente

Déclaration sur l'honneur

Je soussigné(e) MERABET Nedjet, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteurs ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Samar", with a stylized flourish underneath.

Déclaration sur l'honneur

Je soussigné(e) MESRANE Rania, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteurs ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature



Résumé

Pseudomonas est à la fois un pathogène opportuniste et une composante de la flore d'altération du lait cru de vache. Notre étude porte sur la recherche de ce micro-organisme et la caractérisation phénotypique des souches isolées du lait cru, prélevé dans des élevages d'Alger et de Bouira.

L'isolement de *Pseudomonas* a été réalisé selon la norme ISO 13720 (2010) modifiée, et l'identification des espèces par le système API[®] 20NE. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été effectuée selon la méthode des disques, basée sur la diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton.

L'analyse de 30 échantillons a révélé un taux de contamination par *Pseudomonas* estimé à 6,7%, ainsi que l'identification de deux espèces : *P. aeruginosa* et *P. putida*. Les souches testées à 11 antibiotiques étaient résistantes avec un taux global d'expression clinique de l'ordre de 27,3%. Ces souches ont montré une résistance de 100% à la ticarcilline et de 50% à la ticarcilline associée à l'acide clavulanique ainsi qu'à la colistine. Deux phénotypes de résistance ont été déterminés : Tc Ttc Ct et Tc.

Cette étude révèle la présence de *Pseudomonas* résistants dans le lait dans deux wilayas en Algérie. L'amélioration et le respect des conditions d'hygiène de la traite en particulier est indispensable afin de prévenir la contamination des produits laitiers et la dissémination des souches résistantes.

Mots clés : *Pseudomonas*, lait cru, prévalence, caractérisation phénotypique.

Abstract

Pseudomonas is both an opportunistic pathogen and a component of raw milk spoilage flora. Our study focuses on the detection of this microorganism and the phenotypic characterization of strains isolated from raw milk collected in Algiers and Bouira cattle farms.

Pseudomonas isolation was performed according to the modified ISO 13720 (2010) standard, and species identification was done using the API® 20NE system. Antibiotic susceptibility testing was conducted using the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar.

Analysis of 30 samples revealed a contamination rate by *Pseudomonas* of 6.7%, with the identification of two species: *P. aeruginosa* and *P. putida*. The strains tested against 11 antibiotics exhibited a resistance rate with an overall clinical expression of 27.3%. These strains showed 100% resistance to ticarcillin and 50% resistance to both ticarcillin-clavulanic acid and colistin. Two resistance phenotypes were determined: Tc Tc Ct and Tc.

This study reveals the presence of antibiotic-resistant *Pseudomonas* in milk from two regions in Algeria. Improving and adhering to hygiene conditions during milking is essential to prevent contamination of dairy products and the spread of resistant strains.

Keywords: *Pseudomonas*, raw milk, prevalence, phenotypic characterization

ملخص

بكتيريا الزائفة هي في نفس الوقت مُمرض انتهازى وجزء من الفلورا التي تسبب تلف الحليب. دراستنا تركز على البحث عن هذا الميكروب وتوصيف الأنماط الظاهرية للعزلات التي تم الحصول عليها من الحليب الخام المأخوذ من مزارع في الجزائر والبويرة.

تم عزل بكتيريا الزائفة وفقاً للمعيار (2010) ISO 13720 المعدل، وتم تحديد الأنواع باستخدام نظام API® 20NE. تم إجراء دراسة الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة الأقراص، التي تعتمد على الانتشار في وسط آجار مولر-هنتون.

كشفت تحليل 30 عينة عن معدل تلوث ببكتيريا الزائفة يقدر بـ 6.7٪، بالإضافة إلى تحديد نوعين: الزائفة الزنجارية و الزائفة بوتيدا. كانت السلالات التي اختبرت ضد 11 مضاداً حيوياً مقاومة بمعدل عام للتعبير السريري حوالي 27.3٪. أظهرت هذه السلالات مقاومة بنسبة 100٪ للتيتكارسيلين و 50٪ للتيتكارسيلين المرتبط بحمض الكلافولانيك وكذلك للكوليستين. تم تحديد نمطين ظاهريين للمقاومة: Tc و Tc Ttc Ct.

تكشف هذه الدراسة عن وجود بكتيريا الزائفة المقاومة في الحليب في ولايتين في الجزائر. التحسين والالتزام بشروط النظافة أثناء الحلب بشكل خاص أمر ضروري لمنع تلوث منتجات الألبان وانتشار السلالات المقاومة.

الكلمات المفتاحية: الزائفة، الحليب الخام، الانتشار، التوصيف المظهري.

Remerciements

*Au début et avant tout, nous remercions **DIEU Le Tout Puissant**, de nous avoir donné le courage, la santé, la volonté et surtout la patience pour pouvoir achever ce modeste travail.*

Ensuite, nos profonds remerciements s'adressent à notre promotrice **Mme MEZALI L.**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, nous tenons à lui exprimer notre reconnaissance pour sa grande disponibilité et ses conseils tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

Nous remercions **Mme BAKOUR L.**, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury et **Mme NOUICHI S.**, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un remerciement spécial s'adresse aux propriétaires des élevages à Alger et à Bouira qui nous ont facilités l'accès à effectuer nos prélèvements.

Pour l'aide et la disponibilité, recevez **Mr. SAADI Ahmed** nos profonds remerciements.

Nous remercions toute personne ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, ainsi que l'ensemble de nos enseignants qui nous ont accompagnés et formés pendant notre cursus universitaire à l'ENSV. Nous vous exprimons ici nos plus profonds respect et reconnaissance.

Dédicaces

C'est grâce à **DIEU Le Tout Puissant** qui nous a donné le courage et la volonté pour pouvoir dédier ce travail :

À **mes très chers parents** pour lesquels une dédicace ne peut vraiment exprimer mes sentiments envers leur patience illimitée, leurs encouragements continus et leur aide. Veuillez trouver, en ces quelques lignes, le témoignage de mon profond amour et respect pour vos grands sacrifices.

À ma très chère sœur **Sara** et à mes frères **Oussama et Roufeid**.

À ma meilleure amie **Rania**.

À toute ma famille.

Nedjet

À **mes chers parents**, je ne pourrais jamais exprimer assez le respect que j'ai pour vous ; vos prières, vos encouragements et votre soutien, m'ont toujours été d'un grand secours.

À mes très chères frères **Zaki** et **Abd el wadoude**

À mes sœurs **Asma** et **Rafif**

À mon binôme et chère amie **Nedjet**.

À toute la famille **MESRANE**.

Rania

Liste des abréviations

AARN : Algerian antimicrobial resistance network.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

API[®] 20NE : Analytic Profile Index 20 non entérobactéries.

ARN: Acide ribonucléique.

ARNr: ARN ribosomal.

BHIB: Brain heart infusion broth.

BLSE : β -lactamases à spectre élargi.

CLSI : Clinical laboratory standards institute.

CMB : Concentration minimale bactéricide.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

°D : Degré dornique.

d_T^T : Densité relative.

GLU: Glucose.

IATS: International Antigenic Typing Scheme.

LPS : Lipopolysaccharide.

m.v : Masse volumique.

Mbp : Million base pairs.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PAMR : *Pseudomonas aeruginosa* multi résistante.

PBP: Penicillin Binding Protein.

PHB: Poly- β -hydroxybutyrate.

Liste des tableaux

Tableau n°01 : La flore indigène du lait cru.....	10
Tableau n°02 : Répartition des prélèvements du lait cru par wilaya et par élevage visité.....	34
Tableau n°03 : Interprétation des tests biochimiques pour l'identification de l'espèce <i>Pseudomonas</i> sur API® 20NE.....	(Annexe)
Tableau n°04 : Valeurs critiques des diamètres de zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas</i> selon le CLSI.....	42
Tableau n°05 : Prévalence de contamination du lait individuel cru par <i>Pseudomonas</i>	45
Tableau n°06 : Répartition par wilaya et élevage des espèces de <i>Pseudomonas</i> isolées du lait cru.....	46
Tableau n°07 : Prévalence des autres genres bactériens isolés du lait cru.....	46
Tableau n°08 : Taux global d'expression clinique des souches de <i>Pseudomonas</i> testées à 11 antibiotiques.....	47
Tableau n°09 : Taux d'expression clinique des souches de <i>Pseudomonas</i> testées en fonction de l'antibiotique.....	48
Tableau n°10 : Profil d'antibiorésistance des espèces de <i>Pseudomonas</i> isolées du lait cru.....	49

Liste des figures

Figure n°01 : Illustration de l'origine des bactéries contaminant le lait durant les différents stades de sa production.....	11
Figure n°02 : Représentation schématique des lignées, groupes et sous-groupes du genre <i>Pseudomonas</i>	15
Figure n°03 : Pigmentation verte fluorescente de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur gélose à la cétrimide.....	17
Figure n°04 : Structure générale des pyoverdines.....	21
Figure n°05 : Structure générale des pyocyanines.....	22
Figure n°06 : Principaux facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i> et voies de sécrétion.....	24

Liste des photographies

Photographie n°01 : Aspect microscopique des bacilles de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après coloration de Gram (x100)	16
Photographie n°02 : Prélèvement individuel du lait par collecte manuelle.....	34
Photographie n°03 : Etape d'enrichissement du diluant (eau peptonée tamponnée).....	35
Photographie n°04 : Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas</i> sur milieu à la cétrimide.....	36
Photographie n°05 : Test de recherche de la catalase (positif à gauche et négatif à droite).....	37
Photographie n°06 : Test de recherche de la cytochrome oxydase (positif à gauche et négatif à droite).....	38
Photographie n°07 : Aspect microscopique du genre <i>Pseudomonas</i> après coloration de Gram (G x100).....	39
Photographie n°08 : Aspect d'une galerie API® 20NE inoculée.....	40
Photographie n°09 : Aspect d'une galerie API® 20NE après incubation.....	41

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Résumés

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photographies

Table des matières

Introduction..... 1

Partie bibliographique

Chapitre 01 : Généralités sur le lait cru

1. Définition du lait.....	3
2. Anatomie et physiologie de la mamelle de la vache	3
3. Composition chimique du lait.....	4
3.1.Eau	4
3.2.Matière grasse.....	4
3.3.Protéines	5
3.4.Glucides	5
3.5.Minéraux	5
3.6.Vitamines	6
3.7.Enzymes	6
4. Propriétés physiques du lait.....	7
4.1.Masse volumique et densité	7
4.2.Point de congélation	8
4.3.Point d'ébullition.....	8
4.4.pH et acidité.....	8
5. Valeur nutritionnelle du lait.....	8
6. Qualité organoleptique du lait	8
6.1.La couleur.....	8
6.2.L'odeur	9
6.3.La saveur.....	9
7. Microbiologie du lait	9

7.1.Principaux micro-organismes du lait	9
7.1.1. Flore indigène	9
7.1.2. Flore de contamination	10

Chapitre 02 : Le genre *Pseudomonas*

1. Généralités	13
2. Classification	13
3. Caractères bactériologiques	15
3.1. Morphologie	15
3.2.Structure	17
3.2.1. Structure générale.....	17
3.2.2. Structure génétique	18
3.2.3. Structure antigénique	19
3.3.Caractères cultureux.....	20
3.4.Caractères biochimiques	20
3.4.1. Production d'enzymes	20
3.4.2. Production d'ortho-aminoacétophénone.....	21
3.4.3. Production de pigments	21
4. Facteurs de virulence de <i>Pseudomonas</i>	23
4.1.Le système de sécrétion de type III (T3SS)	24
4.2.Les rhamnolipides	24
4.3.Elastase LasB	24
4.4.Les pigments	24
5. Habitat	25
6. Pathogénie et manifestations	25

Chapitre 03 : La résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Généralités sur les antibiotiques	27
1.1. Définition	27
1.2.Classification.....	27
1.3.Mode d'action des antibiotiques	28
1.4.Notions de bactériostase et de bactéricidie	28
2. Résistance aux antibiotiques	28
2.1. Définition	28
2.2.Types de résistance.....	29
2.2.1. La résistance naturelle	29

2.2.2. La résistance acquise.....	29
2.3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques	29
2.4.Résistance de <i>Pseudomonas</i> aux antibiotiques	29
2.4.1. La résistance naturelle de <i>Pseudomonas</i> aux antibiotiques.....	29
2.4.2. La résistance acquise de <i>Pseudomonas</i> aux antibiotiques.....	30

Partie pratique

Objectifs de l'étude	33
1. Matériel et méthodes.....	33
1.1.Période et lieu de l'étude.....	33
1.2. Echantillonnage	33
1.3.Matériel.....	35
1.4.Méthodes	35
1.4.1. Recherche de <i>Pseudomonas</i> dans le lait cru.....	35
1.4.2. Identification de <i>Pseudomonas</i>	36
1.4.3. Test de sensibilité aux antibiotiques	42
1.4.4. Conservation des souches	44
2. Résultats	
2.1.Résultats de la recherche de <i>Pseudomonas</i> dans le lait.....	45
2.2.Résultats de l'identification biochimique.....	45
2.2.1. Identification des espèces de <i>Pseudomonas</i> dans le lait	45
2.2.2. Identification d'autres espèces bactériennes	46
2.3.Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	46
2.3.1. Expression clinique des souches testées aux antibiotiques	46
2.3.2. Expression clinique des souches testées aux antibiotiques par espèce de <i>Pseudomonas</i> et détermination des phénotypes de résistance.....	49
3. Discussion.....	50

Conclusion et recommandations	54
--	----

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Le lait est un aliment de haute qualité nutritive, riche et équilibré, capable de répondre à une grande partie des besoins nutritionnels. Il représente une source alimentaire et énergétique majeure en calcium, en nutriments essentiels, contribuant ainsi à rééquilibrer l'apport nutritionnel des consommateurs. En raison de cette richesse, les produits lactés sont appréciés non seulement pour leur goût mais aussi pour leur rôle essentiel dans l'équilibre alimentaire tout au long de la vie (**KACIMI EI HASSANI, 2013**).

Le genre *Pseudomonas* représente le groupe le plus écologiquement diversifié de bactéries sous forme de bâtonnets aérobies stricts à Gram négatif, peu exigeantes. Les *Pseudomonas* se retrouvent souvent dans des environnements humides où ils peuvent former des biofilms en adhérant aux surfaces. Ils sont isolés d'habitats naturels variés tels que le sol, l'eau douce et les environnements marins. D'un grand intérêt, les *Pseudomonas* sont associés aux maladies des plantes, des animaux et de l'homme, et leur potentiel dans les applications biotechnologiques est croissant (**MENA et al., 2009**).

Par ailleurs, *Pseudomonas* est un micro-organisme responsable d'infections nosocomiales, très résistant à un grand nombre d'antibiotiques. La facilité de la contagion s'explique par son caractère ubiquitaire, par le fait qu'elle peut facilement transférer ou acquérir des gènes de résistance à partir d'autres bactéries apparentées, mais aussi d'espèces plus éloignées (**LE MINOR et VERON, 1990**).

Dans les élevages laitiers, *Pseudomonas* se révèle une bactérie pathogène insidieuse. Pendant la lactation, elle provoque peu d'inflammations et cause rarement des mammites cellulaires ou aiguës. Tant que la traite est effectuée deux fois par jour, les bactéries restent en faible nombre dans la mamelle. Cependant, au moment du tarissement, la situation devient plus préoccupante. En raison de sa résistance à la plupart des antibiotiques, *Pseudomonas* peut proliférer et produire des toxines une fois que le tarissement élimine les staphylocoques et les streptocoques de l'environnement immédiat (**BRUYERE et al., 2014**).

À notre connaissance, les études concernant la caractérisation phénotypique par l'identification des espèces et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* isolées du lait cru n'existent pas en Algérie.

La présente étude réalisée entre novembre 2023 et mars 2024, a pour objet la recherche de ce micro-organisme à la fois pathogène et d'altération, dans différents élevages bovins laitiers situés dans les wilayas d'Alger et de Bouira. Elle comprend une partie bibliographique et une partie pratique.

Dans la partie bibliographique, nous présenterons des généralités sur le lait cru ainsi qu'une synthèse sur le genre *Pseudomonas* et sur la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Dans la partie pratique, l'isolement de *Pseudomonas* sera suivi d'une identification de l'espèce et d'une caractérisation antibiotypique dans le but d'évaluer la prévalence de la contamination du lait cru, et de déterminer les espèces et les phénotypes de résistance des souches

Partie bibliographique

Chapitre 01

Généralités sur le lait cru

1. Définition du lait

La première définition du lait apparaît en 1908, au Congrès International de la Répression des Fraudes qui s'est tenu à Paris, France. Le mot « lait » a été défini comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ». Le lait sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache (NOBLET, 2012).

Le lait doit être collecté dans des conditions hygiéniques strictes et répondre à des normes sanitaires élevées. Bien qu'il puisse être consommé tel quel, il est souvent soumis à des processus de standardisation lipidique et de purification microbienne pour réduire les risques sanitaires et assurer une durée de conservation plus longue (JEANTET *et al.*, 2008).

Le lait cru est, selon la réglementation Européenne 853/2004 le lait produit par la sécrétion de la glande mammaire d'animaux d'élevage qui ne doit être ni chauffé à plus de 40°C, ni soumis à un traitement d'effet équivalent. Ce lait ne doit donc subir aucun traitement autre que la réfrigération mécanique immédiate après la traite à la ferme. Le lait cru n'est en général pas utilisé en restauration collective scolaire et hospitalière, tel que recommandé par le groupe d'étude sur les marchés de restauration collective et de nutrition (MERIGAUD, 2009).

Quant au liquide sécrété par les mamelles dans les premiers jours suivant la mise bas, il est appelé colostrum (VILAIN, 2010).

2. Anatomie et physiologie de la mamelle de la vache

La mamelle ou « pis » est une glande tégumentaire, d'origine ectodermique, de structure tubulo-alvéolaire ramifiée, dont la fonction est de sécréter le lait, premier aliment du mammifère nouveau-né (PAVAUX, 1982). Elle est solidement attachée aux muscles et au squelette par différents ligaments ; d'une part, par les ligaments médians composés de tissu fibreux élastique, et d'autre part, par les ligaments latéraux formés de tissu conjonctif moins élastique. Une fragilité de ces ligaments suspenseurs, liée principalement à l'âge ou à un œdème important, peut conduire à la rupture et un décrochement de la mamelle (REMY, 2010).

La glande mammaire de la vache laitière, qui est hautement productive en lait, est richement vascularisée. Ce réseau sanguin fournit les éléments essentiels nécessaires aux lactocytes pour la production de lait. Les alvéoles mammaires agissent comme de petites fabriques de lait, opérant sans relâche jour et nuit. Ils puisent les éléments nutritifs indispensables (glucose, acides aminés, acides gras, eau et sels minéraux) du sang pour les convertir en lait, qui s'accumule dans la cavité des alvéoles.

Lors de la traite, sous l'impulsion de l'ocytocine, les cellules myoépithéliales se contractent, propulsant ainsi le lait hors de la cavité des alvéoles à travers les canaux alvéolaires, puis vers les canaux galactophores et enfin vers le sinus lactifère (**LEE *et al.*, 1980**).

3. Composition chimique du lait

3.1. Eau

Le lait est riche en eau ; 1/2 litre de lait apporte 450 mL d'eau (**FREDOT, 2006**). L'eau possède une nature polaire en raison de la présence d'un dipôle et d'électrons libres. Cette polarité lui permet de former de véritables solutions avec des substances polaires telles que les glucides et les minéraux, et une solution colloïdale avec des protéines sériques hydrophiles. Les matières grasses, en revanche, ne peuvent pas se dissoudre car elles sont de nature apolaire (ou hydrophobe), formant ainsi une émulsion de type huile dans l'eau. De même, les micelles de caséines ne peuvent pas se dissoudre et forment une suspension colloïdale car elles sont solides (**VIGNOLA, 2002**).

3.2. Matière grasse

La matière grasse du lait de vache représente à elle seule la moitié de l'apport énergétique du lait. Elle est constituée de 65% d'acide gras saturés et de 35% d'acide gras insaturés. Parmi ceux-ci, la proportion d'acide gras poly-insaturés est faible (3%) (**JEANTET *et al.*, 2008**). Les principaux composants sont les triglycérides, les phospholipides et une fraction insaponifiable constituée en grande partie de cholestérol et de β -carotène (**VIGNOLA, 2002**).

3.3. Protéines

Le lait contient en moyenne 3,5% de protéines. Cette teneur varie selon l'alimentation de l'animal, les saisons et le cycle de lactation (**FREDOT, 2006**). Deux groupes de protéines se distinguent : les caséines et les protéines du lactosérum.

3.3.1. La caséine est un complexe phosphoprotéique acide qui précipite dans le lait quand le pH atteint 4,6. C'est une substance hétérogène même si elle a longtemps été considérée comme une protéine pure et homogène en raison de la stabilité de sa composition élémentaire (**DEBRY, 2001**).

3.3.2. Les protéines du lactosérum représentent 15% à 28 % du lait de vache et 17 % des matières azotées. Elles demeurent en solution dans le sérum isoélectrique obtenu à pH = 4,6 à 20°C ou dans le sérum présure exsudé par le coagulum formé lors de l'emprésurage (**DEBRY, 2001**).

3.4. Glucides

La majeure partie des glucides présents dans le lait se trouve sous forme de lactose, avec une proportion des autres glucides généralement très faibles. Le lactose est un disaccharide réducteur spécifique du lait, car sa synthèse a lieu dans la glande mammaire (**DEBRY, 2001**). Il joue un rôle important dans l'assimilation du calcium et dans le maintien d'une flore intestinale saine. Son absorption dépend de l'enzyme lactase, qui peut être déficiente chez certains adultes, ce qui peut expliquer les difficultés de digestion du lait chez ces individus (**FREDOT, 2006**).

3.5. Minéraux

La teneur en minéraux dans le lait, mesurée après incinération, oscille généralement entre 0,60% et 0,90 %. Ces minéraux se présentent sous différentes formes, principalement des sels, des bases et des acides. En plus des éléments minéraux, le lait peut contenir des composés tels que le soufre présent dans les protéines, ainsi que des oligo-éléments comme le manganèse, le cobalt, le titane et le lithium, présents à des concentrations très faibles ou à l'état de traces (**VIGNOLA, 2002**).

Cette composition minérale peut connaître des variations significatives en fonction des saisons et de l'alimentation des vaches (**VIGNOLA, 2002**).

Les minéraux du lait ne sont pas exclusivement sous la forme de sels solubles (molécules et ions) ; une partie importante se trouve dans la phase colloïdale insoluble (micelles de caséine) (**DEBRY, 2001**).

3.6. Vitamines

Ce sont des molécules complexes qui ont une taille beaucoup plus faible comparé aux protéines, et des structures très variées. Elles ont un lien étroit avec les enzymes car elles jouent un rôle de coenzyme associée à une apoenzyme protéique. Les vitamines sont classées en 2 grande catégories : Les vitamines hydrosolubles (vitamines du groupe B et vitamine C) de la phase aqueuse du lait, et les vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) associées à la matière grasse dont certaines sont au centre du globule gras et d'autres à sa périphérie (**DEBRY, 2001**).

3.7. Enzymes

Le lait renferme une diversité d'enzymes provenant de divers organes, du sang et, principalement, des cellules sécrétoires de la glande mammaire. Ces enzymes sont présentes à la fois dans le lait écrémé et dans la crème, et sont parfois associées à la caséine ou à la membrane des globules gras. L'activité enzymatique du lait est influencée par différents facteurs tels que la période de lactation, la saison, la race, l'alimentation et la santé de la mère. Elles peuvent également servir d'indicateurs pour certaines technologies laitières. Environ 60 enzymes principales ont été identifiées dans le lait, dont 20 sont des composants endogènes (**BLANC, 1982**).

Ces enzymes peuvent jouer différents rôles en fonction de leurs propriétés (**GOT,1971**) :

- Lyse des constituants originels du lait ayant des conséquences importantes sur le plan technologique et sur les qualités organoleptiques du lait (lipases, protéases).
- Protection du lait par effet antibactérien (lactoperoxydases et lysozymes)
- Indication de plusieurs aspects de la qualité du lait en révélant des informations :

- Sur l'hygiène, car certaines enzymes sont produites par les bactéries et les leucocytes.
- Sur le traitement thermique, car des enzymes telles que la phosphatase alcaline, la peroxydase et l'acétyl estérase sont sensibles à la chaleur.
- Sur l'origine, car des enzymes peuvent être utilisées pour distinguer différentes espèces de lait ; le test de la xanthine-oxydase met détecte la présence de lait de vache dans du lait de chèvre.

4. Propriétés physiques du lait

4.1. Masse volumique et densité

La masse volumique est le poids d'une substance par unité de volume, exprimée le plus souvent en g/mL ou en Kg/L. S'agissant d'une propriété physique qui varie selon la température, il est souvent utilisé la densité relative (densité) pour diminuer l'effet de ce paramètre. La densité est déterminée selon la formule suivante :

$$d_T^T = \frac{m.v. \text{ d'une substance à une température } T}{m.v. \text{ de l'eau à une température } T}$$

Où : d_T^T = densité relative.

$m.v.$ = masse volumique.

T = température.

En pratique, la masse volumique de l'eau est de 1,000 g/mL à 4°C et de 0,99823 g/mL à 20°C (VIGNOLA, 2002).

La densité du lait, D 20/20, est le rapport des masses d'un même volume de lait et d'eau à 20°C. Elle est influencée par sa composition, notamment par son taux de matière grasse et sa teneur en matière sèche dégraissée. Ainsi, la densité du lait est similaire à celle de son composant le plus abondant, à savoir l'eau, soit environ 1.000 g/mL, mais augmente avec sa richesse en matière sèche dégraissée (ou solides non gras, ou SNG) à densité supérieure à 1, et diminue pour se rapprocher de 0,926 g/mL lorsque s'accroît son taux butyreux car la

matière grasse est le seul constituant qui possède une densité inférieure à 1 (**MATHIEU, 1997**).

Par conséquent, un écrémage du lait augmentera sa densité et un mouillage la diminuera (**VIGNOLA, 2002**).

4.2. Point de congélation

Le point de congélation du lait est légèrement inférieur à celui de l'eau car la présence de solides dissous réduit le point de congélation. Il peut varier de $-0,530^{\circ}\text{C}$ à $-0,575^{\circ}\text{C}$ avec une moyenne de $-0,555^{\circ}\text{C}$. Un point de congélation supérieur à $-0,530^{\circ}\text{C}$ indique un mouillage. Ce paramètre peut être vérifié par cryoscopie (**VIGNOLA, 2002**).

4.3. Point d'ébullition

Le point d'ébullition est légèrement supérieur à celui de l'eau, soit $100,5^{\circ}\text{C}$. Cette propriété physique qui diminue avec la pression, est appliquée dans les procédés de concentration du lait (**VIGNOLA, 2002**).

4.4. PH et acidité

Le lait frais a un pH de 6,7. Son acidité, de l'ordre de 16°D , est équivalente à 1,6 g d'acide lactique par litre. Le pH et l'acidité évoluent avec la composition en substances acides représentées dans le lait par les protéines, les anions phosphate et citrate, ainsi que l'acide lactique (**MATHIEU, 1997**).

5. Valeur nutritionnelle du lait

Le lait constitue une source presque complète de nutriments essentiels à la croissance des jeunes mammifères. Un litre de lait bovin contient environ 50 g de lactose, 32 g de protéines et 40 g de matières grasses. Les protéines sont riches en résidus d'acides aminés essentiels et des minéraux d'intérêt nutritionnel (calcium et phosphore) sous forme organique et minérale facilement assimilable par l'organisme. Le potentiel énergétique d'un litre de lait varie selon qu'il est entier, demi-écrémé ou écrémé, avec 2720 KJ 2090 KJ et 460 KJ, respectivement. Cependant, le lait n'est pas un aliment complet, car carencé en fer et en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) (**JEANTET *et al.*, 2008**).

6. Qualité organoleptique du lait

6.1. La couleur

Le lait est blanc opaque ; cette couleur plus ou moins accentuée est principalement attribuable aux matières grasses, aux pigments caroténoïdes (issus de la conversion du β -carotène en vitamine A par la vache, qui se retrouve ensuite présente dans son lait), à la caséine et à la vitamine B2 (FREDOT, 2006).

6.2. L'odeur

Une des spécificités du lait réside dans sa capacité à capturer des odeurs animales grâce à sa teneur en matière grasse. Ces odeurs sont intimement liées à l'environnement de la traite, à l'alimentation des animaux et aux conditions de conservation du lait (FREDOT, 2006).

6.3. La saveur

Le goût du lait peut changer en fonction de la température à laquelle il est consommé et de ce que l'animal a mangé (FREDOT, 2006).

7. Microbiologie du lait

Le lait, avec sa combinaison riche en glucides, en protéines, en lipides, en vitamines et en sels minéraux, est un aliment hautement nutritif. Cependant, il peut poser un risque pour les consommateurs lorsqu'il contient des agents zoonotiques et des résidus de substances antimicrobiennes. La qualité du lait peut être altérée par divers facteurs, notamment l'adultération, les contaminations pendant et après la traite, ainsi que les infections mammaires (AGGAD *et al.*, 2009).

7.1. Principaux micro-organismes du lait

Les micro-organismes présents dans le lait peuvent être classés en deux grandes catégories en fonction de leur importance : la flore indigène, appelée aussi flore originelle, et la flore de contamination. Cette dernière est ensuite divisée en deux sous-catégories distinctes : la flore d'altération et la flore pathogène (VIGNOLA, 2002).

7.1.1. Flore indigène

Cette catégorie est constituée de l'ensemble des micro-organismes présents dans le lait immédiatement après la traite. Dans cette flore, les genres microbiens prédominants sont principalement des mésophiles. Il lui est associée aussi une flore naturelle qui confère au lait une protection ; elle est composée de ferments lactiques tels que *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* (**Tableau n°01**), qui partagent la capacité de fermenter le lactose en acide lactique (**BRISABOIS *et al.*, 1997 ; VIGNOLA, 2002**).

Tableau n°01 : La flore indigène du lait cru (VIGNOLA, 2002).

Micro-organismes	Pourcentage (%)
<i>Micrococcus</i>	30-90
<i>Lactobacillus</i>	10-30
<i>Streptococcus</i> et <i>Lactococcus</i>	< 10
Autres micro-organismes à Gram négatif	< 10

7.1.2. Flore de contamination

Cette catégorie englobe tous les micro-organismes qui contaminent le lait, depuis sa collecte jusqu'à sa consommation. Se distinguent, une flore d'altération, responsable des défauts sensoriels ou de réduction de la durée de conservation des produits, et une flore pathogène présentant des risques pour la santé du consommateur (**VIGNOLA, 2002**).

7.1.2.1. Flore d'altération

La flore d'altération entraîne des défauts sensoriels qui concernent le goût, l'arôme, l'apparence et la texture. Les principaux micro-organismes responsables de ces altérations sont : *Pseudomonas.*, *Proteus*, les coliformes, notamment les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les bactéries sporulées telles que *Bacillus*, ainsi que certaines levures et moisissures (**St-GELAIS *et al.*, 1999**).

7.1.2.2. Flore pathogène et Sources de contamination du lait cru

La contamination microbiologique du lait et des produits laitiers par la suite, peut se produire à diverses étapes de sa production, que ce soit au niveau de la vache elle-même, pendant la traite, ou lors du stockage dans les réservoirs. Les bactéries présentes dans le lait y compris *Pseudomonas* peuvent avoir deux sources (**Figure n°01**) :

- Une origine endogène (à l'intérieur du pis) : le lait d'une vache en bonne santé ne contient pas de bactéries nocives. Cependant, une vache malade peut introduire des bactéries dangereuses dans son lait où la contamination provient de l'intérieur de la mamelle, comme lors de mammites cliniques à *Pseudomonas aeruginosa* chez les ruminants. Leur diagnostic ne peut se faire que par examen bactériologique du lait (**BRUYERE et al., 2014**).
- Une origine exogène : les bactéries se trouvent naturellement sur la peau des trayons ainsi que dans l'environnement de la ferme, comme le fumier, le sol, la litière et l'eau. Tout ce qui entre en contact avec l'extrémité des trayons peut potentiellement transférer des bactéries dans le lait pendant la traite (**GUY, 2006 ; BRUYERE et al., 2014**).

Après la traite : les principaux facteurs contribuant à une numération bactérienne élevée dans le lait de citerne sont l'équipement laitier, le refroidissement du lait et le stockage du lait. Les causes les plus courantes de contamination par les équipements comprennent :

- Les bactéries qui se développent et persistent lorsque des résidus s'accumulent sur l'équipement en raison de pratiques de lavage et d'assainissement insuffisantes.
- ✓ La croissance bactérienne est facilitée par un refroidissement inapproprié et un stockage du lait à des températures qui ne sont pas optimales.
- ✓ La présence d'eau de lavage contaminée peut potentiellement introduire des contaminants dans l'équipement.

L'usure ou le dysfonctionnement de l'équipement peut également présenter des risques (**MOLGAT et KURBAN, 2023**).

Parmi les bactéries pathogènes, certaines ne se développent pas significativement dans le lait et sont présentes à des concentrations faibles lorsqu'elles sont détectées, à l'exemple de *Mycobacterium bovis*, *Brucella*, *Salmonella*, ...etc. D'autres bactéries, en revanche, se multiplient facilement dans le lait et sont présentes à des concentrations plus élevées, telles que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, ...etc. (GUY, 2006).



Figure n°01 : Illustration de l'origine des bactéries contaminant le lait durant les différents stades de sa production (MOLGAT et KURBAN, 2023).

Chapitre 02

Le genre Pseudomonas

1. Généralités

Découvert en 1894 par WALTER MIGULA, le genre *Pseudomonas* est le groupe hétérogène le plus important sur le plan écologique de bactéries connues sous forme de bâtonnets aérobies stricts à Gram négatif. Non exigeant, il est répandu dans la nature et se caractérise par une grande polyvalence du métabolisme grâce à un système enzymatique complexe. Les *Pseudomonas* se trouvent souvent dans des zones humides, où ils peuvent se développer sous forme de biofilms en se fixant aux surfaces ; ils ont été retrouvés dans des habitats naturels tels que le sol, l'eau douce et la mer.

En outre, ils font partie du microbiote habituel du tractus intestinal, et ont été isolés de sujets cliniques, de solutions aseptiques, de cosmétiques et de produits médicaux (FRANZETTI et SCARPELLINI, 2007). Les *Pseudomonas* sont d'un grand intérêt car ils sont associés aux maladies des plantes, des animaux et de l'homme, et leur potentiel dans les applications biotechnologiques est croissant (MENA *et al.*, 2009).

2. Classification

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonaceae*, et comprend une soixantaine d'espèces. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *Pseudomonas fluorescens*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars. Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols et les eaux, plusieurs souches sont des pathogènes opportunistes pour l'homme et des agents d'altération des viandes, poissons et produits laitiers. Les espèces les plus fréquemment rencontrées chez l'homme sont *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. stutzeri*. Le groupe de *Pseudomonas* se compose de bactéries sous forme de bâtonnets, à Gram négatif, mobiles par ciliature polaire (sauf *P. mallei*) qui lui est immobile, non sporulants, aérobies obligatoires et ne fermentent jamais le glucose (KRIEG *et al.*, 1984 ; PALLERONI, 1984 ; HOLT *et al.*, 1994).

Les bacilles à Gram négatif ne fermentant pas le glucose, dont beaucoup appartenait autrefois au genre *Pseudomonas*, sont divisés en plusieurs familles et genres. Leur statut taxonomique, qui a connu de nombreuses évolutions, repose aujourd'hui sur des données

phénotypiques (caractéristiques habituelles ou nutritionnelles) et génotypiques (composition en bases d'ADN, hybridation ADN-ADN, séquençage de l'ARNr 16S) (MONTEIL *et al.*, 2002).

Les *Pseudomonas* sont classés selon la hiérarchie suivante (KRIEG *et al.*, 1984 ; PALLERONI, 1984 ; HOLT *et al.*, 1994) :

1. Règne : *Bacteria*

- Embranchement : *Prokaryota*
- Division : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*
- Famille : *Pseudomonadaceae*
- Genre : *Pseudomonas*
- Espèces : *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. pertucinogena*.

Le genre *Pseudomonas* est composé de deux lignées (**Figure n°02**) :

La lignée *P. aeruginosa* composée de 4 groupes (orange) dont le groupe *aeruginosa* qui regroupe les espèces *aeruginosa*, *otitidis*, *composti*, *alcaligenes*, *pseudoalcaligenes*, *delhiensis*, *citronellolis*, *knackmussii*, *jinjuensis*, *panipatensis*, *nitroreducens*, *thermotolerans*, *resinovorans*, *cuatrocieneegasensis* et *tuomuerensis*.

La lignée *P. fluorescens*, composée de 7 groupes (vert) dont le groupe *P. fluorescens* et 9 sous-groupes (bleu), dont le sous-groupe *P. fluorescens* comprenant 20 espèces dont *P. fluorescens* (violet) (MONTEIL *et al.*, 2002 ; BALESWARAN, 2023).

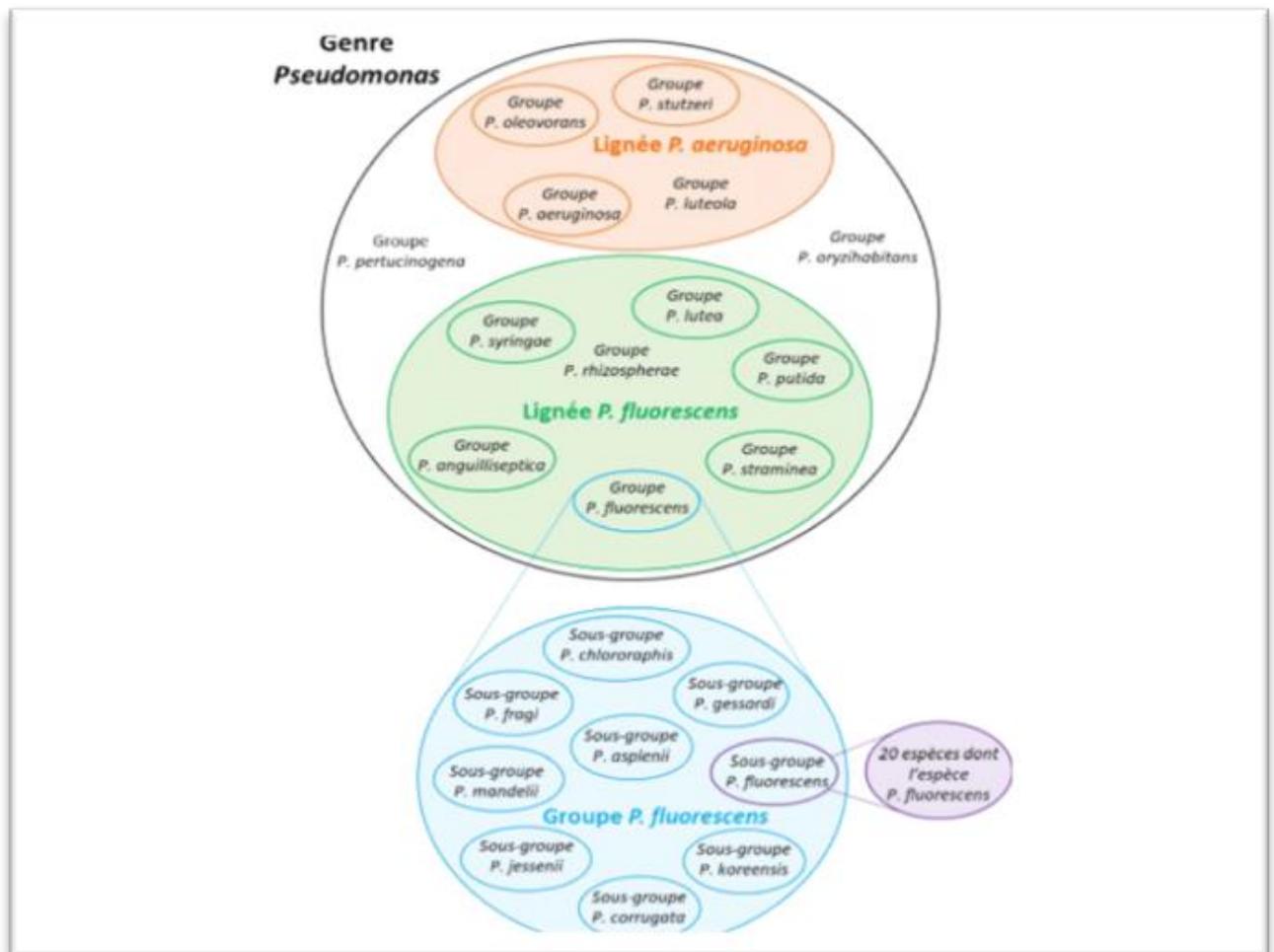


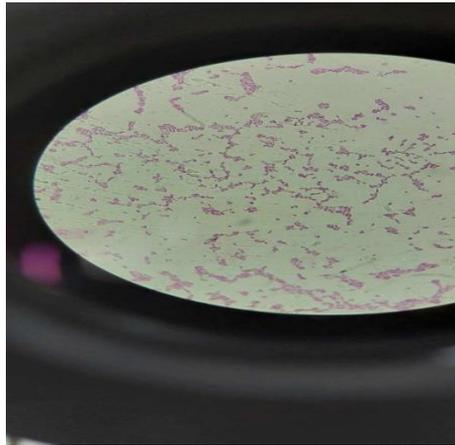
Figure n°02 : Représentation schématique des lignées, groupes et sous-groupes du genre *Pseudomonas* (BALESWARAN, 2023).

3. Caractères bactériologiques

3.1. Morphologie

Pseudomonas est un bacille à Gram négatif, droit ou légèrement courbé avec 0,5 à 1,0 μm de diamètre et 1,5 à 5,0 μm (ou plus) de longueur, non sporulé, qui se déplace souvent grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (GARITTY, 2005).

Les bacilles, en général isolés ou en petits amas (**photographie n°01**), sont plus longs et plus minces que les *Enterobacteriaceae*, mais ont une apparence similaire à celle des autres bactéries non fermentantes. Ils sont légèrement pléomorphes ; des formes longues peuvent apparaître dans les cultures anciennes, et *P. putida* peut paraître allongé (GARRITY, 2005).



Photographie n°01 : Aspect microscopique des bacilles de *Pseudomonas aeruginosa* après coloration de Gram (x100) (photo personnelle).

Les caractéristiques morphologiques utilisées pour distinguer les membres du genre *Pseudomonas* des autres espèces aérobies est le fait que *Pseudomonas* est le premier incapable d'accumuler des particules intracellulaires de poly- β -hydroxybutyrate (PHB) lorsqu'il est cultivé dans un milieu à faible teneur en azote à diverses sources de carbone (**PALLERONI, 1984**).

En plus de son pigment bleu-vert dit pyocyanine, *P. aeruginosa* contient également de la pyoverdine qui, une fois combinée, crée une teinte verte fluorescente (**Figure n°03**). Certaines souches de *P. aeruginosa* ne produisent que de la pyoverdine, ce qui rend difficile leur distinction des cinq autres *Pseudomonas* fluorescentes (*P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. simiae*, *P. syringae*). D'autres souches ont la capacité de produire des pigments diffusibles tels que la pyomélanine, de couleur brun noir, et la pyorubine de couleur rouge.

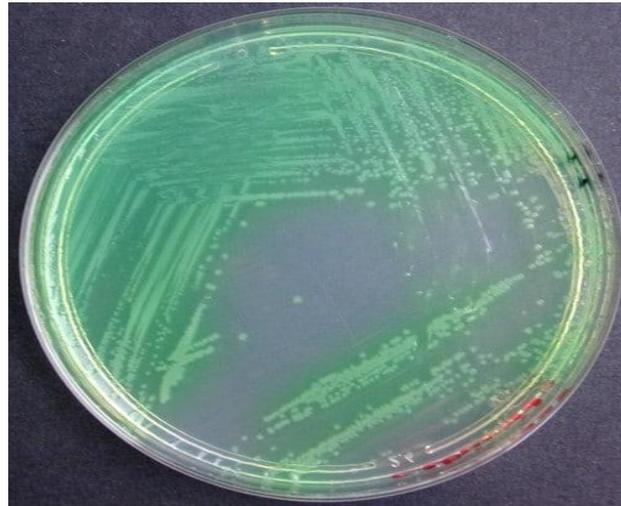


Figure n°03 : Pigmentation verte fluorescente de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose à la cétrimide (FRAPERIE et MARIELLE, 2024).

3.2. Structure

3.2.1. Structure générale

La structure générale de *Pseudomonas* ressemble aux modèles classiques de bactéries à Gram négatif ; les cellules étant délimitées par deux membranes phospholipidiques, le cytoplasme et la membrane externe, avec l'espace périplasmique interposé entre eux.

La membrane cytoplasmique contient diverses enzymes, notamment celles qui assurent la phosphorylation respiratoire et oxydative, ainsi que les protéines de liaison à la pénicilline (Penicillin Binding Protein, PBP).

De nombreuses enzymes, synthétisées dans l'espace périplasmique, peuvent traverser la membrane externe et fonctionner à l'extérieur de la cellule, telles que les protéases, ou comme les bêtaxalases, rester dans l'espace périplasmique.

La membrane externe des phospholipides contient un énorme complexe macromoléculaire, le lipopolysaccharide (LPS) et de nombreuses protéines. Des flagelles, généralement, polaires et des pili émergent de cette membrane externe.

Le flagelle est un organe multiprotéique complexe. Il représente l'annexe la plus importante pour la motilité des bactéries à Gram négatif, et intervient dans la pathogenèse bactérienne ; les mutants sans flagelles ont ainsi une virulence réduite (SHINODA et OKAMOTO, 1977 ; HICHEM, 2012). En plus des flagelles polaires, des flagelles latéraux

de courte longueur peuvent être produits par des souches de certaines espèces (*P. stutzeri*, *P. mendocina*) et sont excrétés plus facilement que les flagelles polaires ; en effet, la croissance de ces souches sur supports solides favorise la formation de flagelles latéraux, ce qui suggère leur implication dans l'essaimage de la population sur des terrains à surfaces solides (SHINODA et OKAMOTO, 1977). Les souches de *P. aeruginosa* possèdent une flagellation monotriche polaire (HICHEM, 2012).

Les pili, de type IV chez *P. aeruginosa*, sont de longs organites filamenteux qui se trouvent à la surface de beaucoup de bactéries pathogènes. Ces appendices superficiels et polaires, qui existent en plusieurs copies, mesurent 6 nanomètres de diamètre et peuvent atteindre plusieurs microns de longueur, soit plus fins que les pili des bactéries entériques. Ils agissent comme récepteurs de divers phages et sont rétractiles (BRADLEY, 1972 ; JAIN *et al.*, 2011), mais les pili de *P. aeruginosa* n'ont pas tous la propriété de se retirer dans la cellule (BRADLEY, 1974).

Le flagelle et les pili de type IV confère à *P. aeruginosa* deux modes de vie distincts : un mode de vie planctonique où la bactérie est mobile grâce à ces deux éléments structuraux, et un mode de vie communautaire qu'elle adopte dans certaines conditions et où elle perd sa mobilité pour se regrouper sous forme de biofilms. Les biofilms sont des organisations particulières qui pouvant se former sur des surfaces inertes ou vivantes ; très difficiles à éradiquer, ils sont constitués de populations bactériennes, mixtes ou uniques, entourées d'une matrice d'exopolysaccharides, appelée glycocalyx, qui représente 85% de son volume total, et lui permet de renforcer sa structure et de la protéger (JAIN *et al.*, 2011).

3.2.2. Structure génétique

Le génome de *P. aeruginosa* est une mosaïque d'un noyau conservé et de segments accessoires variables (RAMOS, 2006). Le génome central est caractérisé par une synténie conservée de gènes, une faible divergence moyenne de nucléotides de 0,5% et de multiples allèles en quelques loci soumis à une sélection diversifiée (SMITH *et al.*, 2005 ; RAMOS, 2006). Le génome accessoire se compose d'un ensemble variable d'îlots génomiques dont la plupart appartiennent à un ancien type d'îlot intégré à l'ARNt. La taille du génome varie de 5,2 à 7 Mbp dans la population (RAMOS, 2006).

P. aeruginosa est doté de nombreux plasmides, qui peuvent être transférés soit par conjugaison, soit par transduction par l'intermédiaire d'un phage. Ces plasmides gouvernent la résistance aux antibiotiques (**BARBIER et WOLFF, 2010**).

Des gènes codants pour la résistance à une série d'antibiotiques ont aussi été trouvés dans des transposons situés sur le chromosome pouvant passer du chromosome à divers plasmides. La résistance induite est donc transférable d'une bactérie à l'autre, ces variations génétiques peuvent modifier les avantages sélectifs de diverses souches de bacille pyocyanique dans un environnement donné (**PALLERONI, 1984**).

La différenciation du genre *Pseudomonas* des autres genres a été établie par l'étude des propriétés qui distinguent les espèces aérobies du genre *Pseudomonas* d'autres phénotypes de bactéries aérobies à Gram négatif, non sporulées similaires. De nombreuses expériences ont tenté de démêler la complexité phylogénétique suspectée dans le genre *Pseudomonas*. Parmi ces expériences, l'hybridation ARNr-ADN suggèrent clairement une subdivision interne de *Pseudomonas* en cinq groupes d'ARNr qui « *semblaient être très éloignés les uns des autres sur le plan phylogénétique, méritant au moins un genre indépendant, et éventuellement une affectation familiale ou d'ordre* ». L'un de ces groupes, qui comprenait l'espèce type, *P. aeruginosa* (ARNr du groupe I), a conservé le nom du genre (**PALLERONI, 1973**).

3.2.3. Structure antigénique

Les souches de *P. aeruginosa* produisent deux types distincts d'antigène O (Ag O) : un antigène polysaccharidique commun (bande A) composé d'un homopolymère de D-rhamnose et un Ag O spécifique (bande B) composé d'un hétéropolymère de trois à cinq sucres distincts dans ses unités répétitives. Jusqu'à présent, les isolats de *P. aeruginosa* ont été classés en 20 sérotypes par l'International Antigenic Typing Scheme (IATS) (**TANG et al., 2015**).

L'antigène H (Ag H) ou antigène flagellaire est formé par la partie protéique externe des flagelles composés d'au moins 55 antigènes (**BERCHE et al., 1989**).

D'autres antigènes sont représentés par les pili, les porines et l'exotoxine A, ainsi que le LPS qui est moins toxique chez *Pseudomonas* que chez les autres bâtonnets à Gram

négatif ; cette particularité facilite l'établissement d'infections chroniques en provoquant une faible réponse inflammatoire (**BERCHE *et al.*, 1989**).

3.3. Caractères cultureux

Pseudomonas est un micro-organisme non exigeant ; il peut être cultivé sur substrats non enrichis. Pour isoler ce microbe à partir d'échantillons multiples, on peut simplifier cette étape en utilisant des milieux spéciaux sélectifs, la plupart des espèces sont psychrotrophes. Ils peuvent croître entre 4 à 5°C (voire moins) jusqu'à 42 à 43°C avec un optimum de 30°C. Par contre, il supporte de moindres variations de pH, seulement de 6,5 à 7,5, avec un pH optimal de 7,2. Bien qu'aérobie strict, *Pseudomonas* est capable d'utiliser les nitrates en conditions d'anaérobiose (**LABADIE *et al.*, 1996 ; PALLERONI, 1984 ; EUZEBY, 2007**).

Les colonies apparaissent en 24 heures et développent une forme plate avec des bords irréguliers et un aspect irisé. Qui devient métallique avec le temps. Le pigment vert brillant et diffusible est caractéristique de l'espèce *fluorescens*. La fluorescéine est une combinaison de pyoverdine qui est commun aux espèces du groupe fluorescent, et de pyocyanine qui est le pigment bleu unique à *P. aeruginosa* d'où l'appellation de bacille pyocyanique, cette combinaison donne la colorisation verte de la plaque de culture (**PALLERONI, 1984 ; MUHAMMED *et al.*, 2012**).

3.4. Caractères biochimiques

Les *Pseudomonas* sont des bactéries à métabolisme oxydatif, c'est à dire ayant recours à des réactions enzymatiques d'oxydo-réduction pour l'utilisation des nutriments comme sources de carbone et d'énergie (**AVRIL *et al.*, 2000**). Différentes caractéristiques biochimiques permettant de les différencier à l'échelle du genre et de l'espèce.

3.4.1. Production d'enzymes

Pseudomonas produit la cytochrome C oxydase d'où un test de l'oxydase positif, la nitrate réductase et la nitrite réductase permettant la réduction des nitrates (NO₃) en monoxyde d'azote (NO) puis en azote (N₂), ainsi que l'arginine déshydrogénase d'où un teste l'ADH positif (**AVRIL *et al.*, 2000**).

3.4.2. Production d'ortho-aminoacétophénone

P. aeruginosa dégage une odeur aromatique caractéristique de raisin qui est due à la production d'ortho-aminoacétophénone, un intermédiaire du métabolisme du tryptophane ; cette odeur n'est pas liée à la production de pigments (AVRIL *et al.*, 2000 ; MUHAMMAD *et al.*, 2012).

3.4.3. Production de pigments

Pseudomonas peut produire des pigments qui diffusent dans les milieux de culture. Deux types de pigments peuvent être synthétisés : des pigments fluorescents appelés pyoverdines, et des pigments phénaziniques non fluorescents appelés pyocyanines.

➤ La pyoverdine

La pyoverdine est le terme générique d'une vaste famille de pigments jaunes-verts fluorescents, solubles dans l'eau et insolubles dans le chloroforme. Leur structure générale est celle d'un chromophore quinolinique associé à des peptides dont la taille et la composition en acides aminés sont variables ; le peptide étant une chaîne de 6 à 12 acides aminés (Figure n°04) (GIRARD, 2020).

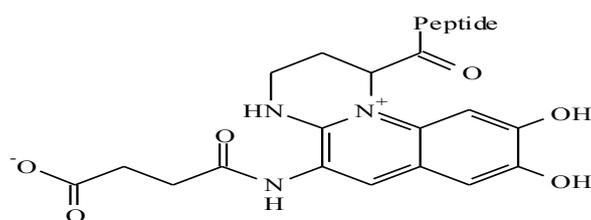


Figure n°04 : Structure générale des pyoverdine (GIRARD, 2020).

La production ou l'absence de production de pyoverdines permet de classer les espèces du genre en deux groupes (GIRARD, 2020).

Pseudomonas du groupe fluorescent. Exemples : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. plecoglossidica*, *P. simiae*, *P. syringae*.

Pseudomonas du groupe non-fluorescent. Exemples : *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. fragi*, *P. mendocina*, *P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*.

➤ **La pyocyanine**

La pyocyanine est le principal pigment phénazinique produit par certaines souches de *Pseudomonas*. Les pigments phénazinique représentent une famille de molécules composées d'un noyau insaturé polycyclique entre deux noyaux benzène (**Figure n°05**).

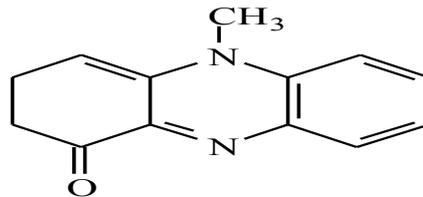


Figure n°05 : Structure générale des pyocyanines (GIRARD, 2020).

La pyocyanine est soluble dans le chloroforme, joue, *in vivo*, le rôle de transporteur d'électrons dans des conditions d'anaérobiose, et possède une activité bactériostatique sur diverses bactéries, surtout à Gram positif. En solution aqueuse, elle est bleue. C'est en fait un indicateur de pH ; la couleur est rouge en milieu acide (pH = 3 environ) et bleue en milieux neutre et alcalin. Chez les *Pseudomonas*, les principales espèces produisant la pyocyanine sont *P. aeruginosa*, *P. cepacia* et *P. aureofaciens* (**GIRARD, 2020**).

➤ **La fluorescéine**

C'est un pigment jaune-vert fluorescent sous lumière ultra-violette, produit par certains *Pseudomonas*. Le milieu King B est utilisé principalement dans l'analyse de l'eau pour la détection et la différenciation de *Pseudomonas aeruginosa* qui produit ce pigment fluorescent (**KING et al., 1954**).

➤ **Pyomélanine**

C'est un pigment brun noir ou acajou produit par certaines souches de *Pseudomonas* (**JEANNOT et GUILLARD, 2019**).

➤ **Pyorubine**

D'autres souches élaborent un pigment rouge dit aeruginosine ou pyorubine (**JEANNOT et GUILLARD, 2019**).

4. Facteurs de virulence de *Pseudomonas*

Pseudomonas est une bactérie opportuniste peu ou pas virulente chez l'individu sain mais qui peut s'avérer redoutable chez les sujets dont l'immunité est affaiblie. Son génome lui permet de s'adapter aux environnements hostiles et d'infecter divers hôtes dont l'homme grâce à ses facteurs de virulence (**Anonyme, 2011**).

Grâce à l'action synergique de trois systèmes de communication inter-cellulaires, la bactérie peut activer une cascade complexe de régulation conduisant à la production simultanée de plusieurs facteurs de virulence au niveau du site infectieux, lorsqu'une certaine densité de population est atteinte. Ce type de régulation globale est appelé quorum sensing. La virulence de *P. aeruginosa* liée au *quorum sensing* a été démontrée dans un grand nombre de modèles animaux (**DE BENTZMANN et PLESIAT, 2011**).

Deux classes de facteurs peuvent être distinguées (**Figure n°06**). La première classe correspond aux facteurs sécrétés comme les toxines et les protéases. La deuxième classe est celle des facteurs associés à la membrane de la bactérie comme le flagelle et les pili, cités précédemment et qui sont principalement impliqués dans l'adhérence et la motilité. Ces facteurs concourent à la pathogénicité par des actions complémentaires, sans qu'aucun d'entre eux ne soit décisif dans le processus physiopathologique ; on parle de virulence multifactorielle combinatoire (**PALLERONI, 2015**).

Nous citerons les principaux parmi ces facteurs

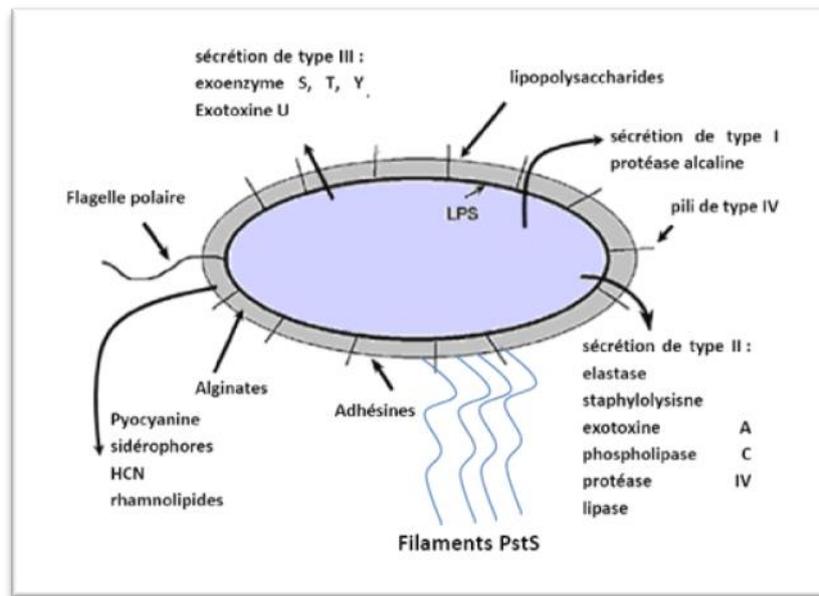


Figure n°06 : Principaux facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* et voies de sécrétion (COURNOYER *et al.*, 2010).

4.1. Le système de sécrétion de type III (T3SS)

Le T3SS joue un rôle majeur dans l'infection. Il s'agit d'un appendice en forme de seringue qui permet à la bactérie d'injecter des exotoxines directement dans le cytoplasme des cellules cibles. Au nombre de 4 (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY), elles vont induire des modifications importantes dans le fonctionnement des cellules cibles (PALLERONI, 2015).

4.2. Les rhamnolipides

Ce sont des glycolipides ayant des propriétés détersives. Secrétés par la bactérie à un stade tardif de sa croissance, ils lysent les érythrocytes et les leucocytes en agissant sur leur membranes (PALLERONI, 2015).

4.3. Elastase LasB

C'est une métallo-peptidase à large spectre capable de dégrader les peptides antimicrobiens de l'hôte (cathélicidine LL-37, pro-protéine hCAP18) et certains composés de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et les collagènes de types 3 et 4 (PALLERONI, 2015).

4.4. Les pigments

L'expression des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* est renforcée par la synthèse pigmentaire. La pyoverdine est impliquée dans l'acquisition du fer, tandis que la pyocyanine interfère avec le système immunitaire ; les souches productrices de pyocyanine sont plus virulentes et plus résistantes à de nombreux médicaments que les souches non productrices de pyocyanine (CLAVE, 2011).

5. Habitat

Pseudomonas est une bactérie courante présente partout dans l'environnement. C'est un saprophyte qui a la capacité de prospérer dans divers milieux, notamment le sol, les zones humides et même l'eau distillée ou salée. Son adaptabilité lui permet de survivre dans ces conditions (Anonyme, 2011).

La présence de bacilles pyocyanique originaires du sol, peut être détectée à la surface des produits frais. C'est pourquoi ces bactéries sont fréquemment observées dans le système digestif des individus, représentant environ 4% à 12% des sujets (JEANNOT et GUILLARD, 2019).

6. Pathogénie et manifestations

Chez les individus dotés d'un système immunitaire sain, le bacille pyocyanique ne constitue pas une menace significative. Néanmoins, lorsqu'il est exposé à de l'eau contaminée pendant la baignade, il peut potentiellement provoquer des infections bénignes au sein de la communauté (BRICHA *et al.*, 2009).

La vulnérabilité du système immunitaire de l'organisme, notamment des défenses cellulaires, expose à la présence de bactéries opportunistes. Cela est particulièrement vrai pour les personnes ayant subi une intervention chirurgicale et connaissant des problèmes de santé (CLAVE, 2011).

P. aeruginosa, bien qu'il ne soit pas spécifique à un tissu ou un organe particulier, constitue une menace pour les sujets atteints d'hémopathies malignes, de cancers solides, ou

de diabète, pour les greffés, ainsi que pour ceux en état de choc ou ayant subi des brûlures (FELDMAN *et al.*, 1998).

La durée d'incubation a une corrélation directe avec le pourcentage de patients colonisés par *P. aeruginosa* au niveau bronchique, entraînant un nombre important d'infections pulmonaires avec un taux de 18,1 % (CLAVE, 2011).

La bactériémie causée par *P. aeruginosa* est un phénomène rare, représentant seulement 5,8% des cas de bactériémie nosocomiale. Cependant, lorsqu'elle s'accompagne d'un choc endotoxinique, elle devient une maladie grave et potentiellement mortelle. Le taux de mortalité par bactériémie à *P. aeruginosa* avec choc endotoxinique est significativement élevé, allant jusqu'à 30% (GELLEN, 2010).

Pseudomonas est insidieux. Durant la lactation, les bactéries produisent peu d'inflammation et provoquent rarement des mammites cellulaires ou aiguës. Tant que la traite se fait deux fois par jour, elles restent basses dans la mamelle. Mais quand vient le temps de tarire, les choses deviennent sérieuses. Le germe étant résistant pour la plupart des antibiotiques, une fois que le processus de tarissement nettoie l'environnement immédiat en éliminant les staphylocoques et les streptocoques, *Pseudomonas*, s'il est présent, a la possibilité de se multiplier et de produire des toxine (BRUYERE *et al.*, 2014).

Chapitre 03

La résistance bactérienne aux antibiotiques

1. Généralités sur les antibiotiques

1.1. Définition

Tout élément chimique, qu'il soit produit par un organisme vivant ou synthétisé, possédant un haut potentiel chimio-thérapeutique, démontrant son efficacité thérapeutique à de très faibles doses en ciblant spécifiquement l'inhibition de processus vitaux chez les virus, les micro-organismes, voire même certains organismes multicellulaires (**SINGLETON, 2005**)

1.2. Classification

Selon leur origine, les antibiotiques sont classés en :

- **Antibiotiques naturels** : issus de micro-organismes tels que les champignons (pénicilline, céphalosporine et streptomycine) et les bactéries (chloramphénicol).
- **Antibiotiques synthétiques** : qui sont des produits purement chimiques tels que les sulfamides.
- **Antibiotiques semi-synthétiques** : qui sont produits à partir de molécules naturelles modifiées chimiquement (**FIGARELLA *et al.*, 2007**).

Selon leur spectre d'activité, les antibiotiques peuvent être à :

- **Large spectre** : actifs sur la plus part des bactéries à Gram positif ou négatif.
- **Spectre limité** : actifs sur les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif.
- **Spectre étroit** : actifs seulement sur des bactéries spécifiques à Gram positif ou sur certaines bactéries à Gram négatif (**FIGARELLA *et al.*, 2007**).

Selon leur structure chimique, les antibiotiques sont regroupés en différentes familles ; chaque famille étant composée de molécules présentant des similitudes structurales. Bien que ces composés partagent une activité antimicrobienne similaire, ils peuvent varier en termes de propriétés pharmacologiques ou de tolérance (**FIGARELLA *et al.*, 2007**).

Selon leur mode d'action, les antibiotiques sont classés en fonction de la cible bactérienne (paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines ou synthèse des acides nucléique) (FIGARELLA *et al.*, 2007).

1.3. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques se distinguent des antiseptiques par leurs mécanismes d'action respectifs, notamment leurs interactions ciblées avec des structures bactériennes appelées sites d'action.

L'efficacité des antibiotiques est déterminée par l'interaction entre l'antibiotique et l'organisme de l'hôte, ainsi qu'entre l'antibiotique et la bactérie. Un antibiotique doit pénétrer jusqu'à sa cible bactérienne : ne pas être inactivé et capable de se lier à sa cible (BARBIER et WOLFF, 2010).

1.4. Notions de bactériostase et de bactéricidie

Lorsqu'une bactérie est exposée à un antibiotique sur une certaine période et à une concentration donnée, cela peut se traduire soit par un arrêt ou un ralentissement de sa croissance (bactériostase), soit par sa destruction complète (bactéricidie). La différenciation classique entre un antibiotique bactériostatique et bactéricide repose principalement sur le rapport entre la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), noté CMB/CMI.

Pour un antibiotique bactéricide, la CMI et la CMB sont généralement proches l'une de l'autre. Pour un antibiotique bactériostatique, la CMB est supérieure à la CMI, car la CMB peut atteindre des niveaux très élevés (Anonyme, 2022).

2. Résistance aux antibiotiques

2.1. Définition

La résistance d'un micro-organisme aux antibiotiques désigne sa capacité d'acquérir une résistance à l'action inhibitrice des antibiotiques auxquels il était généralement sensible (LE MINOR et VERON, 1990).

2.2. Types de résistance

2.2.1. La résistance naturelle : est la résistance inscrite dans le génome bactérien, ce qui la rend fixe et constante au sein de la lignée taxonomique. De ce fait, elle est utilisée comme un critère d'identification (**LE MINOR et VERON, 1990**).

2.2.2. La résistance acquise : est la résistance qui résulte de modifications génétiques chromosomiques ou plasmidiques. Elle n'affecte qu'un petit nombre de souches au sein d'une même espèce mais peut se propager. Elle sert de marqueur épidémiologique (**LE MINOR et VERON, 1990**).

2.3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les agents microbiens ont développé différents mécanismes pour se protéger contre l'effet des antibiotiques. Parmi ces stratégies défensives, les plus courantes sont :

- La réduction de la perméabilité pour limiter leur entrée.
- L'évacuation active des antibiotiques hors de la cellule.
- La production d'enzymes qui les rendent inactifs.
- La modification de la structure des cibles visées par les antibiotiques (**LE MINOR et VERON, 1990**).

2.4. Résistance de *Pseudomonas* aux antibiotiques

Pseudomonas est impliqué dans des infections opportunistes, principalement en milieu hospitalier. Il se caractérise par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques. Par conséquent, le nombre de molécules généralement efficaces contre ce bacille est limité. Par ailleurs, les résistances acquises aux antibiotiques sont très courantes, résultant de l'accumulation de mécanismes de résistance dus à des mutations chromosomiques et à l'acquisition de gènes étrangers (**BARBIER et WOLFF, 2010**).

2.4.1. La résistance naturelle de *Pseudomonas* aux antibiotiques

Pseudomonas montre une forte résistance naturelle aux antibiotiques de la famille des bêtalactamines (β -lactamines), y compris les pénicillines G, V, A, M, les céphalosporines de première et de deuxième génération (C1G, C2G), certaines céphalosporines de troisième génération (C3G), notamment la ceftriaxone et le céfotaxime, et l'ertapénem comme seul

carbapénème. Il est également naturellement résistant au triméthoprim, aux quinolones de première génération (Q1G : acide nalidixique), à la kanamycine et à la tétracycline. Par conséquent, les souches sauvages possèdent divers mécanismes de résistance à l'exemple du système d'efflux actif MexAB-OprM, produit de manière constitutive et qui joue un rôle important dans leur résistance naturelle à un large éventail de substances toxiques et d'antibiotiques, notamment les bêtalactamines et les aminosides (**BARBIER et WOLFF, 2010**).

2.4.2. La résistance acquise de *Pseudomonas* aux antibiotiques

C'est la conséquence d'une modification génétique par mutation ou par acquisition d'un gène étranger et aussi par une combinaison de mécanismes (**LE MINOR et VERON, 1990**).

2.4.2.1. Résistance acquise aux bêtalactamines

➤ Par synthèse de la céphalosporinase codée par le gène chromosomique *ampC*

La présence de la céphalosporinase inductible *ampC* chez *P. aeruginosa* est un élément important de sa résistance aux antibiotiques de la sous-famille des céphalosporines. Cette enzyme est codée par le gène chromosomique *ampC*.

La surproduction d'*ampC*, régulée de manière induite et réversible, rend *P. aeruginosa* résistant à la plupart des pénicillines, aux céphalosporines anti-*Pseudomonas* et à l'aztréonam.

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes (PAMR) présentent souvent une surproduction constitutive et irréversible d'*ampC*, résultant de la dérégulation due à des mutations dans le gène *ampC* ou dans ses gènes régulateurs, principalement *ampD*. Ce phénomène confère un profil de résistance similaire à celui observé avec une surproduction induite ; ces mutants dérégulés résistent à toutes les β -lactamines, à l'exception des carbapénèmes. Cette caractéristique rend souvent le traitement des infections à *P. aeruginosa* plus complexe, nécessitant parfois l'utilisation d'antibiotiques alternatifs ou de combinaisons d'antibiotiques pour obtenir une efficacité optimale (**BARBIER et WOLFF, 2010**).

➤ **Par synthèse de bêtalactamases**

Dans la plupart des cas, les β -lactamases sont des pénicillinases à spectre étroit qui ne dégradent que les carboxy- et les uréido- pénicillines, tandis que l'activité des inhibiteurs des β -lactamines comme le clavulanate et le tazobactam, ainsi que celle des céphalosporines, de l'aztréonam et des carbapénèmes, reste intacte. Cependant, il a été observé chez *P. aeruginosa* la présence de nombreuses β -lactamases à spectre élargi (BLSE) de classe A, ainsi que des souches produisant des carbapéménases, qui se propagent actuellement de manière préoccupante dans toutes les régions du monde (BARBIER et WOLFF, 2010).

➤ **Par imperméabilité aux carbapénèmes**

Le mécanisme principal de résistance aux carbapénèmes repose sur l'imperméabilité due à une mutation inactivatrice du gène *oprD* qui code pour la protéine D2. La perte de cette porine de la membrane externe entraîne une résistance significative à l'imipénème et une réduction variable de la sensibilité au méropénem et au doripénem. Cependant, cette mutation n'affecte pas l'efficacité des autres β -lactamines (BARBIER et WOLFF, 2010).

➤ **Par activation du système d'efflux**

Le système d'efflux implique une pompe (MexB), une lipoprotéine de liaison à la membrane (MexA), et la porine (OprM) à travers laquelle l'antibiotique est éliminé de la cellule. L'hyperexpression de MexAB-OprM conduit à une réduction de la sensibilité, voire à une résistance, à la ticarcilline, à l'aztréonam et au méropénem, bien que l'imipénème ne soit pas un substrat de la pompe MexB (BARBIER et WOLFF, 2010).

2.4.2.2. Résistance à la ciprofloxacine et aux aminosides

La résistance à la ciprofloxacine chez *Pseudomonas* est exclusivement d'origine chromosomique. Les mutations de *gyrA* semblent être suffisantes pour engendrer une résistance élevée. Les systèmes d'efflux actifs sont responsables d'une résistance de faible niveau, sauf en cas d'hyperexpression conjointe avec des mutations de *gyrA*.

Plusieurs aminoglycosides, tels que la tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la nétilmicine, sont fréquemment prescrits pour traiter les infections à *P. aeruginosa*. Cependant,

leur efficacité est souvent compromise par le développement de divers mécanismes de résistance chez cette bactérie (**BARBIER et WOLFF, 2010**).

2.4.2.3. Résistance à la colistine

Différents mécanismes de résistance à la colistine ont été découverts, dont l'un résulte de modifications des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe. Ces modifications entraînent une diminution de la charge négative de la membrane externe, ce qui conduit à une résistance à la colistine. De plus, une résistance plasmidique à la colistine, nommée la *mcr-1* (résistance mobile à la colistine), a été identifiée. Cette résistance peut altérer le site cible de la colistine en réduisant son affinité pour le lipide A du LPS grâce à l'ajout du phosphoéthanolamine. La première observation de la *mcr-1* a été rapportée en Chine en 2015 (**ZARATE et al., 2021**).

2.4.2.4. La multirésistance

Les souches PAMR présentent généralement une combinaison continue de plusieurs mécanismes de résistance, tels que l'efflux, l'imperméabilité, la modification du site d'action ou l'inactivation enzymatique (surproduction constitutive et irréversible d'*AmpC*). Ces différents mécanismes résultent de multiples événements génétiques tels que des mutations et/ou des transferts horizontaux de gènes de résistance. La pression sélective exercée par une ou plusieurs thérapies antibiotiques antérieures constitue le principal facteur de risque d'infection à PAMR (**BARBIER et WOLFF, 2010**).

Partie pratique

Matériel

et

Méthodes

Objectifs de l'étude

Notre étude qui porte sur la recherche de *Pseudomonas* dans le lait cru de vaches élevées dans les wilayas d'Alger et de Bouira, a pour objectifs :

- ✓ L'estimation de la prévalence de la contamination du lait par *Pseudomonas*.
- ✓ L'identification des espèces.
- ✓ La caractérisation antibiotypique des souches isolées.

1. Matériel et méthodes

1.1. Période et lieu de l'étude

L'étude, s'étalant du 19 novembre 2023 au 18 mars 2024, a été réalisée dans certains élevages bovins laitiers situés dans les wilayas d'Alger et de Bouira.

1.2. Echantillonnage

Au total, 30 échantillons de lait cru ont été prélevés dans 6 élevages différents de vaches laitières ; 15 échantillons proviennent de 2 élevages situés dans la commune de Rouiba (Alger) et 15 échantillons proviennent de 4 élevages implantés dans la commune de Mesdour (Bouira) (**Tableau n°02**).

Les deux élevages situés dans la wilaya d'Alger se distinguent par un nombre important de vaches laitières. Dans le premier élevage, la traite est mécanique, tandis que dans le second, elle est réalisée manuellement. Cependant, les deux élevages respectent rigoureusement les normes d'hygiène relatives à la traite.

Dans la wilaya de Bouira, les élevages visités se caractérisent par un petit effectif (entre 10 et 15), et les éleveurs y pratiquent la traite manuelle après avoir nettoyé les mamelles. Cependant, un manque d'hygiène de la traite a été particulièrement observé dans l'élevage N°4.

Tableau n°02 : Répartition des prélèvements du lait cru par wilaya et par élevage visité.

Wilaya	N° de l'élevage	Race	n	Total
Alger	1	Holstein	6	15
	2	Montbéliarde	9	
Bouira	3	Fleckvieh	2	15
	4	Montbéliarde	5	
	5	Montbéliarde	2	
	6	Brune de l'Atlas	6	

n : nombre de prélèvements.

Après nettoyage de la mamelle avec de l'eau tiède javellisée, l'essuyage à l'aide d'une chiffonnette et l'élimination des premiers jets, l'échantillon du lait individuel a été prélevé, de manière aseptique, directement dans des flacons stérile préalablement identifié (**Photographie n°02**). Les prélèvements, transportés dans une glacière munie de poches de glace jusqu'au laboratoire pédagogique d'HIDAOA, ont été analysés le jour même.



Photographie n°02 : Prélèvement individuel du lait par collecte manuelle (Photo personnelle).

1.3. Matériel

Le matériel de prélèvement, d'analyses microbiologiques et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques est listé en (**Annexe n°01**).

1.4. Méthodes

1.4.1. Recherche de *Pseudomonas* dans le lait cru

En l'absence de normes de référence pour la recherche de *Pseudomonas* dans le lait cru et les produits laitiers, la norme ISO 13720 (2010), qui spécifie la méthode de dénombrement de *Pseudomonas* spp. dans la viande et les produits à base de viande, a été utilisée avec quelques modifications.

1.4.1.1. Prise d'essai et enrichissement en milieu liquide non sélectif

Une quantité de 9 mL du diluant eau peptonée tamponnée (EPT) a été répartie dans des tubes à essai stériles à l'aide d'une pipette stérile en verre. Après identification des tubes, le milieu a été ensemencé avec 1 mL d'échantillon de lait, en utilisant une micropipette, puis homogénéisé au vortex (**Photographie n°03**). L'incubation a été effectuée à 25°C pendant 24h.

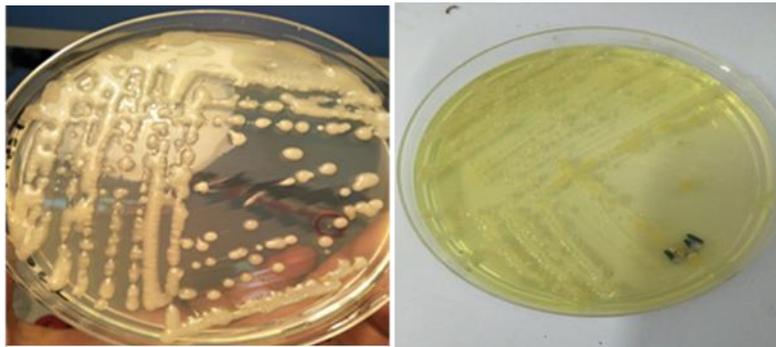


Photographie n°03 : Etape d'enrichissement du diluant (EPT) (Photo personnelle).

1.4.1.2. Isolement sur milieu sélectif solide

Nous avons utilisé la gélose à la cétrimide comme milieu d'isolement sélectif pour la détection de *Pseudomonas*. Une fois préparée dans des boîtes de Pétri, l'isolement a été effectué selon la technique d'ensemencement en stries à partir de la culture obtenue sur milieu d'enrichissement, en utilisant une anse de platine bouclée. L'incubation a été réalisée à 25°C pendant 24-48h.

Sur gélose sélective à la cétrimide, les colonies suspectes de *Pseudomonas* peuvent présenter plusieurs aspects. De forme globalement plate avec des bords irréguliers et un reflet irisé, qui devient métallique avec le temps (PALLERONI, 1984), les colonies peuvent aussi être bombées, d'aspect muqueux (colonies mucoïdes) d'où la brillance ; elles peuvent être pigmentées ou non (Photographie n°04).



Photographie n°04 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas* sur milieu à la cétrimide (Photo personnelle).

1.4.2. Identification de *Pseudomonas*

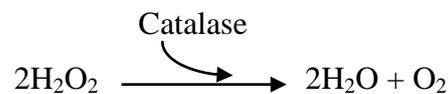
1.4.2.1. Purification des isolas

L'identification bactérienne nécessite des cultures pures et jeunes de 18-24h. À partir de la culture obtenue sur milieu gélosé à la cétrimide, les colonies présomptives et bien isolées de *Pseudomonas* ont été prélevées pour ensemencement de la gélose nutritive. L'incubation a été faite à 25°C pendant 24h.

1.4.2.2. Tests biochimiques métaboliques classiques d'orientation

- **Test de catalase**

Dans le cadre de leur processus de respiration aérobie, certaines bactéries génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un composé hautement toxique. Cependant, certaines bactéries ont la capacité de dégrader ce composé en synthétisant des enzymes, comme la catalase (**BOURGEOIS *et al.*, 1989**). La catalase est capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



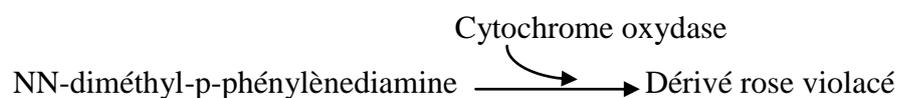
Le test de catalase, simple et instantané, consiste à suspendre une ou deux gouttes de solution de peroxyde d'hydrogène sur une lame de microscopie avec une fraction de la colonie choisie sur gélose nutritive. Une réaction positive libère immédiatement du gaz O_2 (**Photographie n°05**).



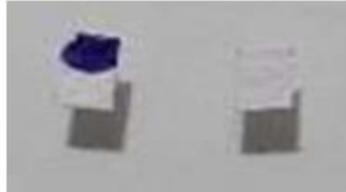
Photographie n°05 : Test de recherche de la catalase (positif à droite et négatif à gauche) (Photo personnelle).

- **Test d'oxydase**

Le test consiste à démontrer la synthèse de la cytochrome oxydase qui permet aux bactéries d'oxyder le réactif incolore (NN-diméthyl-p-phénylènediamine) en le transformant en un dérivé rose violacé, selon la réaction suivante :



Une fraction de la colonie à identifier est déposée sur un disque d'oxydase à l'aide d'une pipette Pasteur. Une réaction positive se traduit par une coloration bleu foncé à violette apparaissant dans un délai de 30 secondes (**Photographie n°06**).



Photographie n° 06 : Test de recherche de la cytochrome oxydase (positif à gauche et négatif à droite) (Photo personnelle).

1.4.2.3. Coloration de Gram

Pour préparer un frottis thermofixé en vue de la coloration de Gram, la procédure débute par l'application d'une goutte d'eau distillée sur une lame de microscopie. Ensuite, une fraction d'une colonie distincte est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et déposée sur la lame. Après un temps de séchage à l'air, le frottis est fixé en passant la lame trois fois sur la petite flamme du bec Bunsen.

Le violet de gentiane est appliqué en premier pendant une minute. Ensuite, le frottis est traité avec la solution de Lugol pendant une minute avant de le rincer. Le frottis coloré résultant doit subir un processus de décoloration utilisant de l'éthanol à 95% ; pour cela, la lame est délicatement inclinée afin de laisser le solvant s'égoutter sur le frottis pendant seulement 2 à 3 secondes, en s'assurant que le colorant cesse de s'écouler librement. Après un rinçage rapide à l'eau, la fuchsine est appliquée en contre-coloration pendant 30 secondes. Après un autre rinçage rapide à l'eau, le frottis est délicatement séché au bec Bunsen.

L'examen microscopique est réalisé à l'aide d'un objectif à immersion, en agrandissant l'image d'un facteur 100 ; les bactéries du genre *Pseudomonas* apparaissent sous forme de bâtonnets (bacilles) à Gram négatif se colorant en rose (**Photographie n°07**).



Photographie n°07 : Aspect microscopique du genre *Pseudomonas* après coloration de Gram (G x100) (Photo personnelle).

1.4.2.4. Tests biochimiques métaboliques en galerie miniaturisée

Une fois le genre *Pseudomonas* confirmé, nous avons utilisé un des systèmes manuels et standardisés les plus courants pour l'identification biochimique rapide de l'espèce d'un seul isolat par échantillon positif ; le système API[®] (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) est basé sur la détermination de l'indice du profil analytique (Analytic Profile Index).

Le système API[®] 20NE permet l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries, et consiste en une galerie composée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les tests conventionnels de ce système sont ensemencés avec une suspension bactérienne saline qui réhydrate les milieux de culture. Les réactions qui se produisent pendant l'incubation entraînent des changements de couleur spontanés ou sont révélés par l'addition de réactifs spécifiques.

L'ensemencement de la galerie est réalisé selon plusieurs étapes, en suivant les instructions du fabricant.

- **Préparation de la galerie**

- Après assemblage du fond et du couvercle constituant la boîte d'incubation, 5 mL d'eau distillée stérile sont versés dans le fond afin de remplir les alvéoles et garantir une atmosphère humide.
- La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale du fond de la boîte plutôt que sur le couvercle, car ce dernier pourrait être déplacé lors de la manipulation.
- La galerie est retirée de son emballage individuel puis disposée à l'intérieur de la boîte d'incubation.

- **Préparation de la suspension bactérienne**

La suspension bactérienne doit avoir une opacité équivalente à 0,5 sur l'échelle de McFarland. À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 1 à 4 colonies présentant une morphologie identique, et prélevées à partir de la culture jeune obtenue après purification sur gélose nutritive, sont transférées dans 2 mL d'eau physiologique stérile. La suspension ainsi préparée et homogénéisée au vortex doit être immédiatement utilisée.

- **Inoculation de la galerie**

- Les tubes (sans les cupules) des tests de NO_3 à ONPG sont remplis avec la suspension bactérienne. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, la pointe de la pipette doit être positionnée sur le côté du tube, tout en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Environ 200 μL de la suspension bactérienne précédente sont transférés dans une ampoule contenant le milieu API AUX. Cette nouvelle suspension est délicatement homogénéisée avec une pipette Pasteur stérile pour éviter la formation de bulles d'air.
- Les tubes ainsi que les cupules des tests de GLU à PAC sont remplis de manière à obtenir un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave.
- L'huile de paraffine est utilisée pour remplir les cupules des trois tests : GLU, ADH et URE, de manière à former un ménisque convexe qui va assurer une atmosphère d'anaérobiose.
- La boîte d'incubation contenant la galerie ensemencée, soigneusement fermée, est placée dans une étuve réglée à une température de $29^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pendant $24\text{h} \pm 2\text{h}$ (**Photographie n°08**).



Photographie n°08 : Aspect d'une galerie API® 20NE inoculée (Photo personnelle).

- **Lecture de la galerie**

Pour interpréter les résultats des réactions après incubation (**Photographie n°09**), nous nous sommes référés au tableau de lecture de la fiche technique du fournisseur (**Tableau n°03, Annexe n°02**).



Photographie n°09 : Aspect d'une galerie API® 20NE après incubation (Photo personnelle).

Une fois le profil analytique obtenu, le nom de l'espèce de *Pseudomonas* a été révélé par l'identifieur API® 20NE, version 7.0.

1.4.3. Test de sensibilité aux antibiotiques

Après confirmation du genre *Pseudomonas* et l'identification de l'espèce, une souche par échantillon positif a été soumise à un test de sensibilité aux antibiotiques selon la méthode des disques basée sur la diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH).

1.4.3.1. Antibiotiques évalués

Un total de 11 antibiotiques ont été utilisés pour l'étude de la sensibilité des espèces de *Pseudomonas*. Le classement de ces antibiotiques selon leur structure chimique ainsi que leurs noms, abréviations, charges des disques sont reportés dans le **Tableau n°04**. Le même tableau renseigne également sur les valeurs critiques des diamètres de zone d'inhibition pour *Pseudomonas* selon le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014 ; 2024).

Tableau n°04 : Valeurs critiques des diamètres de zones d'inhibition pour *Pseudomonas* selon le CLSI (2014 ; 2024).

Antibiotiques			Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)			
Famille et sous-famille	Nom	Abréviation		R	I	S	
Bêtalactamines	Pénicillines	Ticarcilline	TC	75	≤15	16-23	≥24
		Ticarcilline + Acide clavulanique	TTC	75/10	≤15	16-23	≥24
	Céphalosporines	Céfotaxime	CTX	30	≤14	15-17	≥18
	Carbapénèmes	Imipénème	IMP	10	≤15	16-18	≥19
Fluoroquinolones	2 ^{ème} génération	Norfloxacine	NOR	10	12≤	13-16	≥17
	3 ^{ème} génération	Ciprofloxacine	Cip	5	15≤	16-20	≥21
	3 ^{ème} génération	Levofloxacine	Lev	5	≤13	14-16	≥17
Aminosides		Gentamicine	CN	10	≤12	13-14	≥15
		Amikacine	AK	30	≤14	15-16	≥17
		Tobramycine	TOB	10	≤12	13-14	≥15
Polymyxines	Polymyxines E	Colistine	CT	10	≤10	-	≥11

1.4.3.2. Technique

Nous avons utilisé la technique préconisée par le CLSI, et recommandée par l'OMS et le réseau national de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Algerian antimicrobial resistance network, AARN).

La gélose de Mueller-Hinton (MH), en surfusion, coulée dans des boîtes de Pétri à une épaisseur de 4 mm, est laissée solidifier et sécher.

L'inoculum est préparé en suspendant la culture bactérienne jeune obtenue sur gélose nutritive dans de l'eau physiologique stérile en tube à essai. Après homogénéisation, la turbidité de cet inoculum est ajustée à 0,5 McFarland.

En utilisant un écouvillon stérile imbibé de suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, la surface gélosée bien séchée estensemencée à trois passages en stries bien serrées afin d'assurer une répartition uniforme de la suspension. L'ensemencement se termine par un passage de l'écouvillon sur le pourtour de la gélose en le plaquant contre la paroi interne de la boîte de Pétri.

Dans les 15 minutes qui suivent, les disques imprégnés d'antibiotiques sont appliqués de manière aseptique contre la surface du milieu gélosé MHensemencé, en utilisant une pince. Il est recommandé de ne pas placer plus de 6 disques avec des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre afin d'éviter le chevauchement des zones d'inhibition, et de ne pas les déplacer une fois mis en contact avec la gélose car certains antibiotiques diffusent presque immédiatement. Les disques d'antibiotiques étant préservés dans des étuis hermétiques à 4°C, ont été laissés à température ambiante pendant environ une heure avant utilisation.

L'incubation s'effectue à 35°C pendant 18-24h.

1.4.3.3. Lecture

Le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique évalué, a été mesuré avec un pied à coulisse digital. Les résultats ont été comparés aux valeurs critiques (**Tableau n°04**), ce qui permet de classer la souche testée dans l'une des trois catégories cliniques suivantes : Résistant (R), intermédiaire (I) ou sensible (S).

La multirésistance est déterminée comme étant la résistance à au moins 3 antibiotiques appartenant à des familles d'antibiotiques différentes.

1.4.4. Conservation des souches

Une fois la lecture du profil antibiotique effectuée, les souches ont été conservées sur milieu gélosé spécifique présenté en tube de 3 mL. Avec une pipette Pasteur stérile chargée de la culture pure obtenue sur gélose MH, ce milieu de conservation a étéensemencé par piqûre centrale. Après une incubation à 37°C pendant 18-24h, le tube a été étiqueté puis mis à l'abri de la lumière et stocké à température ambiante. Cette méthode permet de conserver les souches entre 6 et 12 mois..

Pour une conservation à long terme réalisée à – 80°C, une culture bactérienne obtenue à 37°C pendant 18-24h sur milieu BHIB est mélangée à une solution de glycérol à 20%, en respectant le ratio 0,3 mL/0,7 mL.

Résultats

2. Résultats

2.1. Résultats de la recherche de *Pseudomonas* dans le lait

Sur un total de 30 échantillons de lait cru prélevés de 30 vaches laitières dans 6 élevages différents, 2 prélèvements étaient contaminés par *Pseudomonas*, d'où une prévalence de 6,7% ; le premier prélèvement provenait d'Alger (élevage n°1) et le second de Bouira (élevage n°4) (**Tableau n°05**).

Tableau n° 05 : Prévalence de contamination du lait individuel cru par *Pseudomonas*.

Wilaya	N° élevage	n	n positif	Prévalence
Alger	1	6	1	16,7%
	2	9	0	0%
Total Alger		15	1	6,7%
Bouira	3	2	0	0%
	4	5	1	20%
	5	2	0	0%
	6	6	0	0%
Total Bouira		15	1	6,7%
Total		30	2	6,7%

n : nombre de prélèvements.

2.2. Résultats de l'identification biochimique

2.2.1. Identification des espèces de *Pseudomonas* dans le lait

Les tests biochimiques ont permis d'identifier 2 espèces de *Pseudomonas* avec un taux identique estimé à 50% : *P. aeruginosa* dans l'élevage N°4 à Bouira et *P. putida* dans l'élevage N°1 à Alger (**Tableau n°06**).

Tableau n°06 : Répartition par wilaya et élevage des espèces de *Pseudomonas* isolées du lait cru.

Espèce	Wilaya	N° élevage	N° échantillon	n	Prévalence
<i>P. putida</i>	Alger	1	4	1	50%
<i>P. aeruginosa</i>	Bouira	4	20	1	50%

n : nombre de souches.

2.2.2. Identification d'autres espèces bactériennes

Hormis *Pseudomonas*, d'autres genres bactériens se sont développés sur le milieu à la cétrimide. Les tests biochimiques ont permis d'identifier *Aeromonas hydrophila* / *caviae*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Pasteurella* spp. dans des échantillons de lait distincts (Tableau n°07).

Tableau n°07 : Prévalence des autres genres bactériens isolés du lait cru.

Genre	Espèce	Wilaya	N° élevage	N° échantillon	n	Prévalence
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila/caviae</i>	Alger	1	1, 2, 3, 6	4	66,7%
<i>Vibrio</i>	<i>parahaemolyticus</i>			5	1	16,7%
<i>Pasteurella</i> spp.	/		2	15	1	16,7%

n : nombre de souches.

2.3. Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

2.3.1. Expression clinique des souches testées aux antibiotiques

2.3.1.1. Taux global d'expression clinique des souches de *Pseudomonas* testées aux antibiotiques

Les deux souches de *Pseudomonas* isolées du lait et testées à 11 antibiotiques par la technique de diffusion des disques en milieu gélosé MH, ont globalement exprimé une résistance à 3 antibiotiques et une sensibilité réduite à 1 antibiotique appartenant à 2 familles distinctes, ce qui représente des taux de résistance et de sensibilité réduite de

27,3% et de 9,1%, respectivement. Ces souches étaient sensibles à 8 antibiotiques (Tableau n°08).

Tableau n°08 : Taux global d'expression clinique des souches de *Pseudomonas* testées à 11 antibiotiques.

Catégorie clinique	Sensibilité	Sensibilité réduite	Résistance
Nombre d'antibiotiques	8	1	3
%	72,7%	9,1%	27,3%

2.3.1.2. Taux d'expression clinique des souches de *Pseudomonas* testées par antibiotique

Sur les 11 molécules d'antibiotiques appartenant à 4 familles distinctes, les souches de *Pseudomonas* testées ont montré une résistance de 100% à la ticarcilline et de 50% à la ticarcilline associée à l'acide clavulanique, appartenant à la famille des bêtalactamines, ainsi qu'à la colistine de la famille des polymyxines. Par ailleurs, une sensibilité réduite de 50% a été exprimée pour la ticarcilline associée à l'acide clavulanique.

Tableau n°09: Taux d'expression clinique des souches de *Pseudomonas* testées en fonction de l'antibiotique.

Antibiotique	Abréviation	Charge des disques (µg)	Résistance		Sensibilité réduite		Sensibilité	
			n	%	n	%	n	%
Ticarcilline	TC	75	2	100%	0	0%	0	0%
Ticarcilline+Acide clavulinique	TTC	75/10	1	50%	1	50%	0	0%
Céfotaxime	CTX	30	0	0%	0	0%	2	100%
Imipénème	IMP	10	0	0%	0	0%	2	100%
Norfloxacine	NOR	10	0	0%	0	0%	2	100%
Ciprofloxacine	CIP	5	0	0%	0	0%	2	100%
Levofloxacine	LEV	5	0	0%	0	0%	2	100%
Gentamicine	CN	10	0	0%	0	0%	2	100%
Amikacine	AK	30	0	0%	0	0%	2	100%
Tobramycine	TOB	10	0	0%	0	0%	2	100%
Colistine	CT	10	1	50%	0	0%	1	50%

n : nombre de souches testées aux antibiotiques.

2.3.2. Expression clinique des souches testées aux antibiotiques par espèce de *Pseudomonas* et détermination des phénotypes de résistance

L'espèce *P. aeruginosa* a exprimé une résistance à 3 antibiotiques : la ticarcilline, la ticarcilline associée à l'acide clavulanique, et la colistine ; elle présente le phénotype de résistance Tc Ttc Ct (**Tableau n°10**).

L'espèce *P. putida* a exprimé une résistance à la ticarcilline, ainsi qu'une sensibilité réduite à la ticarcilline associée à l'acide clavulanique ; son phénotype de résistance est Tc (**Tableau n°10**).

Tableau n°10 : Profil d'antibiorésistance des espèces de *Pseudomonas* isolées du lait cru.

Espèce	n	Provenance		Catégorie clinique	Antibiotiques			Profil de résistance
		Wilaya	N° élevage		TC	TTC	CT	
<i>P. aeruginosa</i>	1	Bouira	4	R	100%	100%	100%	Tc Ttc Ct
				I	0%	0%	0%	
				S	0%	0%	0%	
<i>P. putida</i>	1	Alger	1	R	100%	0%	0%	Tc
				I	0%	100%	0%	
				S	0%	0%	100%	

n : nombre de souches testées aux antibiotiques.

Discussion

Discussion

Le genre *Pseudomonas*, un micro-organisme pathogène et d'altération, représente une menace pour la santé humaine et animale, et entraîne des pertes financières considérables. En effet, en raison de pratiques de fabrication et de manipulation peu hygiéniques, ces bactéries peuvent se transmettre aux consommateurs à travers le lait et les produits laitiers, particulièrement frais. Faisant partie du groupe très commun de bactéries psychrotrophes, ils sont capables de se développer à des températures de réfrigération (7°C ou moins) et conduire à la détérioration de ces denrées alimentaires.

Notre étude sur la recherche de *Pseudomonas* à partir de 30 échantillons de lait cru individuel, prélevés de 30 vaches laitières répartis sur 6 élevages des wilayas d'Alger et de Bouira, a révélé une prévalence estimée à 6,7% (n= 2) (**Tableau n°05**). Les études ayant abordé ce thème manquent en Algérie parmi les études consultées. Dans une étude réalisée sur 3 jours consécutifs dans 27 exploitations laitières françaises, comptant entre 30 et 140 vaches laitières, les taux de contamination du lait, prélevé également individuellement, étaient compris entre 0,6% et 15% (**MICHEL et al., 2001**). En Egypte, l'analyse du lait de mélange a révélé des prévalences de l'ordre de 80% (**ATIA et al., 2022**) et de 36% (**DEIAB et al., 2023**).

La présence de *Pseudomonas* dans cette catégorie alimentaire serait plus liée aux conditions de production, c'est-à-dire aux pratiques adoptées par les producteurs, qu'à la composition de la microflore microbienne du lait ; selon **MICHEL et al. (2001)**, l'importance du lavage du matériel de traite et des soins apportés aux mamelles est mise en avant par ces pratiques. L'entretien de ce matériel est nécessaire surtout que la plupart des souches de *Pseudomonas* isolées du lait et des produits laitiers ont la capacité de former un biofilm, essentiel à leur survie, avec des variations observées en fonction de la diversité des souches (**WATNICK et KOLTER, 2000**).

Selon **ATIA et al. (2022)**, les écarts importants dans les prévalences enregistrées d'une étude à l'autre, pourraient s'expliquer par le fait que la contamination croisée entre les échantillons de lait individuel est nulle, tandis que le risque de contamination du lait de mélange est significativement élevé. De plus, comme *Pseudomonas* est un micro-

organisme psychrotrophe, une contamination peut se produire lorsque le lait cru est livré dans des réservoirs réfrigérés à 4°C –7 °C (**FERNANDES, 2009**).

Dans la présente étude, l'identification des espèces de *Pseudomonas* a révélé la présence de *P. aeruginosa* et de *P. putida* (**Tableau n°06**). Nos résultats corroborent ceux de plusieurs auteurs ; **AMINE et al. (2015)**, **ATIA et al. (2022)** et **DEIAB et al. (2023)** ont isolés, en plus d'autres espèces (*P. fluorescens* et *P. diminuta*), *P. aeruginosa* avec des prévalences respectives de 15,2%, de 20%, et de 16%, ainsi que *P. putida* avec des prévalences estimées à 18,2%, 8%, et 4%, respectivement. Avec une fréquence d'isolement de 40%, *P. aeruginosa* a été également identifié dans le lait cru par **ABOU EL-ROOS et al. (2013)**.

La diversité d'espèces ainsi que la variation de leur fréquence d'isolement, observées d'une étude à l'autre pourraient s'expliquer par le nombre d'échantillons prélevés, par des conditions d'hygiène qui diffèrent en fonction de l'élevage bovin, ainsi que par la température et la durée de stockage du lait. Un autre facteur clé influençant ces résultats est le nombre de souches obtenues qui est lié au nombre d'isolats identifiés.

La prédominance d'isolement de *P. aeruginosa* dans la majorité des études consultées, serait associée à la capacité à former des biofilms qui représentent un des facteurs de virulence de cette espèce. Cependant, il existe, selon **DEIAB et al. (2023)**, des variations dans la capacité de formation de biofilms au sein même de l'espèce *P. aeruginosa* ; en effet, cette capacité est puissante chez certaines souches, et médiocre ou faible chez d'autres souches.

Concernant l'impact de la température, l'étude de **ABOU EL-ROOS et al. (2013)** a révélé une diminution drastique de la présence de *P. aeruginosa* après un traitement thermique du lait, en passant de 40% à 16% ; cela ne fait que confirmer le caractère psychrotrophe des bactéries du genre *Pseudomonas*.

En plus du genre *Pseudomonas*, nous avons, au cours de ce travail, identifié trois autres genres bactériens : *Aeromonas*, *Vibrio* et *Pasteurella* (**Tableau n°07**). Le milieu gélosé à la cétrimide serait favorable au développement de ces genres dits apparentés. Notre résultat est confirmé par celui de **BOUALLEG et al. (2018)** ont isolé *Aeromonas* et *Vibrio* simultanément dans le même lait, ainsi que par les résultats d'une étude réalisée en

Allemagne en détectant *Aeromonas* (8,7%) et *Vibrio* 4,3% (**IBRHAM et al., 2008**), et d'une autre étude effectuée au Danemark en identifiant dans 72% des échantillon de lait cru *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Chryseobacterium*, *Alcaligenes* et *Comomonas* (**HOLM et al., 2004**).

La coexistence des genres bactériens *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Vibrio*, pourrait s'expliquer par le fait que ces genres partagent des caractéristiques culturales similaires ; leur présence dans le lait cru serait due à une contamination par l'eau qui est le milieu préférentiel de ces bactéries ou l'ingestion d'ensilage souillé (pour le genre *Vibrio*). Quant à *Pasteurella*, une bactérie pathogène fréquemment impliquée dans les cas de mammites, mais aussi de pneumonies, chez les bovins, elle peut être transmise par le lait cru qui joue ainsi le rôle de vecteur (**SEDKY et al., 2020**).

Pseudomonas possède une résistance naturelle à certains antibiotiques, tel que cité dans la partie bibliographique, et a acquis, au fil du temps, d'autres résistances. La résistance à des antibiotiques d'intérêt médical fait l'objet d'une surveillance permanente par le réseau Algérien de la surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN).

L'étude de la sensibilité des 2 souches testées à 11 antibiotiques a montré une résistance à 3 antibiotiques (27,3%) parmi lesquels 1 antibiotique est également concerné par une sensibilité réduite (9,1%) (**Tableau n°08**). Ces souches étaient globalement résistantes à la ticarcilline TC (100%) et à la ticarcilline associée à l'acide clavulanique TTC (50%) qui appartiennent à la famille des bêtalactamines, ainsi qu'à la colistine CT (50%) de la famille des polymyxines (**Tableau n°09**). Nos résultats pourraient s'expliquer par le fait que *Pseudomonas* possède une résistance naturelle aux bêtalactamines (**BARBIER et WOLFF, 2010**) par acquisition de bêta lactamases à spectre élargie. Le taux de résistance faible à la TTC comparé à celui de la TC est dû à la présence de l'acide clavulanique, un inhibiteur qui a une bonne activité contre les pénicillinases (type de BLSE) produites par plusieurs bactéries dont *Pseudomonas* (**HADDACHE et al., 2016**).

La résistance de *Pseudomonas* à la ticarcilline de l'ordre d 72,2% a été précédemment observée (**TAN et al., 2019**), de même que des taux de résistance de 60,4% à la ticarcilline associée à l'acide clavulanique, et de 14,7% à la ticarcilline, ainsi qu'une résistance à l'imipénème de l'ordre de 14,7% (**HADDACHE et al., 2016**). Ces auteurs

notent que les bêtalactamines représentent la famille d'antibiotiques à laquelle *P. aeruginosa* développe plus de résistances, et que cette résistance serait due à l'existence de BLSE, des enzymes produites par cette espèce.

Nous avons observé une sensibilité aux antibiotiques des deux familles des fluoroquinolones et des aminosides au même titre que **HADDACHE *et al.* (2016)**. Mais plusieurs autres auteurs ont signalé une résistance à ces molécules avec des taux variables pour les deux espèces *P. aeruginosa* (**ARSLAN *et al.*, 2011** ; **ABOU EL-ROOS *et al.*, 2013**), et *P. putida* (**SADER *et al.*, 2003** ; **TAN *et al.*, 2019**).

Concernant la résistance à la colistine, une polymyxine utilisée dans le traitement des infections humaines à *Pseudomonas*, elle n'a été décrite au cours de cette étude, que pour *P. aeruginosa* ; cette espèce était sensible à cette molécule dans l'étude de **HADDACHE *et al.* (2016)**. La résistance à la colistine s'expliquerait par le fait que la bactérie modifie les lipopolysaccharides de sa membrane externe qui entraîne une diminution de la charge négative de la membrane et devient imperméable ainsi à cet antibiotique. Cette résistance est induite par un gène plasmidique nommé *mcr-1* qui altère le site cible de l'antibiotique en réduisant son affinité pour le lipide A du LPS (**ZARATE *et al.*, 2021**).

Dans la présente étude, deux phénotypes de résistance ont été décrits : Tc Ttc Ct pour *P. aeruginosa* et Tc pour *P. putida*. Ces profils diffèrent d'une étude à une autre sont associés au nombre et à l'intensité d'utilisation des antibiotiques dans les élevages. La transmission de ces souches résistances, notamment par la consommation du lait, constitue une réelle contrainte pour la sécurité alimentaire et la santé humaine.

Conclusion
et
Recommandations

Conclusion et recommandations

À travers cette étude, nous avons essayé d'apporter une contribution à la recherche ainsi qu'à la détermination des espèces et des antibiogrammes des souches de *Pseudomonas* isolées du lait cru provenant des deux wilayas d'Alger et de Bouira.

Cette étude, ayant permis de mettre en évidence la présence de ce micro-organisme avec une prévalence de 6,7%, et des deux espèces *P. aeruginosa* et *P. putida*, à phénotypes de résistance aux antibiotiques d'intérêt médical, Tc Ttc Ct et Ct, pose une contrainte à la fois pour la santé animale et la sécurité alimentaire.

Afin de prévenir la contamination du lait et des produits laitiers par *Pseudomonas*, ainsi que la propagation des souches résistantes, nous recommandons :

- De maintenir les stalles, les espaces de repos et de traite des animaux propres et secs.
- D'observer des conditions d'hygiène strictes pendant la traite et lors du traitement du lait ; cela inclut le nettoyage régulier et efficace des équipements de traite, des cuves de stockage du lait et des installations de traitement.
- De former les personnes exerçant dans le domaine de l'élevage laitier, aux bonnes pratiques d'hygiène. Ces personnes doivent être conscientes des risques de contamination et des méthodes appropriées pour prévenir la prolifération de micro-organismes tels que *Pseudomonas*.
- D'utiliser de l'eau propre pour le lavage et la désinfection des équipements et des trayons après chaque utilisation.
- De limiter l'utilisation des antibiotiques à des cas nécessaires et de suivre les bonnes pratiques d'administration ; cela réduit la pression de sélection sur les bactéries et aide à prévenir le développement de souches résistantes.
- D'initier la surveillance de la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* isolées du lait cru pour détecter tout changement dans les profils de résistance et ajuster les stratégies de traitement si nécessaire, au bon moment.

Conclusion et recommandations

- D'inclure le critère *Pseudomonas* dans l'analyse microbiologique de la catégorie du lait et des produits laitiers, lors de la prochaine révision de l'arrêté interministériel du 4 octobre 2016 (**JORA, 2017**).

Annexes

Annexe n°01

Matériel de prélèvement et d'analyse microbiologique et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques

- Glacière avec poches de glace.
- Flacons stériles de 250 mL.
- Chiffonnettes.
- Gants.
- Eau javellisée.
- Etuve réglée à 25°C.
- Microscope optique.
- Homogénéisateur Vortex[®].
- Bec Bunsen.
- Pipette stérile en verre (10 mL).
- Micropipette (100-1000 µL).
- Pipettes Pasteur.
- Anse de platine bouclée.
- Tubes à essai stériles.
- Embouts stériles (1000 µL).
- Boîtes de Pétri.
- Lames de microscopie.
- Eau peptonée tamponnée.
- Eau physiologique stérile.
- Eau distillée stérile.
- NaCl 0,9%.
- Milieu gélosé à la Cétrimide.

- Gélose nutritive.
- Bouillon BHIB.
- Bandelettes d'oxydase.
- Disques d'antibiotiques
- Peroxyde d'hydrogène.
- Galeries biochimiques API[®] 20 NE.
- Réactifs nitrates : NIT 1 et NIT 2.
- Réactif de Kovacs.
- Kit de coloration de Gram (Violet de gentiane, fuschine, éthanol à 95% et solution Lugol).
- Bacs en verre pour coloration de Gram.
- Pincés.
- Pied à coulisse digital.

Tableau n°03 : Interprétation des tests biochimiques pour l'identification de l'espèce *Pseudomonas* sur API® 20NE

Tests	Réactions/enzymes	Résultats	
		Négatif	Positif
NO ₃	Réduction des Nitrates en nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u>	
		Incolore	Rose-rouge
	Réduction des Nitrates en azote	<u>Zn / 5min</u>	
		Rose	Incolore
TRP	Formation d'indole (TRyptOphane)	<u>JAMES / immédiat</u>	
		Incolore, vert pale / jaune	Rose
GLU	Fermentation (GLUcose)	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine Dhydrolase	Jaune	Orange / rose / rouge
URE	UREase	Jaune	Orange / rose / rouge
ESC	Hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline)	Jaune	Gris / marron / noir
GEL	Hydrolyse (protéase) (GELaline)	Pas de diffusion de pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β D-Galactopyranosidase)	Incolore	Jaune
GLU	Assimilation (GLUcose)	Transparence	Trouble
ARA	Assimilation (ARAbinose)	Transparence	Trouble
MNE	Assimilation (ManNosE)	Transparence	Trouble
MAN	Assimilation (MANnitol)	Transparence	Trouble
NAG	Assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	Assimilation (MALtose)	Transparence	Trouble
GNT	Assimilation (potassium GlucoNaTe)	Transparence	Trouble
CAP	Assimilation (acide CAPrique)	Transparence	Trouble
ADI	Assimilation (acide ADIrique)	Transparence	Trouble
MLT	Assimilation (MaLaTe)	Transparence	Trouble
CIT	Assimilation (trisodium CITrate)	Transparence	Trouble
PAC	Assimilation (acide PhénylACétique)	Transparence	Trouble
OX	Cytochrome-oxydase	(Voir notice du test oxydase)	

Références bibliographiques

A.

ABIRAMI BALESWARAN, 2023. Compréhension et reproduction de l'accident lié à *Pseudomonas fluorescens* en fabrication fromagère : application à la technologie lactique-mixte caprine. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT.

ABOU EL-ROOS N; MAZID E; ZAKARY E; Kayri A.E.Y, 2013. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from milk. Assiut Veterinary Medical Journal, 59(139), P: 14-22.

AGGAD H; MAHOUZ F; AHMED AMMAR Y; KIHAL M, 2009. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'Ouest Algérien.., Vol 12. P: 590-595.

AMIN -AHLAM, EI-LEBOUDY; AMR A; MOHAMED E; NASIEF; ELTONY-SHIMAA M, 2015. Occurrence and Behaviour of *Pseudomonas* Organisms in White Soft Cheese. Alex J of Vet Sci, 44(12):74-79.

ARSLAN S; EYI A; ÖZDEMİR F, 2011. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas spp.* Isolated from cheeses. Dairy Sci. 94: 5851–5856.

AL-ARAJI MK et ALI S, 2012. 2-Aminoacetophenone as a virulent factor for *Pseudomonas aeruginosa* causing sever burn and wound infections in Iraq. Ibn Al Haitham J Pure Appl Sci., 25, P: 88–97.

ANONYME, 2011. Fiche technique santé-sécurité : Agents pathogènes – *Pseudomonas spp.* Direction de la réglementation des agents pathogènes, agence de la santé publique du Canada. www.canada.ca. [Consulté le 12/04/2024].

ANONYME, 2022. Principe de la détermination de la sensibilité et de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Association des enseignants de microbiologie des facultés de pharmacie. http://aemip.fr/?page_id=37622 . [Consulté le 11/05/2024].

ATIA R; MOHAMED H; ABO ELROOS N; AWAD D, 2022. Incidence of *Pseudomonas* specises and effect of their virulence factors on milk and milk products. Benha Veterinary Medical Journal, 42(1), P : 1-5.

Référence bibliographique

AVRIL J M ; DABERNAT H ; MONTEIL D H, 2000. Bactériologie clinique. 3ème édition. Paris : Ellipses édition ; p. 602-3.

B.

BARBIER F et WOLFF M, 2010. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. Médecine/Sciences/MS. MéDecine Sciences, 26(11), 960-968.

BLANC B, 1982. Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. Lait, Vol 62 ; P :350-395.

BRICHA S ; OUNINE K ; OULKHIR S ; EL HALOUI N E ; ATTARASSI B, 2009. Facteurs de virulence et épidémiologie liée aux *Pseudomonas aeruginosa*. Revue Tunisienne d'Infectiologie. ; Vol.2 ; P : 7 – 14.

BRISBOI A ; LAFARGE V ; BROILLEAU A ; DE BUYSER M L ; COLLETTE C ; GAIN-BASTUJI B ; THOREL M F, 1997. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. Revue Scientifique et Technique de L'Office International Des Epizootie, Vol.16, n°1 ;P : 452- 471.

BRUYERE P ; RABAT L ; BEGERON P ; GUERIN-FAUBLEE V, 2014. Mammites à *Pseudomonas aeruginosa* chez la vache, Le Nouveau Prat Vet élevages et santé N°26, Vol 7.

BOUALLEG N ; GHRAIB A ; SAIFI N, 2018. La relation entre les pratiques de la traite et la qualité hygiénique du lait de vache en étables suburbaines de la Wilaya Guelma. Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945 Geulma :Faculté des sciences et de la Nature et de la vie, sciences de la terre et de l'Univers, 51p.

BOURGEOIE C M et LARPENT J P, 1989. Microbiologie alimentaire. T.2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec et Doc, Lavoisier (Paris), 523p

C.

CLAVE D, 2011. Fiche technique Bactériologie, Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique.

Référence bibliographique

COURNOYER B ; PANETIER P ; DUBROU S ; GASSILLOU B ; GUILLIER L ; JOAYEU M ; LERICHE F ; LEVI Y ; MONFORT P ; HARTEMANNE V ; VAN G, 2010. Évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition par ingestion de *Pseudomonas* dans les eaux destinées à la consommation humaine (hors eaux conditionnées).

CUQ J L, 2007. Microbiologie Alimentaire. Edition Sciences et Techniques du lauguedoc. Université de Montpellier. 150p.

D.

DE BENTZMANN S et PLESIAT P, 2011. *Pseudomonas aeruginosa* : Une virulence complexe. Revue Francophone des Laboratoires, 2011(435), 73-81.

[https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(11\)71104-2](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(11)71104-2).

DEBRY G, 2001. Le lait : Caractéristiques physicochimique. In : lait, nutrition et santé. Tec et doc, Paris, Lavoisier, 566p, P : 100-220.

E.

EUZEBY J P, 2007. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [en ligne] disponible sur : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/>, [consulté le 15/02/2024].

F.

FELDMAN M; BRYAN R; RAJAN S; SCHEFFLER L; BRUNNERT S; TANG H, 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Infection and Immunity, 66(1), P: 43-51.

FERNANDES R, 2009. Microbiology Handbook: dairy products. Leatherhead Food International Ltd (ed).

FIGARELLA J; LEYRAL G; TERETTE M, 2007. Microbiologie générale et appliqué. Paris: Delegrave edition. p. 8-106.

Référence bibliographique

FINALAYSON E A et BROWN P D, 2011. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. West Indian Med J, p .60:24–32.

FRANZETTI L et SCARPELLINI M, 2007. Characterisation of *Pseudomonas spp.* isolated from foods. Annals of Microbiology. 57(1): 39-47. Immunol, 322: 249- 289 Interface•, Microbes and Microbial Technology, Springer, New York, P: 59-85.

FREDOT E, 2006. Connaissance des aliments-bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier : 25, 397p, P : 20-55.

G.

GARRITY G M, 2005. The Proteobacteria - Part B: The Gammaproteobacteria. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'. (Springer: New York).

GELAIS S T; OUID-BABA D; TURCOT S.M, 1999. Composition du lait de chèvre et aptitude à la transformation. Agriculture et Agro-alimentaire. Canada. P : 1-33.

GELLEN- DAUTREMER J, 2010. Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*. Mise au point. Antibiotiques, 12(2), 75- 81. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2010.01.009>.

GIRAD F, 2020. Production de pigments hydrosolubles par certaines espèces du genre *Pseudomonas*. Portail pédagogique académique. Disponible sur <https://pedagogie.ac-montpellier.fr> > ressources. [Consulté le 14/11/2023].

GOT R, 1971. Les enzymes du lait, U.E.R. de Médecine Lyon-Sud, Ann Nutr Alim, **25** : A291-A311.

GUIRAUD J P, 2003. Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris, pp: 136-139.

GUY F I, 2006. Elaboration d'un guide méthodologique d'intervention lors de contaminations par les salmonelles de produits laitiers au lait en zone de production fromagère AOC du massif central. Thèse doct, université Paul-Sabatier de Toulouse, France ; P :1-7.

H.

HADDACHE W ; BOURAHLA N, 2016. Etude de la résistance du *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques au CHU Nedir Mohammed de Tizi Ouzou pendant l'année 2015. Mémoire de Fin d'Etude. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou : Faculté de Médecine Département de pharmacie, 116p.

HASSAN AMER I; FATHY AHMED ABD ELAAL S; MONAH H; TOLBA, 2008. Presence and Activity of Psychrotrophic Bacteria in Raw Cow's Milk and Some Dairy Products. Food Control Department-Faculty of Veterinary Medicine Zagazig University.

HOLM C; JEPSEN L; LARSEN M; JESPERSEN L, 2004. Predominant microflora of downgraded Danish bulk tank milk. J. Dairy Sci; 87 (15290961): 1151-1157.

HICHEM C, 2012. Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane. Grenoble: Université de Grenoble.

J.

JAIN A; MASILI E; BHOSLE N B, 2011.The Biofilm Returns: Microbial Life at the interface.

JEANTET R ; CROGUENNEC T ; MAHAUT M ; SCHUCK P ; BRULE G, 2008. Les produits laitiers (2^e éd.), Ed. Tec & doc, Lavoisier : Paris, 185p.

JENNEOT K et GUILLARD T, 2019. *Pseudomonas aeruginosa*, disponible sur https://www.sfmmicrobiologie.org/wpcontent/uploads/2019/07/BACTERIE_Pseudomonas.pdf [consulté le 13/05/2024].

JORA, 2017. Critères microbiologiques des denrées alimentaires. Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016. N°39, P: 11-32.

K.

KING E O; WARD M K; RANEYD E, 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301p.

L.

LABADIE J C; DOUSSET X; HEBREAUD M, 1996. Les *Pseudomonas* et autres bactéries Gram - d'altération. Microbiologie alimentaire, tome 1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Technique et Documentation : Paris ; P : 209-220.

LEE C S; WOODING F B; KEMP, 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. J. Dairy. Res, P :47-39-50.

LE MINOR L et VERON M, 1990. Bactériologie médicale. 2ème édition. Paris : Flammarion édition1990. p. 567-73.

M.

MATHIEU J, 1997. Initiation à la physicochimie du lait. Paris : Tec et Doc, Lavoisier. 220p.

MENA K D et GEBRA C P, 2009. Risk Assessment o *Pseudomonas aeruginosa* in Water, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 201, 71-115.

MERIGAUD J P; LEMOINE T; AGUER D; BEUGNOT N; GILLIS J; JOUANNEAU F; KOUBBI L; LEPECHEUR E; MADIOT P; MAUPEU PROUIN J; SIMBELIE K; THIREAU F, 2009. Spécification technique de l'achat public, laits et produits laitiers. Groupe d'étude des marches de restauration collective et de nutrition (GEM RCN).

MICHEL V ; HAUWUY A ; CHAMBA JF, 2001. La flore microbienne de laits crus de vache : diversité et influence des conditions de production. INRA, EDP Sciences, lait 81 ; P : 575-592.

MOLGAT E et KURBAN D, 2023. Origine des bactéries et de la contamination du lait cru à la ferme. <https://lactanet.ca/origine-bacteries-contamination-ferme/>, [consulté le 24/4/2024].

Référence bibliographique

MONTEIL H, 2002. Revue Française des Laboratoires Volume 2002, Issue 343, Pages 31-40.

MUHAMMED K A et ALI S, 2012. 2-Aminoacetophenone as a virulent factor for *Pseudomonas Aeruginosa* causing sever burn and wound infections in Iraq, Ibn al-Haitham Journal for Pure and Applied Science, Volume 25, Issue 3 (31 Dec. 2012), pp.88-97, publié par University of Baghdad College of Education for Pure Science / Ibn al-Haitham2012-12-31.

N.

NOBLET B, 2012. Le lait : produits, composition et consommation en France. Cahiers de Nutrition et de Diététique, 47(5) ; P : 242-249.

P.

PALLERONI N J, 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 237 (nom. cons. opin. 5 of the Jud. Comm. 1952, 121).

PALLERONI N J, 2015. *Pseudomonas*, Bergey's Manual Of Systematics Of Archaea And Bacteria. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>

PASCAL C, 2010. Analyse génétique des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux [Thèse]. Besançon : Université de Franche-Comté.

PASCAL F et MAYE-LASSERRE M, 2024. Gélose sur cétrimide, Microbiologie médicale, disponible sur <https://microbiologiemedicale.fr/>, [consulté le 11/05/2024].

BERCHE P ; GUILLARD J L ; SIMONET M, 1989. Bactériologie ; les bactéries des infections humaines, de la biologie à la clinique. 2ème édition. Paris : Flammarion édition... p. 233-5.

PAVAUX C et MORNET P, 1982. Atlas en couleur d'anatomie des bovins : splanchnologie. Paris : Maloine S.A., 167p.

R.

RAMOS J L, 2004. *Pseudomonas*. Volume 1: Genomics, Life Style and Molecular Architecture. New York: Kluwer Academics/Plenum Publishers.

REMY D, 2010. Les mammites: guides. Paris: France Agricole, 259p.

RASHA A; DEIAB, NAHLA A; ABOU EI-ROOS; ASHRAF A; ABD EI TAWAB, 2023. Biofilm production by *Pseudomonas* species isolated from bulk tank milk and some milk products. Benha Veterinary Medical Journal 45 (222-226). Official Journal Issued by Faculty of Veterinary Medicine.

S.

SEDKY D; ALAA A; GHAZY; KHLOUD A; SOLIMAN, 2022. Incidence and control of infectious bacteria in bovine milk, Article in Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences.

SHINODA S et OKAMOTO K, 1977. Formation and function of *Vibrio parahaemolyticus* lateral flagella. Journal of bacteriology, 129(3), 1266-1271.

SINGELTON P, 2005. Bactériologie pour la médecine, les biologies et les biotechnologies. 2^{ème} édition. Paris : Dunod édition, p. 45.

SMITH E ; SIMS E H ; SPENCER D H ; KAUL R; OLSON M V, 2005. J Bacteriol 187, 2138–2147.

T.

TANG Y W; SUSSMAN M.; SCHWARTZMAN J, 2015. Molecular Medical Microbiology Book Second Edition de 2015.

TUMMLER B, 2006. *Pseudomonas*. Editions de RAMOS J L et LEVESQUE R C, (Springer, Heidelberg) Vol. 4, 35–68.

V.

VIGNOLA C.L, 2002. Science et technologie du lait : transformation du lait. Fondation de Technologie laitière du Québec. Montréal : Presses internationales Polytechnique. 2^{éd.} 600p, P : 70 – 110.

VILAIN A, 2010. Qu'est-ce que le lait ? Service d'allergologie, hôpital St-Vincent, GHICL, BP 387, 59020 Lille cedex, France. Revue française d'allergologie 50, 124–127p.

W.

WATNICK P et KOLTER R, 2000. Biofilm city of microbes. Journal of Bacteriology, 182(10); P: 2675-2679.

Z.

ZARAT M ; BARRANTES D ; CUICAPUZA D ; VELASQUEZ J ; FERNANDEZ N ; SALAVATIERRA G, 2021. Frequency of colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Peru. Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Publica ; 38(2):308-12.