

Septembre 2008

Compte rendu n° 150838016

Département Techniques d'Élevage et Qualité

Service Bien-être animal, Santé, Hygiène et Traçabilité

R. de Cremoux

Caractérisation et entérotoxigénicité des souches de *S. aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation

Rapport final

Cette étude a bénéficié du soutien financier des enveloppes Recherche de l'ACTA et de l'ACTIA (fonds du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche et du Ministère de la Recherche) et de l'Office de l'Élevage.

collection résultats



Caractérisation et entérotoxigénicité des souches de *S. aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation

R. de Cremoux, J. Barral, E. Beuvier, C. Callon, F. Gilbert,
M-C Montel, B. Poutrel, K. Raynal-Ljutovac

Rapport final

Juin 2008

Cette étude a été conduite avec le soutien financier de l'enveloppe Recherche de l'Association de Coordination Technique Agricole (A.C.T.A) et de l'Association de Coordination Technique des Industries Agro-alimentaires (A.C.T.I.A), du ministère de l'agriculture et de la pêche (MAP), et du ministère de la Recherche (MER) ainsi que de l'Office de l'Elevage.

Organismes bénéficiaires : Institut de l'Elevage, ITPLC, Centre Fromager de Carmejana

Responsable du projet : Renée de CREMOUX
Institut de l'Elevage - Chambre d'Agriculture du Tarn - BP. 89 - 81 003 Albi Cedex

Caractérisation et entérotoxigénicité des souches de *S. aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation

Cette étude a été *coordonnée par l'Institut de l'Elevage (ICTA pilote)* et réalisée en partenariat avec :

- *Partenaires ICTIA* : Institut Technique des Produits Laitiers Caprins, et Centre Fromager de Carmejane (organismes ICTIA associés) ;
- *Recherche publique* : INRA de Nouzilly, INRA d'Aurillac, INRA de Poligny ;
- *Organismes de développement* : PEP Caprin Rhône-Alpes (Station expérimentale du Pradel), Touraine Avenir Lait.

avec l'appui :

- des entreprises laitières Eurial-poitouraine, Sèvre et Belle, Fontenille et de la Fromagerie de Banon qui ont mis à notre disposition les informations recueillies dans le cadre de leurs collectes et nous ont permis, en collaboration avec leurs responsables techniques, d'organiser la collecte des échantillons analysés dans le cadre de l'étude.
- du Groupement de Défense Sanitaire des Alpes de Haute-Provence et de Languedoc Roussillon Elevage qui ont activement collaboré aux enquêtes et suivis des élevages ainsi qu'à la réalisation des prélèvements en exploitations fermières,
- du Laboratoire Interprofessionnel Laitier du Centre-Ouest (LILCO),
- des laboratoires d'analyses : Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières d'Aurillac, Laboratoire de Touraine, Laboratoire du Vaucluse.

Comité de Pilotage et réalisation des travaux :

Un Comité de Pilotage ayant pour objectif d'orienter les actions mises en œuvre dans le cadre du présent programme, discuter et valider les protocoles ainsi que les résultats présentés a été constitué et était composé de :

- Institut de l'Elevage : Renée de Cremoux,
Carlos Lopez, Rodolphe Dirberg et Marion Ferrand
- ITPLC : Alexandre Lauret et Ketsia Raynal-Ljutovac
- Centre fromage de Carmejane : Julie Barral
- INRA de Nouzilly : Bernard Poutrel et Florence Gilbert
- INRA d'Aurillac : Marie-Christine Montel
- INRA de Poligny : Eric Beuvier
- Touraine Avenir Lait : Vincent Lictevout
- PEP Caprin : Yves Lefrileux
- Ont également conviés aux réunions du Comité de Pilotage :
 - Représentants techniques : Valérie David (Institut de l'Elevage), Carole Dubuc-Forfait et Jean-Luc Champion (GDS 04)
 - Représentants des financeurs : un représentant de l'ACTIA ; un représentant de l'Office de l'Elevage

Outre les membres du comité de pilotage, ont participé à l'élaboration des protocoles, à leur mise en place, aux analyses et aux expérimentations : Cécile Callon et Céline Delbès (INRA d'Aurillac), Céline Arnould, Odile Rolet-Repecaud et Didier Dupont (INRA de Poligny), Patrice Gaborit et Isabelle Guillet (ITPLC), Juliette Boivin (Centre Fromager de Carmejane).

Rédaction du compte-rendu :

Le présent compte-rendu a été rédigé par R. de Cremoux (Institut de l'Élevage), J. Barral (Centre Fromager de Carmeiane), E. Beuvier (INRA de Poligny), F. Gilbert (INRA de Nouzilly), M-C Montel et C. Callon (INRA d'Aurillac), B. Poutrel (INRA de Nouzilly), K. Raynal-Ljutovac (ITPLC) avec l'appui et les avis de :

- A. Lauret (ITPLC),
- Y. Lefrileux (Station Expérimentale du Pradel),
- V. Lictévout (Touraine Avenir Lait),
- V. David, M. Ferrand, C. Laithier et S. Raynaud (Institut de l'Élevage).

*Nous tenons également à remercier l'ensemble des éleveurs
qui ont accepté de participer à cette étude.*

Résumé

Une étude a été conduite en vue de mieux appréhender les risques de contamination par *Staphylococcus aureus* du lait et des produits à base de lait cru en filière caprine et de rechercher des outils de maîtrise utilisables à la production comme à la transformation.

Dans une première étape, les informations enregistrées à l'initiative d'entreprises laitières commercialisant des produits à base de lait cru de chèvre ont été recensées et collectées afin de réaliser un premier état des lieux. La fréquence des analyses de dénombrement chez les producteurs est extrêmement variable selon les entreprises (2 à 3 fois par an à deux fois par mois). Le contrôle des laits de citernes est réalisé en routine mais là encore avec une périodicité variable, y compris au sein de la même entreprise, pour des tournées différentes. En cas de dépassement d'un seuil fixé à 500 ufc/ml, les laits des producteurs sont analysés à leur tour afin de repérer les exploitations dont les laits de tank sont fortement contaminés. L'exploration des données (703 tournées de 18 producteurs en moyenne sur une période de 5 ans) montre que les citernes positives sont les plus nombreuses en janvier, février et mars. Près de 34 % présentent des niveaux de contamination compris entre 1000 et 2000 ufc/ml. 3 à 8,6 % atteignent plus de 10000 ufc/ml. Quels que soient leurs niveaux de contamination, les citernes positives sont constituées d'en moyenne 9 % de laits de tank ayant des niveaux de contamination supérieurs à 1000 ufc/ml. En terme d'effectifs, cela correspond à seulement deux voire trois laits de tank fortement contaminés par citerne positive. Le nombre restreint d'exploitations impliquées permet d'envisager des interventions ciblées et d'autant plus efficaces chez les producteurs concernés. La dynamique de la contamination par *S. aureus* dans les laits des producteurs est caractérisée par sa saisonnalité, avec des niveaux de contamination accrus en début de printemps, soit pendant ou juste après les mises-bas. Une analyse typologique des élevages montre que seuls 4,5 % d'entre eux présentent des résultats régulièrement supérieurs à 500 ufc/ml. Inversement, environ 24 % ont des résultats régulièrement faibles (moins de 100 ufc/ml) y compris pendant plusieurs années consécutives.

L'analyse des niveaux de contamination en filière caprine a été complétée grâce à la mise en place d'un dispositif d'observation dans 38 exploitations fermières caprines situées dans trois zones de production AOC et correspondant à des technologies fromagères différentes : Ste Maure de Touraine (10), Pélardon (9) pour les fabrications de type lactique et Banon (19) pour les fabrications de type présure (ou caillé doux). Sur l'ensemble de la campagne, 66 % des laits ont été peu ou pas contaminés (≤ 10 ufc/ml) et près de 62 % des fromages ont présenté un niveau de contamination inférieur à 10^3 ufc/g. Des variations de contamination ont été constatées au cours du temps et d'une zone à l'autre. Si l'on regarde conjointement les niveaux de contamination relatifs des laits et des fromages, on remarque tout d'abord qu'en partant de laits même très contaminés, les dénombrements obtenus sur les fromages dépassent rarement 10^6 (Banon), 10^5 (Ste Maure de Touraine) voire 10^4 (Pélardon) ufc/g. Inversement, une contamination faible du lait ne saurait pour autant garantir, particulièrement pour des produits considérés comme sensibles, comme les fromages de type présure, la qualité sanitaire du produit final.

L'évaluation des risques d'entérotoxigénèse a été réalisée selon deux voies complémentaires, la première s'appuyant sur la caractérisation génomique des souches ou mélange de souches isolées des laits individuels, des laits de tank et des fromages, la seconde permettant de mieux appréhender l'expression phénotypique de ce potentiel entérotoxigène en recherchant les entérotoxines dans les produits dont les niveaux de contamination par *S. aureus* ont dépassé 10^4 ufc / g.

La plupart des souches isolées (66 % des souches de collection et 80,3 % des souches isolées des chèvres infectées identifiées pendant l'étude) possède le gène codant l'entérotoxine de type C. Chaque souche sauf une a présenté au moins un gène codant une entérotoxine. Les gènes *sea* et *sed* codant les entérotoxines A et D généralement impliquées dans les intoxications alimentaires ont été retrouvés chez respectivement 3,3 % (N=2 ; 1 exploitation concernée) et 13,1% (N= 8 ; 3 exploitations concernées) des souches. Ces observations sont dans l'ensemble corroborées par les analyses conduites sur les raclages sur boîtes de pétri de souches isolées des laits de tank ou des fromages,

avec toutefois des variations dans la fréquence des gènes identifiés en fonction des secteurs géographiques et la mise en évidence d'une probable diversité des souches de *S. aureus* dans les matrices étudiées (présence de gènes codant pour des entérotoxines non trouvés ou en plus faible fréquence chez les souches isolées des laits des chèvres infectées). En dépit de la fréquence élevée des souches potentiellement entérotoxigènes, aucun des fromages analysés (N= 41) n'a révélé la présence d'entérotoxines.

L'étude par typage de souches issues des laits de tank et des fromages témoigne de la multiplicité des sources possibles de contamination et confirme les résultats de l'analyse génomique. Cette partie du programme de recherche a concerné 12 producteurs. Outre l'analyse des laits de mélange et des fromages, des investigations complémentaires ont été conduites sur différentes sources de contamination dont certaines jugées, habituellement, comme secondaires et pour lesquelles il n'existe, de ce fait, que peu ou pas de références chez la chèvre. Les prélèvements ont concerné :

- l'homme (trayeur et/ou fromager) : écouvillonnages de la paume des mains et des fosses nasales,
- l'animal et son environnement : analyses bactériologiques sur les laits de demi-mamelles, frottis sur les mamelles et les trayons (sondage aléatoire), prélèvements d'air en salle de traite, de biofilms dans les installations de traite.

La prévalence des infections intramammaires occasionnées par *S. aureus* atteint en moyenne 2,8 %. Un portage nasal ou sur les mains des producteurs (trayeurs ou fromagers) a été mis en évidence chez, respectivement, 28,6 et 9,5 % des personnes soumises aux prélèvements soit, globalement, 33 % des personnes concernées. L'air collecté en salle de traite peut être ponctuellement contaminé par des souches de *S. aureus* mais cette contamination est réduite et ne semble pas s'accroître en cours de traite. Dans 4 installations sur 10, la présence de *S. aureus* a été décelée dans les biofilms des installations de traite. En ce qui concerne le typage des souches, la méthode MLVA (Multiple Locus Variable Number Tandem Analysis : analyse de répétitions en tandem en nombre variable) utilisée s'est avérée très discriminante. Elle confirme que la contamination des fromages fait le plus souvent suite à celle du tank, les chèvres excrétrices pouvant alors constituer l'une des sources principales de contamination. D'autres sources de contamination susceptibles d'être incriminées ont néanmoins pu être également mises en évidence. Parmi celles-ci figurent le portage cutané des mamelles, les biofilms présents dans les installations de traite et, de manière beaucoup plus exceptionnelle, le portage humain (en l'occurrence, observation d'une identité de souche entre une chèvre infectée et le portage nasal d'un producteur). En pratique, le typage des souches peut permettre, selon les exploitations, de formuler des hypothèses sur les sources principales de contamination du lait et des fromages et d'envisager des moyens d'action différents selon la source incriminée.

Pour mettre en place des plans de contrôle adaptés et ciblés, la recherche des animaux infectés constitue un point clé. De ce point de vue, la possibilité de recourir à des tests ELISA pour dépister de manière spécifique les individus excréteurs semble intéressante. Les essais entrepris en vue de l'évaluation d'un test ELISA en élevage caprin ont bénéficié de l'expérience acquise chez la vache laitière. Trois préparations antigéniques ont été testées. L'une d'entre elle a été écartée au vu des résultats obtenus tant chez la vache laitière que chez la chèvre. Dans une première étape, les seuils de positivité ont été définis intra-troupeaux. Dans ce cas, les meilleurs résultats sont obtenus avec l'antigène 3 sur des laits dilués, en définissant un seuil de positivité situé à la moyenne plus un écart-type après avoir écarté les 3 chèvres présentant les plus fortes valeurs de densité optique : on atteint ainsi 84 % de sensibilité et 82,6 % de spécificité. Un tri préalable des chèvres sur la base des numérations cellulaires (seuil fixé à 750 000 cellules par ml) est envisageable mais subordonne la détection des chèvres infectées à la qualité du ciblage : amélioration de la spécificité qui atteint alors 91 % au détriment de la sensibilité (78 %). Dans une seconde étape, la possibilité de définir un seuil universel, valable pour toutes les exploitations a été évaluée. Dans ce cas, le recours à l'antigène 4 doit être privilégié. Cette dernière solution, davantage compatible avec l'automatisation de la technique

(lecture et interprétation des résultats de densité optique), donne des résultats inférieurs tant de sensibilité que de spécificité (77 à 78 %). Pour autant, ces résultats sont encourageants. La valeur prédictive positive de l'ELISA (61 % lors de l'application d'un seuil universel) est en effet extrêmement supérieure à celle que peut avoir un test fondé sur les numérations cellulaires : sur la foi d'un seul comptage cellulaire, la valeur prédictive positive en cas de dépassement d'un seuil de 1 750 000 cellules par ml est de 14 % environ pour une sensibilité de 71 % et une spécificité de 72 %. Malgré un contexte de faible prévalence des infections à *S. aureus* (cas général dans l'espèce caprine), l'ELISA pourrait donc constituer un outil d'aide à la décision tout à fait pertinent. Son développement nécessite de préciser différentes stratégies d'utilisation prenant en compte les caractéristiques de l'encadrement technique des élevages (adhésion ou non au contrôle laitier) et la nature des informations disponibles (résultats d'autocontrôles, disponibilité des numérations cellulaires,...) et de les évaluer à grande échelle.

Sur le plan de la transformation, l'étude s'est attachée à identifier et évaluer des écosystèmes laitiers précocement inhibiteurs de la croissance de *S. aureus*. Les laits potentiellement inhibiteurs ont été recherchés selon 2 voies : observations de terrain en élevages fermiers ou analyse, en laboratoire, du comportement relatif des laits après inoculation contrôlée d'une souche de *S. aureus* (tests de lactofermentations et réalisation de micro-fabrications). En ce qui concerne le dispositif dit « d'observation », un élevage ayant un lait susceptible d'être inhibiteur pour *S. aureus* a été identifié. Malheureusement, l'éleveur a décidé d'arrêter toute production en septembre 2004... Par défaut, ont donc été sélectionnés les producteurs fermiers dont les laits ont répondu aux critères de sélection établis pour les producteurs laitiers inclus dans le dispositif expérimental soit : moins de 3 dépassements du seuil de 200 ufc/ml et aucun dépassement de 500 ufc/ml sur une période d'environ 30 mois. Les informations transmises par les entreprises laitières ont permis de sélectionner une cinquantaine d'exploitations caractérisées par la régularité de leurs bons résultats de dénombrement en *S. aureus* sur les laits. Le protocole de test a été adapté afin de tenir compte de la réalité de la contamination des laits de tank. Il a notamment été nécessaire de recourir à des souches marquées (présence d'un marqueur de résistance à un antibiotique) pour rendre possible le dénombrement différentiel des souches de *S. aureus* présentes dans les laits testés (souches natives vs souche inoculée).

A l'issue d'une phase de prospection initiale sur les laits de 55 troupeaux, un ensemble de laits ont été jugés potentiellement inhibiteurs. Leur fréquence est relativement élevée : 6 laits identifiés soit de l'ordre de 10 % des laits préalablement sélectionnés sur leurs historiques de contamination par *S. aureus*. Ces résultats permettent d'attester de l'existence d'écosystèmes laitiers naturellement inhibiteurs de *S. aureus*.

Le potentiel inhibiteur des laits s'est avéré d'expression variable d'une exploitation à l'autre, sur le plan quantitatif (amplitude de « l'inhibition ») et qualitatif (nature des souches inhibées, précocité de l'inhibition). Pour une exploitation donnée, il évolue également au cours du temps (variabilité d'une lactation à une autre et au sein d'une même campagne) suite, vraisemblablement, aux variations de l'écosystème microbien d'une année à l'autre en relation notamment avec les changements de structure (renouvellement) et de conduite du troupeau. Il peut s'exprimer vis-à-vis de tout ou partie des souches de *S. aureus* : quatre des six laits considérés comme les plus prometteurs en 2004 ont ainsi permis de limiter la croissance tant des souches natives de *S. aureus* que de la souche inoculée, témoignant d'une certaine polyvalence.

L'étude conjointe du potentiel inhibiteur et des profils d'acidification des laits montre que malgré le rôle effectif de l'acidification pour limiter la croissance de *S. aureus*, le caractère inhibiteur des laits n'est pas systématiquement lié à leur capacité acidifiante. L'évolution des courbes d'acidification au cours du temps n'est pas non plus prédictive d'un changement d'expression du potentiel inhibiteur.

Le recours à des laits inhibiteurs permet de limiter la croissance de *S. aureus* d'environ une à trois unités logarithmiques par rapport à celle qui pourrait être observée avec des laits non inhibiteurs. Ce

phénomène d'inhibition est plus marqué en fabrication présure (y compris dans les conditions les plus à risque, c'est-à-dire à 36°C et en présence d'une faible quantité de ferments) qu'en fabrication lactique. Il permet le plus souvent de maintenir la population de *S. aureus* en deçà de 10⁵ ufc/ml. Un effet « seuil » a néanmoins été décrit lors des essais conduits à l'ITPLC. Il semble alors qu'au-delà de 1000 ufc/ml, les laits inhibiteurs ne soient plus en mesure de jouer un rôle suffisant pour limiter la croissance de la population de *S. aureus* et obtenir des produits conformes sur le plan réglementaire. Dans ces conditions, la production d'entérotoxines est possible. Dans la présente étude, elles n'ont cependant été trouvées que dans les fromages de type présure, fabriqués à partir d'un lait non inhibiteur, après inoculation d'une souche entérotoxigène de type A (biotype non connu) à raison de 1000 ufc/ml et pour une population maximale de *S. aureus* ayant atteint plus de 1,1 10⁶ ufc/g. Ces résultats confirment à la fois la moindre entérotoxigénicité des souches de type C, habituellement rencontrées dans l'espèce caprine, comparativement à celles de type A, et l'intérêt de disposer de laits inhibiteurs en transformation.

La caractérisation des laits inhibiteurs et non inhibiteurs tant du point de vue de la présence des inhibiteurs naturels (lactoferrine et lactopéroxydase/thiocyanate) que sur le plan microbiologique a été rendue possible grâce aux mises au point méthodologiques réalisées dans le cadre des travaux exploratoires conduits sur la dynamique des écosystèmes à la station expérimentale du Pradel. La quantification des composants à activité antimicrobienne ne permet pas de discriminer les deux types de laits. L'étude des écosystèmes microbiens a en revanche permis, de proposer l'hypothèse de l'intervention de certains lactocoques dans l'expression du potentiel inhibiteur des laits, la production de peroxyde d'hydrogène permettant alors l'activation du système lactopéroxydase. Des investigations doivent être poursuivies pour valider cette hypothèse.

Sur le plan plus général de la dynamique des écosystèmes, l'étude confirme que l'image des communautés microbiennes est dépendante des méthodes mises en œuvre (biais liés soit aux modalités de culture des micro-organismes, soit aux méthodes d'extraction et d'amplification). Aussi s'avère-t-il nécessaire d'approcher la structure des communautés microbiennes en écosystème complexe par la combinaison de méthodes culture dépendante et culture indépendante. La description des écosystèmes microbiens s'est notamment appuyée sur la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), méthode permettant d'établir un profil microbien de la flore dominante des laits et dont les résultats, semi-quantitatifs, doivent être interprétés en terme d'équilibre entre populations.

D'un point de vue descriptif, 42 espèces de bactéries et 10 espèces de levures différentes ont été identifiées reflétant la diversité de composition de la communauté microbienne du lait cru de chèvre. Sur le plan dynamique, on observe une stabilité de la composition microbienne au sein d'une période de production donnée et son instabilité à l'échelle d'une année de lactation. Des changements dans les équilibres microbiens ont été observés dans des laits collectés à différentes périodes. Ces résultats témoignent d'un effet saison résultant lui-même de la combinaison de plusieurs effets : régime alimentaire, état physiologique et conditions météorologiques, sur les communautés microbiennes du lait. L'incidence des pratiques ou conduites d'élevage est délicate à mettre en évidence en raison d'une part, de la concomitance des changements zootechniques (changements alimentaires, mouvements d'animaux, ...) et physiologiques (saisonnalité de la production) et d'autre part, de la survenue d'événements sporadiques pour lesquels il n'a pas toujours été possible de disposer conjointement d'informations sur les écosystèmes en nombre suffisant. L'alimentation semble néanmoins jouer un rôle marqué sur l'évolution des flores microbiennes.

Des variations significatives des quantités de lactopéroxydase selon les périodes de régimes alimentaires ont été observées. Ainsi, le potentiel antimicrobien le plus important lié au système lactopéroxydase se situe vraisemblablement aux périodes « Chèvrerie d'hiver » et « pâturage sur graminées », périodes où la concentration en thiocyanate est la plus élevée par opposition aux périodes de « pâturage sur légumineuses » ou de « chèvrerie en période estivale ». L'augmentation des teneurs en lactoferrine est en revanche graduelle au cours de la lactation : passage de 138 – 164 mg/l selon les

années à plus de 400 mg/l au moment du tarissement. Des différences significatives en lactoferrine dans les laits ont été observées. Toutefois la question est posée de savoir si ces différences sont de nature à influencer sur la capacité du lait à inhiber *S. aureus* sachant que sa sensibilité à la lactoferrine (bovine) est souche dépendante. Les travaux conduits à ce jour ne permettent pas de le déterminer. Seule peut être présagée l'absence de caractère limitant du système lactoperoxydase (par conséquent disponible et activable) dans l'expression d'un éventuel potentiel inhibiteur.

Le travail réalisé tant au niveau de la production que de la transformation ouvre de nombreuses perspectives sur le plan de la maîtrise de la contamination par *S aureus*. En élevage, il serait nécessaire de poursuivre l'identification des sources de contamination possibles, de les quantifier afin de les hiérarchiser et de pouvoir construire une démarche diagnostique susceptible d'être proposée aux éleveurs dès lors que le seul dépistage des animaux infectés s'avère insuffisant pour parvenir à une maîtrise des niveaux de contamination du lait ou des produits par *S. aureus*. Le repérage des animaux excréteurs peut lui-même être optimisé en recourant à l'ELISA. Pour faciliter son développement sur le terrain et optimiser les stratégies d'utilisation pressenties au cours de ce programme, il semble souhaitable qu'une validation à grande échelle puisse être réalisée.

A l'échelle de la transformation, la présence de laits inhibiteurs a été mise en évidence. Cependant la variabilité de l'expression de leur potentiel et la difficulté à définir les facteurs de variation impliqués rendent nécessaires la poursuite de travaux de recherche dans ces différents domaines. En particulier, les mécanismes présidant à l'inhibition nécessitent d'être décrits et les flores ou composants à activité antimicrobienne identifiés tant qualitativement que quantitativement. Les travaux actuellement en cours en vue du développement de méthodes de PCR quantitatives concernant certaines des espèces de lactocoques mises en évidence dans le cadre de cette étude, vont dans ce sens.

Sommaire

Introduction – Objectifs de l'étude	13
Chapitre 1 Evaluation des risques de contamination par <i>S. aureus</i> en filière caprine	14
A. Matériel et méthodes	15
1 Evaluation de la contamination par <i>S. aureus</i> des laits et des fromages en filière caprine.	15
1.1 Evaluation de la contamination des laits de tanks et de citernes par <i>S. aureus</i>	15
1.1.1 Typologie des producteurs en fonction des niveaux de contamination des laits de tank	15
1.1.2 Dynamique des niveaux de contamination des laits de tank au cours du temps	16
1.1.3 Analyse croisée des profils de producteurs sur les numérations cellulaires et les germes totaux	16
1.2 Relation entre niveaux de contamination en SCP des laits de tanks et des fromages	16
2 Appréciation des risques d'entérotoxigénèse	17
2.1 Recherche d'entérotoxines dans les fromages (INRA de Poligny)	17
2.2 Caractérisation génomique de souches de <i>S. aureus</i> (INRA de Nouzilly)	17
3 Typage et traçabilité des souches de <i>S. aureus</i> (INRA de Nouzilly et INRA d'Aurillac)	18
3.1 Nature des prélèvements réalisés	18
3.2 Collection d'isolats	19
3.3 Méthode d'analyse	19
B. Résultats	20
1 Evaluation des niveaux de contamination des laits de tank et des citernes	20
1.1 Analyse descriptive des données obtenues sur les laits de citernes	20
1.2 Analyse descriptive des données obtenues sur les laits de tank	23
1.3 Typologie des producteurs en fonction de la dynamique de la contamination des laits de tank	25
1.3.1 Classification des élevages - années	25
1.3.2 Définition des profils d'élevages sur les 5 ans de suivi	30
1.4 Dynamique des niveaux de contamination des laits de tank au cours du temps	33
1.5 Analyse croisée des profils de producteurs sur les numérations cellulaires et les germes totaux	35
1.5.1 Analyse croisée avec la typologie des producteurs fondée sur les numérations cellulaires	35
1.5.2 Analyse croisée avec la typologie des producteurs fondée sur les germes totaux	36
2 Relation entre niveaux de contamination par <i>S. aureus</i> des laits et des fromages	38
2.1 Sélection des exploitations et nature des prélèvements	38
2.2 Résultats de contamination par <i>S. aureus</i> des laits et des fromages	38
3 Evaluation des risques d'entérotoxigénèse	41
3.1 Recherche des entérotoxines dans les fromages	41
3.2 Caractérisation génomique des souches de <i>S. aureus</i>	43
4 Typage et traçabilité des souches de <i>S. aureus</i>	46
4.1 Prévalence de la contamination par <i>S. aureus</i> selon le site de prélèvement	46
4.2 Diversité des souches	47
4.3 Origine de la contamination des laits de tank et des fromages	48
4.4 Persistance de la contamination par <i>S. aureus</i>	50
C. Discussion	50
D. Conclusions et perspectives	55
Chapitre 2 Evaluation d'un test ELISA pour le dépistage des chèvres infectées par <i>S. aureus</i>..	57
A. Matériel et méthodes	58
1 Sélection des exploitations et réalisation des échantillons	58
2 Principe et réalisation du test	58
3 Evaluation des possibilités d'adaptation du test aux conditions d'encadrement et de suivi de la filière caprine	59
3.1 Ciblage préalable des chèvres présumées infectées	59
3.2 Evaluation du recours à un seuil universel de positivité	60
3.3 Evolution des densités optiques (DO) des laits provenant de chèvres d'un même élevage au cours du temps	60
3.3.1 Protocole d'étude	60
3.3.2 Traitement des données	60
B. Résultats	61

1	Evaluation de l'ELISA en élevages caprins	61
1.1	Evaluation en élevage en l'absence de sélection des exploitations sur des critères sanitaires (2004)	61
1.2	Evaluation dans des élevages sélectionnés sur l'existence d'autocontrôles positifs (2005).....	62
2	Adaptation des conditions de mise en œuvre de l'ELISA.....	65
2.1	Détermination des méthodes de dépistage des chèvres infectées par <i>S aureus</i> appliquées sur le terrain..	65
2.2	Ciblage préalable des chèvres à partir des résultats de numérations cellulaires	66
2.3	Evaluation d'un seuil universel de positivité.....	68
3	Etude de la variabilité des densités optiques de laits d'animaux prélevés à plusieurs reprises	69
3.1	Etude descriptive des densités optiques par plaque et date de contrôle	69
3.2	Relation entre densités optiques, statut sanitaire et numérations cellulaires.....	70
3.3	Analyse des variations intra- et inter- individus.....	71
C.	Discussion.....	71
Chapitre 3 Dynamique des écosystèmes microbiens des laits et des fromages		73
A.	Matériel et méthodes.....	73
1	Conduite du troupeau à la station expérimentale du Pradel.....	73
1.1	Conduite alimentaire	73
1.2	Saisonnalité de la production : définition de périodes de production	74
1.3	Enregistrements des données zootechniques	75
1.4	Enregistrements en fromagerie.....	75
2	Prélèvements et échantillonnage	75
3	Analyse microbiologique des laits	76
4	Collection d'isolats.....	76
5	Description des communautés microbiennes	77
5.1	Identification d'isolats (Annexe 3.3)	77
5.2	Identification des clones.....	78
6	Description des équilibres microbiens (Annexe 3.4).....	78
7	Evolution des molécules à activité antimicrobienne au cours de la lactation.....	80
7.1	Système lactoperoxydase	80
7.2	Lactoferrine	80
8	Traitement des données.....	81
8.1	Variabilité des caractéristiques des flores microbiennes des laits et des fromages	81
8.2	Influence des facteurs zootechniques sur les flores microbiennes.....	82
8.3	Etude de la dynamique des écosystèmes microbiens au cours du temps.....	83
B.	Résultats	83
1	Description des écosystèmes des laits de chèvre	83
1.1	Caractéristiques bactériennes des laits de chèvre.....	83
1.1.1	Sélectivité des milieux de culture	83
1.1.2	Diversité bactérienne des laits de chèvre.....	84
1.2	Diversité des levures des laits de chèvre.....	85
1.3	Teneurs en molécules à activité microbienne dans les laits de chèvre	85
1.3.1	Système lactopéroxydase	85
1.3.2	Lactoferrine.....	87
2	Variabilité des flores microbiennes des laits et des fromages	88
2.1	Exploration de la flore microbienne des laits de tank.....	88
2.1.1	Effet de la période	88
2.1.2	Effet du type de lait.....	90
2.2	Exploration de la flore microbienne des fromages.....	91
2.3	Corrélation entre les flores des laits et des lactosérums.....	92
3	Influence des facteurs zootechniques sur les flores microbiennes.....	92
3.1	Incidence de l'alimentation	92
3.2	Incidence des modalités de lavage de l'installation de traite adoptées après la traite du soir	95
4	Dynamique des écosystèmes microbiens au cours du temps.....	96
4.1	Effet de la période de prélèvement sur les niveaux de flore des laits (2005).....	96
4.2	Effet de la période sur les profils SSCP V3 des ADNr 16S des laits	97
4.3	Effet de la période sur les profils SSCP V4 des ADNr 18S des laits	99
C.	Discussion.....	101

Chapitre 4 Recherche et efficacité des écosystèmes des laits de chèvre inhibiteurs de la croissance de <i>S. aureus</i>	105
A. Matériel et méthodes.....	106
1 Recherche d'écosystèmes laitiers inhibiteurs de <i>S. aureus</i>	106
1.1 Sélection des exploitations.....	106
1.2 Evaluation du potentiel inhibiteur des laits de troupeau.....	106
1.2.1 Protocoles des tests de lactofermentations (Figure 1).....	107
1.2.2 Analyses réalisées.....	108
1.3 Définition du potentiel inhibiteur des laits testés.....	110
2 Evaluation de la stabilité du potentiel inhibiteur des laits au cours du temps.....	111
3 Relation entre les caractéristiques et l'aptitude à l'acidification des laits et leur potentiel inhibiteur.....	112
3.1 Relation entre capacité acidifiante des laits et potentiel inhibiteur.....	112
3.2 Relation entre indicateurs de la qualité des laits et potentiel inhibiteur.....	113
4 Evaluation du potentiel inhibiteur des laits en transformation fromagère.....	114
4.1 Protocole expérimental.....	114
4.2 Analyses réalisées.....	114
4.3 Traitement des données.....	115
5 Evaluation de la robustesse du potentiel inhibiteur des laits selon les conditions d'inoculation.....	116
5.1 Protocole expérimental.....	116
5.2 Recherche des entérotoxines.....	116
5.3 Traitement des données.....	116
5.3.1 Etude de la relation dose – réponse en lactofermentations.....	117
5.3.2 Etude des effets « dose » et « souche » en lactofermentations.....	118
6 Evaluation de la robustesse du potentiel inhibiteur des laits en technologie sensible.....	119
7 Comparaison des écosystèmes des laits en fonction de leur caractère inhibiteur.....	119
7.1 Comparaison des flores microbiennes des laits.....	119
7.1.1 Description des flores des laits.....	119
7.1.2 Quantification des espèces de lactocoques (<i>Lactococcus lactis lactis</i> , <i>Lactococcus lactis cremoris</i> et <i>Lactococcus garvieae</i>) par PCR en temps réel.....	120
7.2 Teneurs en composés antimicrobiens naturels.....	121
B. Résultats.....	121
1 Identification des laits de troupeaux présentant un potentiel inhibiteur vis-à-vis de <i>S. aureus</i>	121
1.1 Première série de lactofermentations : étape de prospection initiale.....	121
1.1.1 Evaluation des conditions expérimentales.....	121
1.1.2 Evaluation du potentiel inhibiteur vis-à-vis des souches natives de <i>S. aureus</i>	122
1.1.3 Evaluation du potentiel inhibiteur vis-à-vis de la souche marquée de <i>S. aureus</i>	123
1.1.4 Evaluation du potentiel inhibiteur vis-à-vis de l'ensemble des souches de <i>S. aureus</i>	124
1.2 Résultats des essais de lactofermentations conduits en 2005 et 2006.....	125
2 Evaluation de la stabilité du potentiel inhibiteur des laits au cours du temps.....	128
2.1 Typologie des modalités de croissance des souches de <i>S. aureus</i>	128
2.2 Evaluation de l'adéquation entre statut inhibiteur des laits et croissance de <i>S. aureus</i> en 2004.....	130
2.3 Evaluation du caractère prédictif du statut inhibiteur des laits défini en 2004 sur les croissances de <i>S. aureus</i> observées ultérieurement.....	131
3 Relation entre les caractéristiques et l'aptitude à l'acidification des laits et leur potentiel inhibiteur.....	131
3.1 Incidence des caractéristiques des laits sur leur potentiel inhibiteur.....	131
3.1.1 Incidence des caractéristiques physico-chimiques des laits sur l'expression de leur potentiel inhibiteur.....	131
3.1.2 Historique de contamination des laits et potentiel inhibiteur.....	131
3.2 Incidence de l'aptitude à l'acidification des laits sur leur l'expression de leur potentiel inhibiteur.....	132
3.2.1 Modélisation des courbes d'acidification.....	132
3.2.2 Incidence du profil d'acidification sur la croissance de la souche de <i>S. aureus</i> inoculée.....	134
3.2.3 Incidence du profil d'acidification sur la croissance de l'ensemble des souches de <i>S. aureus</i>	135
4 Evaluation du potentiel inhibiteur des laits en transformation fromagère.....	138
4.1 Comportement inhibiteur des laits au cours des fabrications réalisées en 2005.....	138
4.1.1 Niveaux de contamination et condition d'inoculation des laits testés.....	138
4.1.2 Croissance de <i>S. aureus</i>	138
4.1.3 Caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques des laits mis en oeuvre.....	140
4.2 Comportement inhibiteur des laits au cours des fabrications réalisées en 2006.....	140
4.3 Etude du caractère prédictif des lactofermentations pour estimer l'évolution de <i>S. aureus</i> dans les fromages.....	142

4.3.1	Analyse descriptive de la croissance de <i>S. aureus</i> 24 heures après inoculation	142
4.3.2	Prédiction de la croissance dans les fromages	143
5	Robustesse du potentiel inhibiteur vis à vis des conditions d'inoculation	144
5.1	Suivi de la croissance de <i>S. aureus</i> selon les conditions d'inoculation.....	144
5.1.1	Mise en œuvre des tests de lactofermentations.....	144
5.1.2	Mise en œuvre des essais en fabrications	147
5.2	Recherche d'entérotoxines dans les fromages.....	152
5.3	Evaluation de l'effet dose-réponse.....	153
5.3.1	Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de la souche marquée inoculée	153
5.3.2	Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de l'ensemble des souches de <i>S. aureus</i>	154
5.4	Evaluation de l'incidence de la souche et du niveau d'inoculation sur la croissance de <i>S. aureus</i>	154
5.4.1	Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de la souche marquée inoculée	154
5.4.2	Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de l'ensemble des souches de <i>S. aureus</i>	155
6	Efficacité du potentiel inhibiteur en technologie fromagère sensible	155
7	Comparaison des écosystèmes des laits inhibiteurs et non inhibiteurs.....	157
7.1	Description des écosystèmes microbiens.....	157
7.1.1	Analyses microbiologiques des laits.....	157
7.1.2	Analyses des équilibres microbiens	160
7.1.3	Identification des colonies sur milieu de Turner (Tableau 29).....	161
7.1.4	Quantification par PCR temps réel de <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Lactococcus lactis lactis</i> et <i>Lactococcus lactis cremoris</i> dans les laits et gels de lactofermentation	162
7.2	Détermination des teneurs en antimicrobiens naturels	163
C.	Discussion et conclusions	165
D.	Conclusions et perspectives	171
	Bibliographie	172
	Valorisation – Diffusion	184
	Annexes	185

Introduction – Objectifs de l'étude

La maîtrise de la contamination des produits laitiers par *Staphylococcus aureus*, agent pathogène incriminé dans les toxi-infections alimentaires, responsable de défauts de conformité des fromages, est un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble des filières au lait cru, notamment caprines. Malgré le nombre des travaux réalisés dans ce domaine et ce depuis de nombreuses années, les méthodes et outils mis à la disposition des producteurs ne permettent pas d'assurer la maîtrise des risques de contamination des fromages. En outre, la généralisation de l'antibiothérapie en élevage, l'application de mesures d'hygiène drastiques ne sont pas sans conséquence car susceptibles de favoriser l'émergence de souches antibiorésistantes ou plus virulentes. Il convient donc d'en raisonner l'utilisation plutôt que de la systématiser, de rechercher des méthodes plus respectueuses des équilibres microbiens présents en exploitation, de tirer partie de la diversité microbienne des laits pour préserver les caractéristiques sensorielles des produits tout en cherchant à garantir leur qualité sanitaire.

Une telle approche doit s'appuyer en premier lieu sur une meilleure connaissance des risques à la production et au cours de la transformation et l'identification précise des sources de contamination pour mieux les maîtriser.

Elle demande de plus de développer des outils spécifiques à *S. aureus* (dépistage des chèvres excrétrices notamment) et adaptés à l'espèce caprine.

Si le contrôle du niveau de contamination initial des laits par *S. aureus* et corollairement des infections mammaires est essentiel, il s'avère toutefois insuffisant, dans certaines technologies fromagères sensibles, pour parvenir à maîtriser la qualité sanitaire des produits. Le recours à des souches microbiennes productrices de bactériocines (peptides inhibiteurs), pour prometteur qu'il ait pu paraître, n'a pas donné les résultats escomptés. L'approche privilégiée dans le cadre de cette étude cherche à aborder la compétition microbienne de manière plus globale en prenant en compte la complexité des interactions microbiennes au sein d'écosystèmes. Il s'agit, à ce stade, d'une exploration préliminaire des écosystèmes microbiens des laits de chèvre, plus particulièrement sous l'angle de leur comportement vis-à-vis de *S. aureus*, afin de préparer les stratégies de maîtrise sanitaire de demain...

Le présent programme d'étude a pour objectifs :

- d'apprécier les risques de contamination par *S. aureus* du lait et des fromages en filière caprine, d'identifier les principales sources de contamination, et de caractériser le potentiel entérotoxigène des souches de *S. aureus* isolées ;
- d'explorer de nouveaux outils de maîtrise de la contamination du lait et des fromages :
 - évaluation, dans l'espèce caprine, d'un test ELISA fondé sur la recherche d'anticorps dirigés spécifiquement contre *S. aureus* afin d'améliorer le dépistage des animaux excréteurs et de favoriser le contrôle de ces infections ;
 - identification d'écosystèmes microbiens (incluant les inhibiteurs naturels des laits) susceptibles d'avoir un effet inhibiteur sur la croissance de *S. aureus* pour des souches et dans des conditions technologiques variées.

Chapitre 1

Evaluation des risques de contamination par *S. aureus* en filière caprine

En France, les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) doivent obligatoirement faire l'objet d'une déclaration à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (Ddass) ou à la Direction départementale des services vétérinaires (DDSV). Cette déclaration obligatoire permet d'initier des enquêtes épidémiologiques et vétérinaires destinées à identifier les aliments responsables et les facteurs favorisants afin de prendre des mesures spécifiques pour prévenir les récurrences (Delmas *et al.*, 2007). Si les systèmes de surveillance mis en place permettent de recenser les causes d'intoxications (étiologie) et d'apprécier dans une certaine mesure les conditions de leur survenue, ils ne renseignent que partiellement sur la nature des produits en cause. Ainsi, l'importance relative des produits au lait cru et notamment des fromages à base de lait de chèvre, reste à déterminer faute d'information précise, lors d'intoxication, sur l'origine, la nature et le traitement du lait ou des produits laitiers suspectés (de Buyser *et al.*, 2001). L'évaluation, dans différents pays, de la qualité microbiologique des laits et des fromages met en évidence la fréquence élevée des contaminations par *S. aureus* (Lapeyre, 1999 ; Little et de Louvois, 1999 ; Prado *et al.*, 2001 ; Reyes *et al.*, 1999 ; Sabreen et Abdel-Haleem, 2000 ; Tornadijo *et al.*, 1996). Celle-ci est associée, en France, à une relativement faible présence d'entérotoxines (4,6 % des fromages, 33 % des laits), les fromages de chèvre et de brebis semblant plus à risque que les fromages de vache (Lapeyre, 1999). Une étude italienne (Foschino *et al.*, 2002) fait pourtant état d'une proportion de 23 % seulement de souches entérotoxigènes parmi celles isolées de laits crus de chèvre. Ces résultats se démarquent de ceux généralement établis chez cette espèce qui mentionnent des proportions de souches entérotoxigènes variant entre 62 et 81 % (de Buyser *et al.*, 1987, Rosec, 1999 ; Valle *et al.*, 1990). Ainsi semble t-il nécessaire de préciser la fréquence et la nature de la production des entérotoxines en fonction des niveaux de contamination par *S. aureus* des laits et des fromages de chèvre, ainsi que la corrélation entre la présence de gènes codant des entérotoxines et leur expression phénotypique réelle. Une évaluation complète des risques en terme de santé publique impliquerait également de prendre en compte les limites du dosage des entérotoxines dans les produits laitiers (Lapeyre, 1999) (agrégation aux protéines du lait, difficulté d'extraction), et d'apprécier l'incidence des « nouvelles » entérotoxines (Omoie *et al.*, 2002, Rosec, 1999) dont on estime qu'elles pourraient être à l'origine de 5 % des intoxications staphylococciques (Kokan et Bergdoll, 1987).

Indépendamment de tout enjeu sanitaire qu'il s'agirait de mieux appréhender, la maîtrise de la contamination des fromages par *Staphylococcus aureus* reste un sujet de préoccupation constant pour l'ensemble des filières au lait cru pour des raisons tant économiques que réglementaires (maîtrise de la fréquence des non conformités sur les fromages). La permanence des problèmes rencontrés, malgré le nombre des travaux réalisés dans ce domaine et ce depuis de nombreuses années, témoigne de fait des limites des méthodes et outils mis à la disposition des producteurs et transformateurs. La réduction des risques de contamination dans les fromages repose à la fois sur le contrôle de la contamination en amont et l'application de process technologiques adaptés en aval. En élevage, l'identification des sources de contamination constitue indéniablement un point clé, susceptible de faciliter la mise en œuvre de mesures de contrôle adaptées et ciblées.

Dans ce contexte, nous avons jugé nécessaire de mieux apprécier les risques de contamination par *S. aureus* du lait et des fromages en filière caprine au travers :

- de l'analyse de la contamination des laits et des fromages : recensement des informations enregistrées à l'initiative des entreprises laitières et suivis en exploitations fermières ;
- d'une caractérisation génomique des souches de *S. aureus* et de l'évaluation de leur entérotoxigénicité ;
- de l'identification des sources de contamination par *S. aureus* en élevage.

1 Evaluation de la contamination par *S. aureus* des laits et des fromages en filière caprine.

1.1 Evaluation de la contamination des laits de tanks et de citernes par *S. aureus*

Un ensemble d'informations provenant d'entreprises laitières collectrices en filière « lait cru de chèvre » a été collecté sur l'ensemble de la période 2001 – 2005.

Les informations recueillies proviennent de trois entreprises : Eurial-Poitouraine, Sèvre et Belle ainsi que la fromagerie de Banon. La fréquence des analyses de dénombrement de staphylocoques coagulase positive (SCP) chez les producteurs est extrêmement variable selon les entreprises :

- Eurial-Poitouraine : deux fois par mois ; chez une partie des producteurs, les analyses ont été arrêtées depuis le premier semestre 2004 en raison d'une limitation de la zone collectée en lait cru ;
- Sèvre et Belle : deux à trois fois par an ;
- Fromagerie de Banon : une fois par mois.

Le contrôle des laits de citernes est réalisé en routine. En cas de dépassement d'un seuil fixé à 500 ufc/ml, les laits des producteurs sont analysés à leur tour afin de repérer les exploitations dont les laits de tank sont fortement contaminés. Les informations relatives à ces suivis nous ont été communiquées par Eurial-Poitouraine.

1.1.1 Typologie des producteurs en fonction des niveaux de contamination des laits de tank

Une typologie des producteurs a été réalisée au vu de leurs résultats annuels de dénombrements de SCP puis en tenant compte de l'évolution de leurs résultats au cours de l'ensemble de la période de suivi.

Pour ce faire, quatre classes de contamination des laits de tank en staphylocoques coagulase positive ont été déterminées :

- moins de 100 ufc/ml ;
- entre 100 et 500 ufc/ml ;
- plus de 500 ufc/ml ;
- données manquantes.

Du fait de la fréquence de données manquantes, la typologie a été menée en deux étapes. Les données ont tout d'abord été décomposées en élevages-années : seuls les élevages pour lesquels au moins 12 prélèvements avaient été effectués une année donnée ont été conservés.

Une analyse des correspondances multiples (ACM) a été effectuée pour décrire les données et réduire le nombre de variables. Une classification a ensuite été réalisée sur les 10 premiers axes factoriels de l'ACM. La partition finale a permis de définir des classes d'élevages-années. Pour une année donnée, chaque élevage est affecté à une classe. Les élevages qui, d'une année sur l'autre, restent dans la même classe sont considérés comme ayant un profil de contamination par *S. aureus* stable. A l'inverse, les élevages dont l'affectation change d'une année à l'autre, ont des profils de contamination par *S. aureus* considérés comme variables.

A partir de cette classification initiale, un tableau élevage*année a été établi en renseignant pour une année donnée soit la classe d'appartenance de l'élevage, soit l'information « donnée manquante »

lorsque le profil de l'élevage n'avait pu être établi faute d'informations en nombre suffisant. Comme précédemment, une ACM suivie d'une classification ont été réalisées sur ce tableau de données et ont permis d'obtenir une typologie des élevages en fonction de leur profil de contamination par *S. aureus* sur l'ensemble des cinq années de suivi.

Une analyse de variance a été effectuée afin d'évaluer la proportion de variabilité fixée par la typologie finale.

La variabilité de la contamination des laits de tanks par *S. aureus* a été décomposée en une variabilité entre années, entre classes et entre élevages intra-classe, selon le modèle suivant :

$$y_{kil} = \mu + \alpha_k + \beta_i + \delta_{k(l)}$$

avec y_{kil} : la contamination par *S. aureus* du lait de tank l'année k, pour l'élevage i appartenant à la classe l

μ : l'effet moyen

α_k : l'effet principal de l'année k

β_i : l'effet principal de la classe l

$\delta_{k(l)}$: l'effet principal de l'élevage i hiérarchisé dans la classe l

1.1.2 Dynamique des niveaux de contamination des laits de tank au cours du temps

Une analyse temporelle a été effectuée sur les moyennes géométriques des classes d'élevage-année pour étudier si la contamination des laits en SCP est caractérisée par des auto-corrélations (liaison entre deux valeurs de niveaux de contamination au cours du temps) ainsi que par des variations temporelles (variation saisonnière éventuelle et tendance évolutive globale).

Les classes ont été étudiées de façon dissociée. La stabilité de leur moyenne et de leur variance ont permis de traiter directement les données brutes sans différenciation ni transformation préalable. Le comportement de chaque classe a été décrit et modélisé (modèles ARIMA adaptés à la structure des données au sein de chaque classe).

1.1.3 Analyse croisée des profils de producteurs sur les numérations cellulaires et les germes totaux

La relation entre les niveaux de contamination par des SCP des laits de tank et les autres paramètres de qualité du lait enregistrés en routine (numérations cellulaires et germes totaux) n'a pas été étudiée en tant que telle. L'approche privilégiée a consisté à croiser les profils de producteurs fondés sur les résultats de dénombrements des SCP avec ceux pouvant être établis à partir des autres variables.

Les analyses typologiques sur les germes totaux d'une part et les numérations cellulaires d'autre part ont été réalisées selon des procédures similaires à celles précédemment décrites pour les SCP.

1.2 Relation entre niveaux de contamination en SCP des laits de tanks et des fromages

L'étude de la relation entre les niveaux de contaminations en SCP des laits de tank et des fromages a été réalisée en s'appuyant sur un dispositif d'observation mis en place en exploitations fromagères fermières. Trente huit exploitations fermières, toutes situées en zones d'appellation d'origine contrôlée (AOC) ont été suivies : 10 en AOC Ste Maure de Touraine, 9 en AOC Pélardon, 19 en AOC Banon

(transformation de type présure ou caillé doux, avec pas ou très peu d'ensemencement en ferments lactiques).

Les suivis ont été initiés dans le courant du mois d'avril 2004 avec une périodicité mensuelle. Chaque mois, des prélèvements ont été réalisés sur les laits de troupeau et sur les fromages issus de ces laits. Les dénombrements de staphylocoques coagulase positive ont été réalisés sur milieu spécifique (BP-RPF) par les laboratoires d'analyses de chaque région : Laboratoire de Touraine pour les Ste Maure, LIAL d'Aurillac pour les Pélardon, Laboratoire d'Analyses du Vaucluse pour les Banon.

2 Appréciation des risques d'entérotoxigénèse

2.1 Recherche d'entérotoxines dans les fromages (INRA de Poligny)

A l'occasion des suivis conduits en exploitations fromagères fermières, des échantillons de fromages ont été conservés par les laboratoires d'analyses du Vaucluse (pour les exploitations en AOC Banon) et de Touraine (pour les exploitations en AOC Ste Maure de Touraine). Ils ont été préparés et congelés en attente d'une éventuelle recherche d'entérotoxines. Parmi ceux-ci, 41 avaient une population de staphylocoques à coagulase positive supérieure ou égale à 10^4 ufc/g et ont fait l'objet d'une recherche d'entérotoxines par l'INRA de Poligny.

La recherche d'entérotoxines totales (A à E) a été effectuée à l'aide du kit Transia plate SET. Au préalable, l'extraction des entérotoxines a été réalisée par dialyse-concentration à partir d'un échantillon représentatif de chaque lot de fromages. Puis les échantillons trouvés positifs avec le kit Transia ont fait l'objet d'une détermination du type d'entérotoxines présent à l'aide des kits Ridascreen et Transia ID SEs, le kit Oxoid initialement prévu n'étant pas disponible sur le marché français au moment des analyses.

2.2 Caractérisation génomique de souches de *S. aureus* (INRA de Nouzilly)

Une appréciation du potentiel entérotoxigène des souches de *S. aureus* d'origine caprine a été réalisée au travers de leur caractérisation génomique.

Pour ce faire des analyses ont été conduites :

- sur des souches isolées des laits de chèvres ayant présenté des infections mammaires cliniques ou subcliniques ;
- sur des souches issues de laits de tank ou de fromages.

Les souches de *S. aureus* obtenues sur des laits individuels proviennent pour partie d'une collection constituée par l'INRA de Nouzilly (N = 41) ou ont été isolées des laits des chèvres excrétrices identifiées en 2004 ou 2005 dans les troupeaux suivis pour les besoins de l'étude (typage et traçabilité des souches ou validation du test ELISA). Leur potentiel entérotoxigène a été caractérisé en mettant en évidence la présence des gènes codant les entérotoxines par PCR. Pour 32 d'entre elles, ont en outre été identifiés les allèles du locus de régulation *agr* (Accessory Gene Regulation), locus impliqué dans la régulation temporelle de certains facteurs de virulence (adhésines, toxines,...).

Ont également été considérées les souches de staphylocoques coagulase positive (SCP) recueillies sur les milieux de dénombrement des laits de tank et des fromages prélevés dans le cadre du dispositif d'observation adopté en 2004 (§1.2). Les concernant, une approche globale a été privilégiée. Celle-ci

permet, en travaillant sur des mélanges de souches obtenus par raclage exhaustif des colonies de SCP de se placer au niveau du troupeau et d'évaluer le pourcentage d'exploitations dans lesquelles au moins une souche de staphylocoque coagulase positive est porteuse d'un gène codant une entérotoxine (PCR réalisée avec un extrait ADN matrice correspondant au mélange des ADN de toutes les colonies présentes sur la boîte).

3 Typage et traçabilité des souches de *S. aureus* (INRA de Nouzilly et INRA d'Aurillac)

Cette partie de l'étude a concerné 12 exploitations caprines fermières fabriquant des produits au lait cru de type présure (absence ou apport limité (0,01 à 0,1 %) de ferments lactiques). Ces exploitations ont été suivies en 2004 et, pour deux d'entre elles, en 2005.

3.1 Nature des prélèvements réalisés

L'isolement de souches de *S. aureus* à partir des laits de tank et des fromages a fait suite au dénombrement des SCP sur ces matrices.

Des prélèvements complémentaires ont été effectués en vue du typage des souches. Ils ont été réalisés en milieu de lactation et ont concerné :

- l'animal et l'environnement de la traite ;
- l'homme (trayeur et/ou fromager).

Sur l'animal, ont été réalisés :

- des analyses bactériologiques sur les laits de demi-mamelles de l'ensemble des chèvres en lactation afin de détecter les animaux excréteurs et de mesurer la prévalence des infections occasionnées par *S. aureus* ;
- des frottis sur les mamelles et les trayons (sondage aléatoire à raison de 25 à 30 % des chèvres par exploitation) à l'aide de chiffonnettes imbibées d'eau peptonée tamponnée à 10 %.

Les laits des chèvres excrétrices ont été congelés en attente de leur analyse. Les frottis ont été congelés en 2004, traités en frais en 2005.

L'environnement en salle de traite a été exploré au travers de deux types de prélèvements :

- Prélèvements d'air de la salle de traite : les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'un aérobiocollecteur mis à disposition par le Centre Fromager de Carmejane. Une quantité d'air fixée à 10 litres a été aspirée en direction d'une boîte de Pétri placée sous le capot de l'appareil (milieu Baird Parker-Rabbit Plasma Fibrinogen : BP-RPF) ; deux prélèvements ont été effectués à hauteur du quai de traite, le premier avant l'arrivée des chèvres en salle de traite et le second en fin de traite. Au delà du typage des souches, il a en effet été jugé important de mesurer les niveaux de contamination de l'air et d'apprécier le rôle contaminant de la machine à traire en fonctionnement (entrées d'air,...) ou de manière plus générale de la traite (gouttelettes de lait en aérosol, mouvements des animaux,...).
- Prélèvements des biofilms susceptibles de s'être constitués à l'intérieur de l'installation de traite : ceux-ci ont été réalisés en début de traite en faisant aspirer 8 litres de lait UHT par les manchons trayeurs et en les faisant circuler dans l'ensemble du circuit de traite ; les analyses ont porté sur un échantillon de ce lait.

Sur l'homme, ont été réalisés des écouvillonnages de la paume des mains et des fosses nasales. Les prélèvements ont été réalisés, pour les trayeurs, avant la traite et pour les transformateurs, avant toute intervention dans la fromagerie.

3.2 Collection d'isolats

Dans les laits de troupeaux ou les fromages, l'absence d'isolement de *S. aureus* est synonyme d'une contamination inférieure au seuil de détection voire nulle. La recherche de *S. aureus* dans les prélèvements de type frottis et écouvillonnages a été réalisée après enrichissement. La collection de souches ainsi réalisée ne constitue pas un échantillon représentatif des souches de *S. aureus*. Pour des milieux faiblement à modérément contaminés, l'ensemble des souches présentes (parfois une seule...) a en effet été mis en collection. Inversement, sur des milieux très contaminés (> 100 ufc/ml ou /g), seule une partie de la population bactérienne a été retenue de manière aléatoire. Il existe donc structurellement dans l'élaboration de l'échantillon une disproportion dans l'origine des souches ainsi que dans le nombre de souches par milieu étudié. Les 454 souches de *S. aureus* mises en collection sont répertoriées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Collection de souches de *S. aureus* en fonction de leur provenance

Producteurs	Chèvres en lactation				Biofilm	Trayeurs / Transformateurs				Laits de tank				Fromages			Total
	Chèvres infectées		Peau des mamelles			Fosses nasales		Mains		P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	
	2004	2005	2004	2005		2004	2005	2004	2005	2004			2005	2004			
1	2		0		0	0		0		0	0	0		0	2	4	8
2	3		0		1	0		0		8	2	0		13	4	3	34
3	0		0		0	0		2		0	0	0		11	1	3	17
4	1		0		10	0		0		6	1	1		1	7	7	34
6	1		2		1	4		3		1	2	0		6	8	16	44
8	2	4	4	12	0	2	8	0	0	8	1	0	20	2	2	6	71
10	1		0		0	0		0		0	5	9		2	8	8	33
12	6		0		0	2		0		8	2	4		15	10	9	56
14	1	1		4			0		0				5				11
17	3		0		0	0		0		9	7	3		11	3	6	42
18	1		0		0	0		0		5	2	0		3	3	5	19
20		7		25			8		0				45				85
Total	21	12	6	41	12	8	16	5	0	45	22	17	70	64	48	67	454

P1, P2, P3 : prélèvements réalisés en avril, mai et juin-juillet 2004 ; P4 : prélèvements réalisés en juin-juillet 2005

3.3 Méthode d'analyse

Une première série de typages, réalisée par REP-PCR (Jersek *et al.*, 1999) (165 souches de 5 exploitations), a mis en évidence une relative diversité des souches de *S. aureus* en élevage : répartition en 23 groupes REP à 80 % de similitude. En pratique, la REP-PCR s'est cependant révélée moins discriminante et moins répétable que prévu pour *S. aureus*. Un essai comparatif entre plusieurs méthodes de typage a de ce fait été conduit sur 20 souches, sélectionnées sur leurs profils REP-PCR : IRTF (Infra Rouge à Transformation de Fournier) et MLVA (Multiple Locus Variable Number Tandem Analysis : analyse de répétitions en tandem en nombre variable) ont été testées. L'IRTF ne permettant pas une bonne discrimination des souches de *S. aureus*, la méthode MLVA (Sabat *et al.*, 2003) a été appliquée sur l'ensemble de la collection d'isolats.

La méthode MLVA s'appuie sur l'existence, dans certaines régions intra- ou intergéniques, de séquences nucléotidiques répétées en tandem. Le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre, ce qui permet de réaliser des empreintes d'ADN spécifiques d'individu.

Pour le typage des souches de *S. aureus*, 5 TRs (Tandem Repeat), localisés au sein des gènes *clfA*, *clfB* (clumping factor A et B), *coa* (gène codant la coagulase), *fnb* et *SAV1078*, ont été amplifiés par PCR (Gilbert *et al.*, 2006) et les produits ont été ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (Annexe 1.1). La présence ou l'absence du gène *sak* codant la staphylokinase a également été étudiée en tant que marqueur potentiel des souches de biotype humain.

Les images des gels ont été analysées à l'aide du logiciel Bionumerics puis comparées entre elles pour chaque TR en prenant en compte la taille des fragments obtenus par PCR. L'étude des gels a été réalisée en appliquant la méthode UGPM (Sneath and Sokal, 1973) avec calcul de l'indice de Jaccard et optimisation des paramètres d'analyse tels que le pourcentage d'optimisation et la tolérance.

Pour chaque TR, les allèles (caractérisés par des nombres différents de répétitions et par conséquent une taille de fragment différente) ont été définis avec un pourcentage d'homologie fixé à 90 %. Les souches ont par la suite été caractérisées par un profil MLVA (combinaison des allèles obtenus pour chaque TR) ainsi que par la présence ou l'absence du gène *sak*.

B. Résultats

1 Evaluation des niveaux de contamination des laits de tank et des citernes

1.1 Analyse descriptive des données obtenues sur les laits de citernes

L'entreprise Eurial-Poitouraine organise annuellement 14 à 16 tournées de collecte. Chaque tournée rassemble les laits de 15 à 81 producteurs (en moyenne : 35 producteurs par tournée). Les résultats relatifs aux tournées organisées entre 2001 et 2005 ont été explorés en vue d'apprécier les niveaux de contamination des citernes, leur évolution au cours du temps, la fréquence des citernes jugées fortement contaminées (>500 ufc/ml) ainsi que la répartition des résultats des producteurs en cas de citerne contaminée.

En 5 ans (2001 à 2005), 703 tournées ont donné lieu à des analyses chez les producteurs : 185 en 2001 mais seulement 80 en 2005. Parmi celles-ci, 668 correspondaient effectivement à un niveau de contamination du lait de citerne supérieur ou égal à 500 ufc/ml. Chaque lait de citerne était constitué en moyenne de 18 laits de tank (Tableau 2).

Tableau 2 : Nombre d'analyses de laits de tank réalisées par tournée

Année	Nombre de citernes positives	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
2001	185	18,72	9,04	4	45
2002	167	19,49	9,01	1	44
2003	131	17,09	9,64	1	47
2004	140	15,31	8,27	1	43
2005	80	17,49	6,03	1	29
Total	703	17,78	8,82	1	47

Les niveaux moyens de contamination des citernes (moyenne géométrique) évoluent au cours du temps (Figure 1).

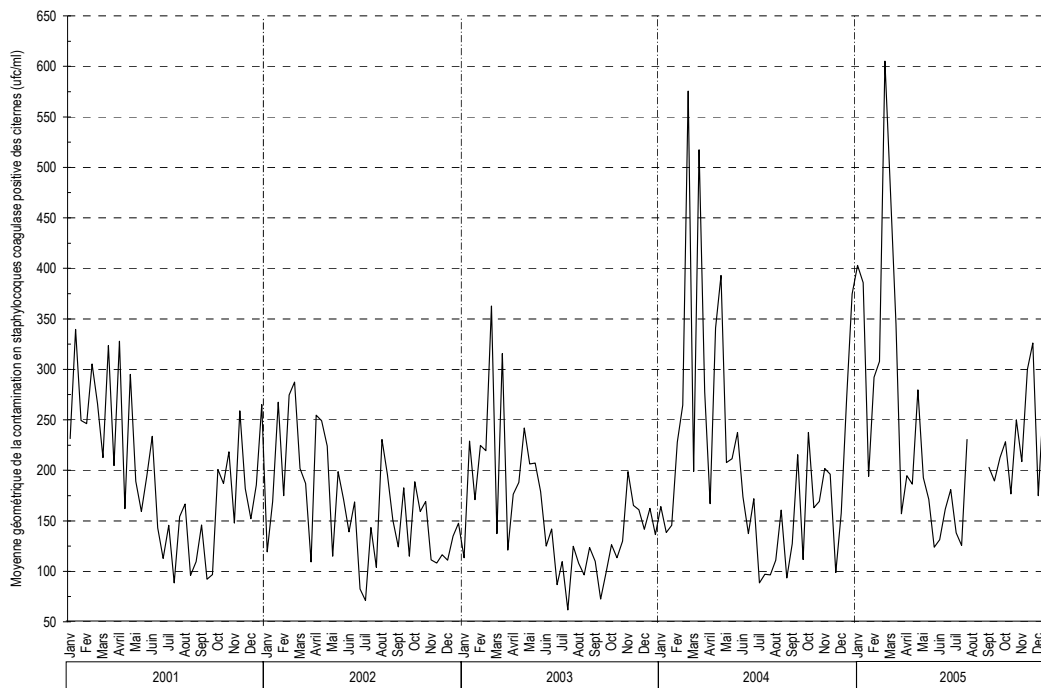


Figure 1 : Evolution du niveau moyen de contamination des citernes au cours du temps (moyenne géométrique en ufc/ml) sur la période 2001-2005.

L'évolution du nombre de citernes positives (>500 ufc/ml) suit celle des niveaux de contamination. Les citernes positives sont les plus nombreuses en janvier, février et mars (Figure 2). Leur nombre diminue ensuite puis s'accroît graduellement à partir d'octobre. La fréquence élevée des contaminations en début d'année peut être associée à des débuts de campagne laitière. De ce point de vue, il pourrait être intéressant de déterminer la fréquence relative des contaminations observées à partir d'octobre associées à des fins de lactation ou, au contraire, survenant dans des troupeaux désaisonnés (début de campagne en septembre-octobre).

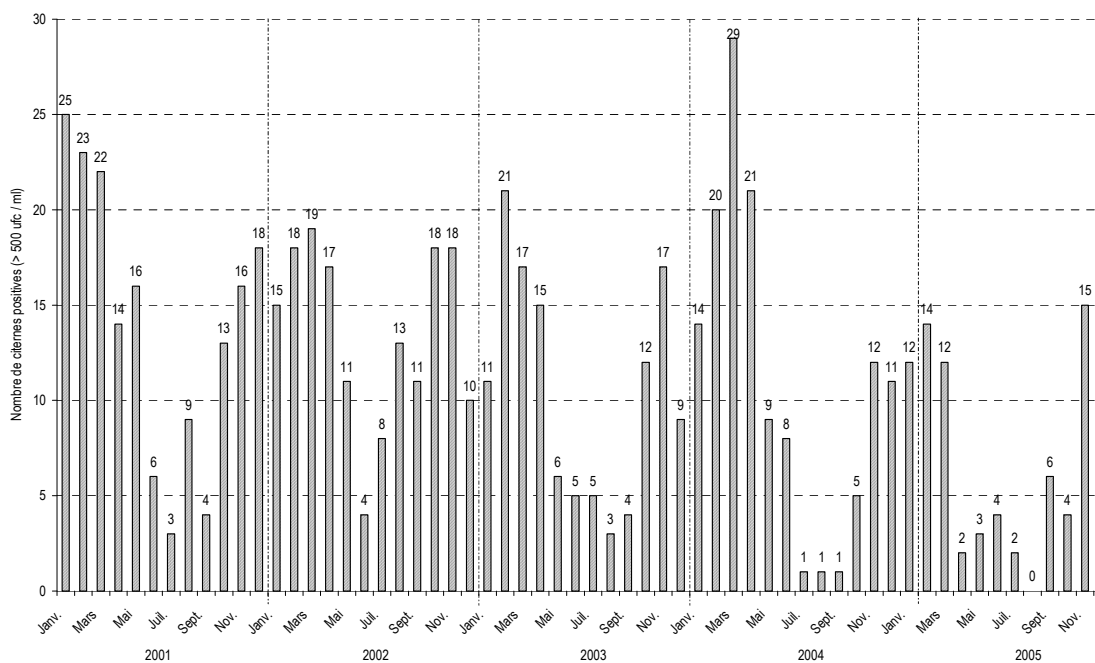


Figure 2 : Evolution du nombre de citernes positives (>500 ufc/ml) sur la période 2001 – 2005

La plupart des citernes ayant donné lieu à des analyses chez les producteurs présentent effectivement des niveaux de contamination supérieurs ou égaux à 500 ufc/ml (Figure 3). Environ 33 % de ces citernes ne dépassent pas 1000 ufc/ml. Près de 34 % présentent des niveaux compris entre 1000 et 2000 ufc/ml (de 31,3 % en 2003 à 42,5 % en 2005). 3 (2002) à 8,6 % (2004) atteignent plus de 10⁴ ufc/ml.

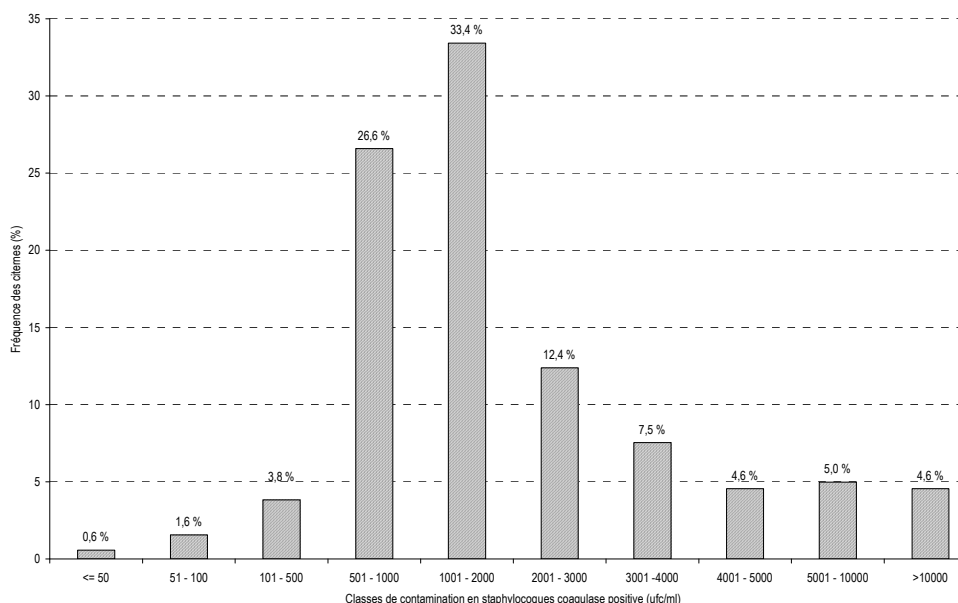


Figure 3 : Distribution du niveau de contamination des citernes (ufc/ml) ayant donné lieu à des analyses chez les producteurs sur la période 2001 - 2005

La distribution des niveaux de contamination des laits de tanks est présentée Tableau 3 selon la classe de niveau de contamination des citernes.

Tableau 3 : Distribution moyenne (fréquences) des résultats des producteurs selon les niveaux de contamination des citernes

Citernes :			Niveaux de contamination des laits des producteurs (ufc/ml)						
Classes de niveau de contamination (ufc/ml)	Effectif		≤ 10	11-50	51-100	101-500	501-1000	1001-5000	>5000
≤ 50	4	Moyenne (%)	60,00	2,86	9,52	21,90	0,00	0,95	4,76
		Ecart type (%)	17,38	4,95	10,03	15,74	0,00	1,65	8,25
51-100	11	Moyenne (%)	55,54	11,54	12,01	14,89	1,80	1,48	2,75
		Ecart type (%)	22,36	9,70	9,45	12,55	3,14	2,94	4,72
101-500	27	Moyenne (%)	38,36	18,17	13,22	19,52	3,02	3,67	4,04
		Ecart type (%)	25,15	11,85	12,75	20,52	5,86	7,03	7,01
501-1000	187	Moyenne (%)	30,56	17,84	16,90	21,47	5,29	3,82	4,12
		Ecart type (%)	14,85	13,25	14,56	11,90	7,08	8,40	4,60
1001-2000	235	Moyenne (%)	29,90	17,89	19,55	19,82	3,93	3,98	4,92
		Ecart type (%)	15,50	13,90	18,13	11,42	7,95	6,50	4,84
2001-3000	87	Moyenne (%)	30,31	16,54	19,76	21,42	3,06	3,15	5,76
		Ecart type (%)	17,66	12,01	17,74	11,27	4,45	4,49	4,77
3001-4000	53	Moyenne (%)	32,89	16,68	21,20	17,55	2,28	3,07	6,33
		Ecart type (%)	17,78	11,40	20,51	10,89	4,19	4,72	4,45
4001-5000	32	Moyenne (%)	33,39	16,77	21,70	16,23	2,09	3,93	5,89
		Ecart type (%)	18,58	13,05	16,38	9,60	3,23	8,91	6,00
5001-10 ⁴	35	Moyenne (%)	32,86	14,93	17,85	18,40	2,79	4,05	9,12
		Ecart type (%)	18,34	13,71	17,28	11,39	5,00	5,94	11,66
> 10 ⁴	32	Moyenne (%)	31,87	21,64	12,93	15,67	5,38	2,90	9,60
		Ecart type (%)	18,52	18,13	14,11	10,59	10,21	4,71	9,83

Quels que soient leurs niveaux de contamination, les citernes positives (>500 ufc/ml) sont constituées de 30 à 33 % de laits de tank peu ou pas contaminés (≤ 10 ufc/ml). A l'opposé, 7,9 à 13,2 % (9,1 % en moyenne) des laits de tank les constituant présentent des niveaux de contamination supérieurs à 1000 ufc/ml. En terme d'effectifs, cela correspond à seulement deux voire trois laits de tank fortement contaminés par citerne positive (Tableau 4).

Tableau 4 : Distribution moyenne des laits de tank constitutifs des laits des citernes positives (> 500 ufc/ml) selon leur niveau de contamination en staphylocoques coagulase positive

Citernes positives (N = 668)	Niveaux de contamination des laits des producteurs (ufc/ml)						
	≤ 10	11-50	51-100	101-500	501-1000	1001-5000	>5000
Fréquences (%)	Moy. \pm Ect. 30,97 \pm 16,29	Moy. \pm Ect. 17,66 \pm 13,47	Moy. \pm Ect. 18,55 \pm 17,03	Moy. \pm Ect. 19,80 \pm 11,45	Moy. \pm Ect. 3,95 \pm 6,93	Moy. \pm 3,69 \pm 6,76	Moy. \pm Ect. 5,40 \pm 5,85
Effectifs	5,65 \pm 4,09	3,27 \pm 3,01	3,28 \pm 3,11	3,59 \pm 2,69	0,65 \pm 0,89	0,60 \pm 0,86	0,91 \pm 0,88
						13,03 \pm 10,11	2,16 \pm 1,51

Moy. \pm Ect : moyenne \pm écart-type

1.2 Analyse descriptive des données obtenues sur les laits de tank

La période étudiée s'étend de janvier 2001 à décembre 2005. Des résultats ont été collectés chez un ensemble de 503 producteurs avec un minimum de 102 résultats et un maximum de 324 résultats disponibles pour un contrôle donné.

Les niveaux de contamination moyens des laits de tank varient au cours du temps (Figure 4). En 2001 et 2002, la moyenne des niveaux de contamination a dépassé 70 ufc/ml pendant une courte période, limitée aux mois de mars et avril. En 2003, des niveaux comparables ont été atteints dès le mois de janvier et ce jusqu'en avril : moyenne comprise entre 72 et 107 ufc/ml. En 2004 et 2005, enfin, la moyenne des niveaux de contamination a été particulièrement élevée sur l'ensemble du premier semestre. Ces résultats corroborent ceux obtenus sur les laits de citernes.



Figure 4 : Evolution du niveau moyen (moyenne géométrique) de contamination des laits de tank (ufc/ml) des producteurs collectés par les entreprises Eurial-Poitouraine et Sèvre et Belle de janvier 2001 à décembre 2005

Plus la moyenne des niveaux de contamination augmente, plus la fréquence des laits contaminés progresse (Figure 5).

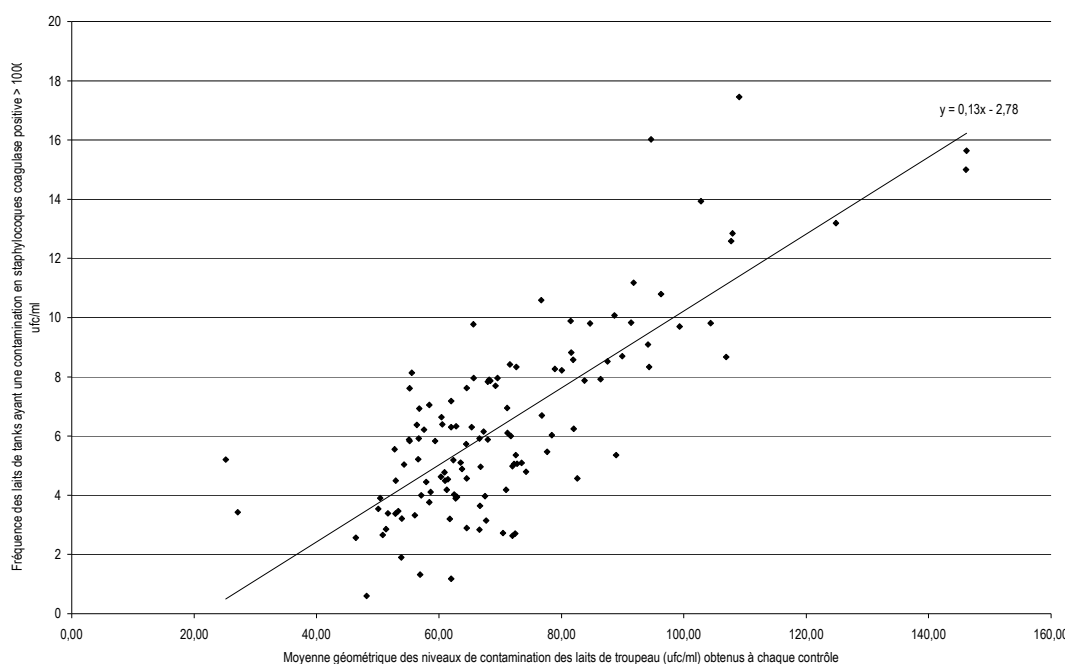


Figure 5 : Relation entre la moyenne géométrique de contamination des laits de tank par contrôle et la proportion de laits supérieurs à 1000 ufc/ml (données obtenues sur la période 2001-2005)

La distribution moyenne des résultats de laits de tank selon leurs niveaux de contamination est présentée Tableau 5 par contrôle et Tableau 6 par campagne laitière. La fréquence moyenne, par contrôle, des laits non ou faiblement contaminés varie de 14 à 19 % (minimum : 7,1 % ; maximum : 29,7 %) ; celles des laits très contaminés (> 1000 ufc/ml) ne dépasse pas 7,5 % (minimum : 0,6 % ; maximum : 16,8 %). La distribution des résultats de contrôle des niveaux de contamination par *S. aureus* des laits de tank, déterminée par campagne laitière (Tableau 6) reflète les mêmes tendances. Pour ne retenir que l'année 2005, la fréquence des laits situés à plus de 1000 ufc/ml a représenté environ 6,3 % des laits analysés. Sur cette même période, les laits compris entre 100 et 1000 ufc/ml ont représenté plus de 36 % des laits contrôlés. Inversement les laits faiblement ou non contaminés (≤ 10 ufc/ml) ont représenté moins de 15 % des laits analysés

Tableau 5 : Distribution moyenne (%) par contrôle des résultats de lait de tank selon leurs niveaux de contamination (classes exprimées en ufc/ml) sur la période 2001-2005

	2001				2002				2003				2004				2005			
	Moy.	Ect.	Max.	Min.	Moy.	Ect.	Max.	Min.	Moy.	Ect.	Max.	Min.	Moy.	Ect.	Max.	Min.	Moy.	Ect.	Max.	Min.
Nb. analyses/ contrôle	236	37	289	146	240	34	282	172	232	33	272	160	176	48	324	116	190	46	302	102
% ≤ 10	18,8	3,6	29,7	12,2	15,8	3,4	21,2	10,8	15,7	3,9	24,4	10,3	13,6	3,4	21,7	7,1	13,8	2,8	19,0	7,5
% 10-100	43,7	6,4	67,1	36,8	42,4	3,0	48,4	36,1	43,5	3,8	50,0	33,2	41,7	5,4	51,6	31,3	40,7	5,0	49,2	30,0
% 100 - 500	28,5	7,1	39,4	8,9	30,7	4,7	38,9	18,7	30,1	5,0	41,3	22,5	32,7	3,9	38,8	24,6	32,8	3,0	38,0	27,7
% 500-1000	3,7	1,6	6,9	0,0	4,4	1,0	5,8	2,6	4,4	1,3	6,9	1,9	5,9	1,8	9,6	3,4	5,0	2,3	11,9	2,0
% >1000	5,3	2,0	8,7	1,9	6,6	2,1	10,8	2,7	6,2	2,8	16,0	2,7	5,9	4,0	15,6	0,6	7,4	3,7	16,8	2,7

Tableau 6 : Distribution moyenne (%) par campagne laitière des résultats de lait de tank selon leurs niveaux de contamination (classes exprimées en ufc/ml) sur la période 2001-2005

	2001	2002	2003	2004	2005
Nombre d'analyses	6129	6229	6043	4773	5093
% ≤10 ufc / ml	18,81	15,27	15,82	14,46	14,47
% 10-100 ufc / ml	43,69	43,71	44,37	43,35	43,28
% 100 – 500 ufc / ml	29,89	31,61	30,90	32,14	31,95
% 500-1000 ufc / ml	3,31	3,92	3,89	5,05	4,46
% >1000 ufc / ml	4,55	5,83	5,44	5,57	6,34

La régularité des niveaux de contamination a été appréciée chez les producteurs contrôlés au mois 6 fois sur une même campagne (Tableau 7). On constate que moins de 2 % d'entre eux produisent des laits systématiquement peu contaminés (à moins de 10 ufc/ml). La proportion d'éleveurs ne présentant aucun résultat supérieur à 100 ufc/ml varie entre 6,9 et 10,3 %. Il est rarissime (<0,5 %) que les résultats se maintiennent au delà de 1000 ufc/ml tout au long de la campagne.

Tableau 7 : Régularité de la contamination des laits de tanks (ufc / ml) par les staphylocoques coagulase positive chez les producteurs disposant de plus de 6 contrôles annuels

	2001		2002		2003		2004		2005	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
Tous cont. < 10	2	0,73	3	1,06	1	0,37	5	2,22	1	0,46
Tous cont. < 50	10	3,64	13	4,61	16	5,90	16	7,11	8	3,70
Tous cont. < 100	27	9,82	29	10,28	26	9,59	20	8,89	15	6,94
Tous cont. < 500	109	39,64	113	40,07	99	36,53	88	39,11	68	31,48
Tous cont. < 1000	147	53,45	151	53,55	135	49,82	118	52,44	98	45,37
Tous cont. > 10	35	12,73	69	24,47	67	24,72	84	37,33	60	27,78
Tous cont. > 50	8	2,91	17	6,03	17	6,27	32	14,22	22	10,19
Tous cont. > 100	2	0,73	10	3,55	10	3,69	11	4,89	9	4,17
Tous cont. > 500	0	0,00	2	0,71	2	0,74	0	0	0	0
Tous cont. > 1000	0	0,00	1	0,35	1	0,37	0	0	0	0

Cont : contrôle

1.3 Typologie des producteurs en fonction de la dynamique de la contamination des laits de tank

1.3.1 Classification des élevages - années

La première analyse réalisée sur les élevages-années (1145 observations) a permis de définir une typologie en 5 classes (R^2 de 0,45 après consolidation) (Tableau 8, Figure 6).

La classe 1 (389 observations) est caractérisée par des niveaux de contamination en SCP inférieurs à 100 ufc/ml).

La classe 2 (334 observations) est caractérisée par des niveaux de contamination en SCP compris entre 100 et 500 ufc/ml ou supérieurs à plus de 500 ufc/ml.

Ces deux classes représentent chacune environ un tiers de l'ensemble des élevages – années (Tableau 8).

La classe 3 (67 observations) est caractérisée par des niveaux de contamination en SCP supérieurs à 500 ufc/ml). Sur l'ensemble de la période 2001 – 2005, elle représente moins de 6 % des observations.

Les classes 4 (90 observations, soit 7,9 %) et 5 (265 observations, soit 23,1 %) sont caractérisées par des niveaux de contamination par *S. aureus* faibles (moins de 100 ufc/ml) et la présence de valeurs manquantes (6 à 7 en moyenne).

Tableau 8 : Caractérisation des classes d'élevages – années en fonction des niveaux moyens de contamination en SCP des laits de tank (moyenne géométrique en ufc/ml) et du nombre moyen de valeurs manquantes

Classes	2001			2002			2003			2004			2005			Tota
	Nb	Moy.1	Moy.2	Nb.	Moy.1	Moy.2	Nb.	Moy.1	Moy.2	Nb.	Moy.1	Moy.2	Nb.	Moy.1	Moy.2	
1	93	28	1,2	84	32	0,7	96	34	1,2	57	37	1,1	59	32	1,6	389
2	73	144	1,7	78	149	1,0	73	145	1,4	49	162	1,5	61	159	1,7	334
3	10	505	3,7	12	838	2,4	17	453	3,6	13	419	1,2	15	518	2,5	67
4	25	41	6,5	26	51	5,5	23	63	6,2	12	45	5,9	4	37	5,3	90
5	66	47	7,1	63	145	6,8	45	41	6,3	31	50	6,6	60	50	7,1	265
Ens.	26	58	3,4	26	66	2,8	25	67	2,7	16	76	2,6	19	74	3,4	114

Nb. : effectif de la classe ; Moy. 1 : Moyenne géométrique de la contamination des laits par *S. aureus*
Moy. 2. : Nombre de valeurs manquantes en moyenne sur 24 prélèvements annuels

Tableau 9 : Répartition des éleveurs-années (1145 observations) par classes et années

Année	Classe 1		Classe 2		Classe 3		Classe 4		Classe 5		Total Effectif
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%	
2001	93	34,83	73	27,34	10	3,75	25	9,36	66	24,72	267
2002	84	31,94	78	29,66	12	4,56	26	9,89	63	23,95	263
2003	96	37,80	73	28,74	17	6,69	23	9,06	45	17,72	254
2004	57	35,19	49	30,25	13	8,02	12	7,41	31	19,14	162
2005	59	29,65	61	30,65	15	7,54	4	2,01	60	30,15	199
Total	389	33,97	334	29,17	67	5,85	90	7,86	265	23,14	1145

Le premier facteur de l'ACM (Figure 6) discrimine principalement les niveaux de contamination des laits en SCP. Les niveaux faibles de contamination (classe 1) s'opposent aux niveaux forts (classe 3) avec, en position centrale, les niveaux modérés (classe 2).

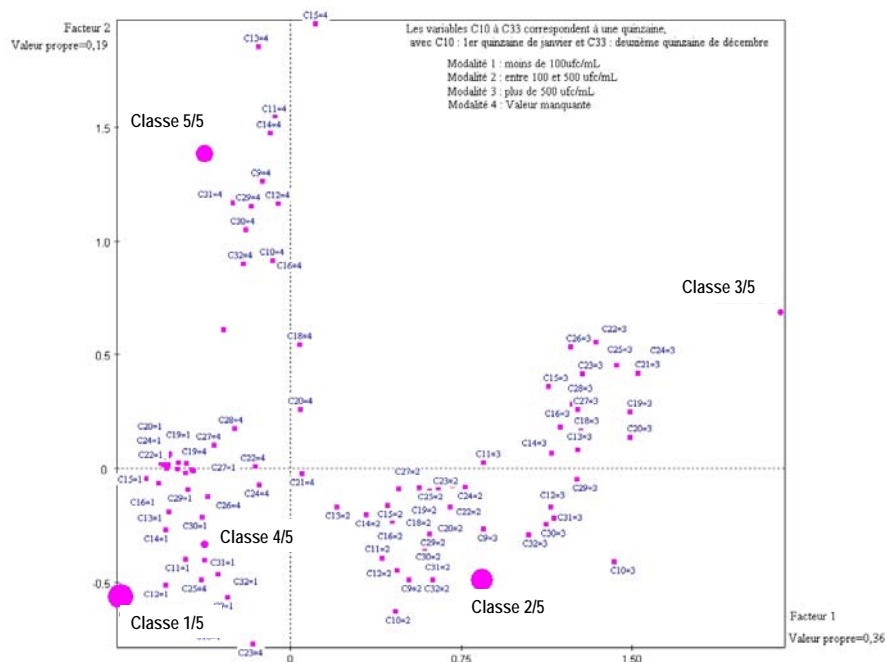


Figure 6 : Variables actives et positions relatives des classes dans le premier plan factoriel de l'ACM

La classe 1 présente un niveau de contamination relativement faible sur l'ensemble de l'année : moyenne géométrique bimensuelle inférieure à 100 ufc/ml et moyenne annuelle inférieure à 50 ufc/ml (Figure 7). Un pic de contamination en SCP est observé annuellement vers mars-avril et est généralement précédé d'un pic de plus faible amplitude en Janvier-Février. La période où les niveaux de SCP sont les plus faibles correspond à la saison automnale. Un plus grand nombre de données sont manquantes de Novembre à Février et de Juillet à Septembre.

La classe 2 a un niveau intermédiaire (environ 100 à 300 ufc/ml) comparativement aux classes 1 et 3, sur l'ensemble de l'année. Un pic de contamination en SCP est observé entre avril et juin selon les années (Figure 8). Ce pic est généralement précédé de deux périodes caractérisées par des niveaux moindres de contamination qui se produisent vers décembre et février (mais peuvent être variables selon les années). La majeure partie des données manquantes sont observées de novembre à mars.

Concernant les niveaux de contamination des laits par *S. aureus*, la classe 3 présente un niveau de contamination supérieur à 300 ufc/ml pendant la majeure partie de l'année, avec de nombreux pics (Figure 9). Il s'agit cependant d'une classe qui comporte peu d'éleveurs et qui, à certaines périodes de l'année, comporte plus d'un tiers de données manquantes. Un ou deux pics de contamination en SCP surviennent généralement au début du printemps (mars à mai) et, certaines années, également à la fin de l'été ou au début de l'automne (août et octobre). Les données manquantes sont concentrées sur une période allant de décembre à mars.

Les classes 4 et 5 sont plus fluctuantes en raison, notamment, du nombre important de données manquantes qu'elles comportent à certaines périodes. Quand les données sont bien renseignées (printemps-été), elles se rapprochent de la classe 1 (moyenne géométrique annuelle inférieure à 50 ufc/ml). La classe 4 se caractérise par une succession de pics de contamination en SCP de faible amplitude tout au long de l'année (Figure 10). Des pics plus importants ont été observés en 2001, 2002, 2004 et 2005 vers octobre - novembre. La classe 5 présente, hormis en 2002, deux pics annuels successifs de contamination en SCP, survenant à la fin de l'hiver, début du printemps (premier pic en février suivi d'un deuxième en avril) (Figure 11). Cette classe a, de novembre à mars, une proportion particulièrement élevée de données manquantes (le plus souvent supérieure à 70%). La classe 4, quant à elle, présente la particularité d'avoir une fréquence accrue de valeurs manquantes (plus de 50%) de fin août à fin novembre.

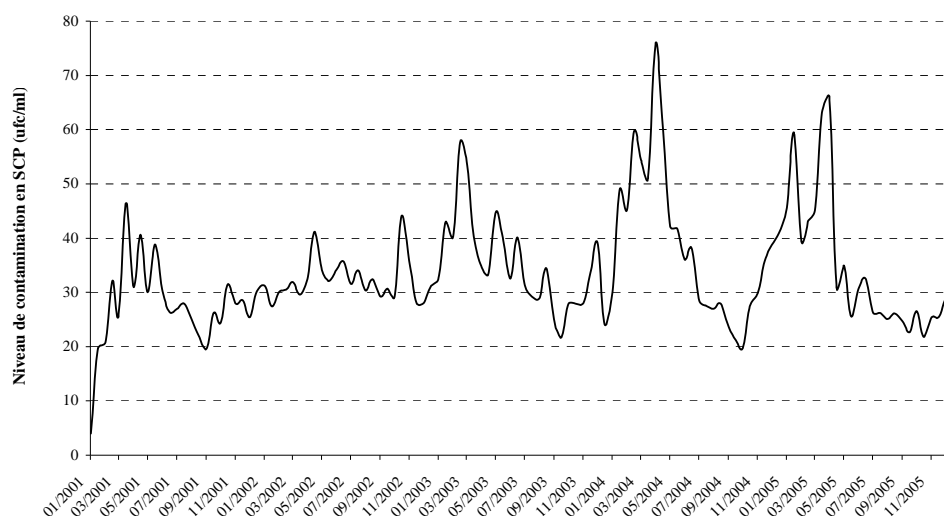


Figure 7 : Evolution du niveau de contamination en SCP (moyennes géométriques en ufc/ml) des éleveurs-années de la classe 1 au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2005)

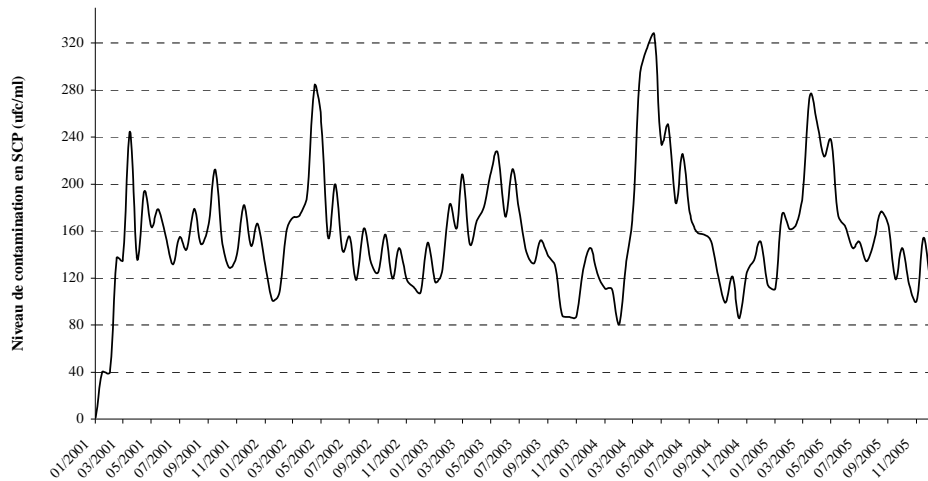


Figure 8 : Evolution du niveau de contamination en SCP (moyennes géométriques en ufc/ml) des éleveurs-années de la classe 2 au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2005)

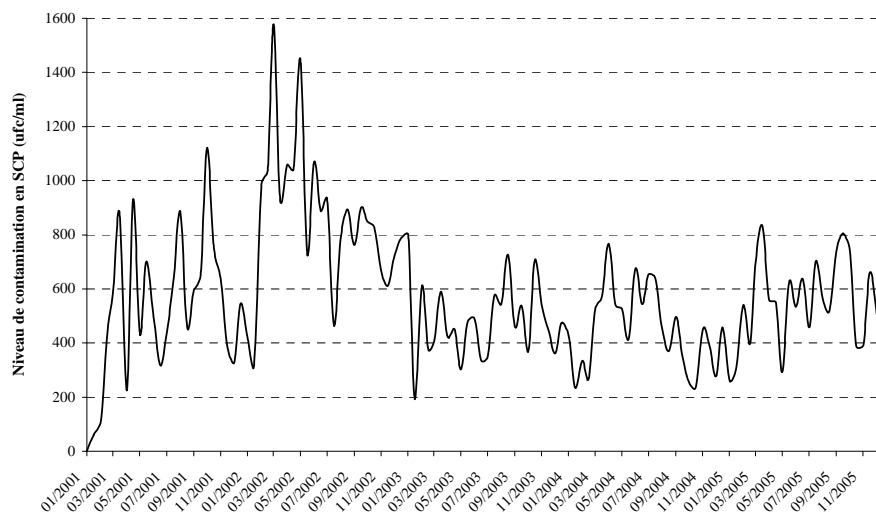


Figure 9 : Evolution du niveau de contamination en SCP (moyennes géométriques en ufc/ml) des éleveurs-années de la classe 3 au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2005)

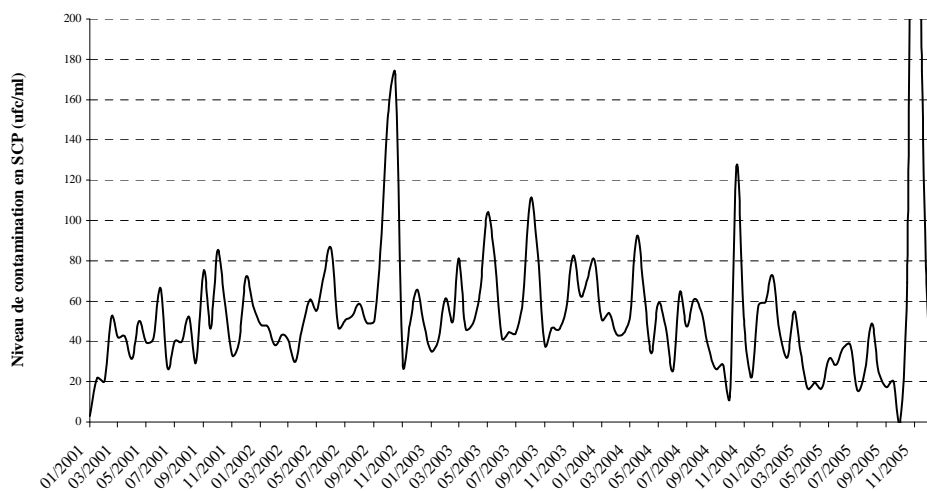


Figure 10 : Evolution du niveau de contamination en SCP (moyennes géométriques en ufc/ml) des éleveurs-années de la classe 4 au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2005)

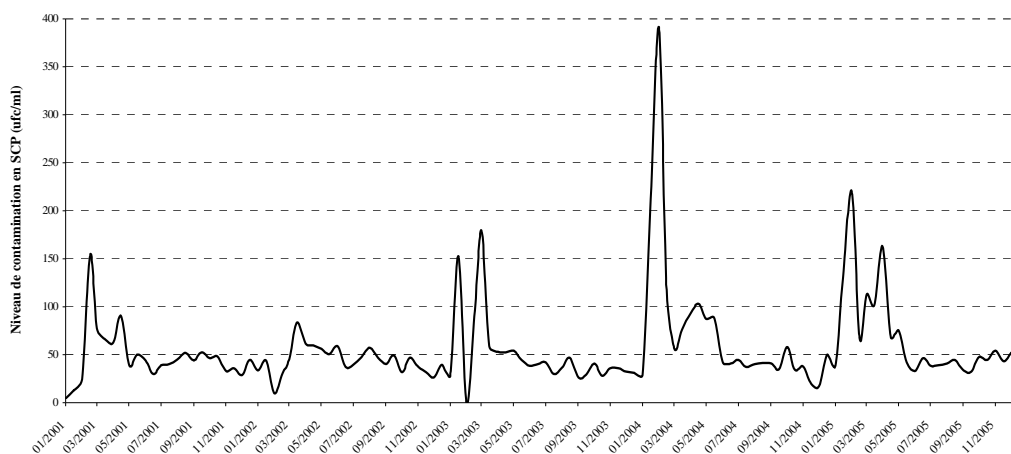


Figure 11 : Evolution du niveau de contamination en SCP (moyennes géométriques en ufc/ml) des éleveurs-années de la classe 5 au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2005)

Une analyse globale sur l'ensemble des éleveurs années sans distinction de classe met en évidence la survenue d'un pic annuel de contamination en SCP vers mars-avril (Figure 12). Les niveaux de contamination les plus faibles sont généralement observés en automne. Les valeurs manquantes se retrouvent principalement de novembre à février.

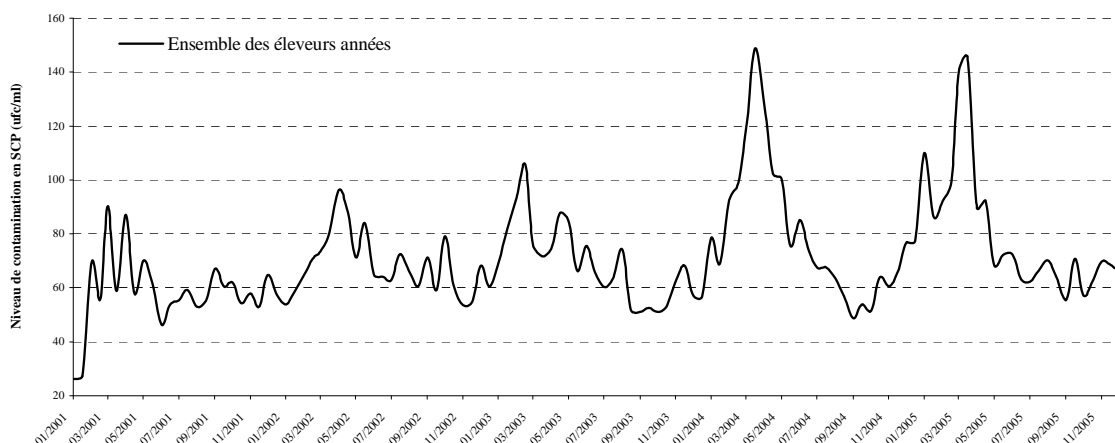


Figure 12 : Evolution du niveau de contamination en SCP (moyennes géométriques en ufc/ml) des éleveurs-années au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2005)

Une simple étude graphique des différentes classes d'éleveurs-années fait apparaître, en tendance, un risque accru de contamination en SCP au début du printemps (mars - avril). La fin de l'automne et le début de l'hiver correspondent par contre à une période où les niveaux de contamination sont relativement plus faibles.

1.3.2 Définition des profils d'élevages sur les 5 ans de suivi

Seuls 329 élevages ont été pris en compte dans l'analyse. En effet, lorsque le nombre de données manquantes était supérieur à 12 pour chacune des années étudiées, les exploitations correspondantes n'ont pu être affectées à aucun groupe. Ces élevages ont été réintroduits par la suite, mais en tant qu'individus illustratifs.

Une typologie des élevages a été réalisée. Six groupes ont été définis (R^2 de 0,52 après consolidation) (Tableaux 10 et 11 ; Figure 13). En décomposant la variabilité de la contamination des laits de tanks par *S. aureus* en une variabilité entre années, entre groupes et entre élevage intra-groupe, la variance expliquée par le groupe par rapport à la variance totale est de 38%.

Le groupe 1 (80 observations) est caractérisé par l'appartenance à la classe 1 en tant qu'éleveur années (faible niveau de contamination en SCP : < 100 ufc/ml). Il s'agit d'élevages dont les profils de contamination des laits de tank sont stables d'une année à l'autre.

Le groupe 2 (72 observations) est caractérisé par l'appartenance aux classes 2 et 3 en tant qu'éleveur années (niveaux de contamination compris entre 100 et 300 ufc/ml voire supérieurs à 300 ufc/ml).

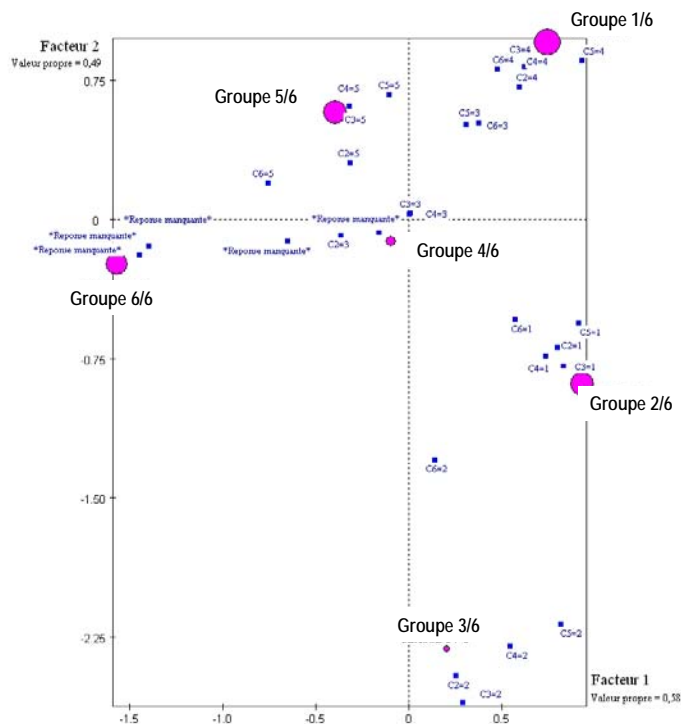
Le groupe 3 (15 observations) est caractérisée par l'appartenance à la classe 3 en tant qu'éleveur années (niveau de contamination supérieur à 300 ufc/ml). Il s'agit d'éleveurs qui présentent, d'une année sur l'autre, des niveaux élevés de contamination des laits de tank.

Les groupes 4 et 5 (28 et 71 observations) sont caractérisés par leur appartenance respective aux classes 4 et 5 en tant qu'éleveur années (niveaux de contamination faibles et présence de données manquantes).

Le groupe 6 (63 observations) est essentiellement caractérisé par l'existence de données manquantes (élevages absents certaines années).

Les éleveurs-années (1 370 observations), pour qui moins de 12 prélèvements au cours d'une année donnée avaient été réalisés ont été réintroduits dans l'analyse en tant qu'individus illustratifs. 96% d'entre eux se rattachent au groupe 5 (niveau de contamination par *S. aureus* faible à modéré et présence de données manquantes - $\mu=145$).

Le premier facteur de l'ACM discrimine principalement les données manquantes. Les élevages présentant des niveaux de contamination faibles en *S. aureus* (Groupe 1) s'opposent, sur l'axe 2, à ceux présentant des niveaux de contamination supérieurs à 300 voire 500 ufc/ml (Groupe 3) avec, en position intermédiaire, les élevages présentant des niveaux de contamination plus modérés (entre 100 et plus de 300 ufc/ml) (groupe 2).



Les variables C1 à C5 correspondent aux années 2001-2005.

Modalités 1 à 5 : Classe d'appartenance suite à la typologie sur les élevages-années

Figure 13 : Variables actives et positions relatives des groupes de la typologie finale dans le premier plan factoriel de l'ACM

Tableau 10 : Caractérisation des groupes d'élevages en fonction des niveaux moyens de contamination en SCP des laits de tank (moyenne géométrique en ufc/ml) et du nombre moyen de valeurs manquantes

	Effectifs	2001		2002		2003		2004		2005	
		Moy1	Moy2	Moy1	Moy2	Moy1	Moy2	Moy1	Moy2	Moy1	Moy2
Groupe 1	80	33	1,6	35	0,7	35	1,8	45	7,8	51	10,7
Groupe 2	72	105	2,2	139	1,1	146	1,5	155	5,4	149	8,2
Groupe 3	15	376	4,2	497	2,7	367	5,9	255	15,5	174	16,6
Groupe 4	28	49	5,4	60	4,9	70	6,0	87	14,6	51	17,4
Groupe 5	71	38	8,5	44	6,6	40	7,3	51	13,1	51	13,0
Groupe 6	63	64	19,5	141	23,4	43	22,8	72	22,3	76	10,2
Ensemble	329	55	7,1	68	6,9	66	7,5	78	12,1	75	11,4

Moy. 1 : Moyenne géométrique de la contamination des laits par *S. aureus*

Moy. 2. : Nombre de valeurs manquantes en moyenne sur 24 prélèvements annuels

Dans chaque groupe, la variabilité des résultats des élevages (maintien ou changement de classes des élevages – années, d'une année à l'autre) est présentée tableau 10 en fonction du nombre d'années de présence dans le tableau de chaque individu.

Dans les 130 élevages présents cinq années consécutives, un à deux changements de classes peuvent être observés (35 et 36 observations respectivement). Le groupe 2 est celui où l'on observe le plus grand nombre de changements. Sur 5 ans, 12 éleveurs ont changé trois fois de classe et 7 quatre fois.

Tableau 10 : Régularité des résultats des élevages (changement ou non de classe d'une année à l'autre) selon le groupe typologique auquel ils appartiennent

Groupe	Nbre an présence	Nombre de changements de classes en tant qu'élevage - année					Total
		0	1	2	3	4	
1	2	2					2
	3	15	5	4			24
	4	3	4	3			10
	5	9	17	14	2	2	44
2	3	5	7	1			13
	4		7	4			11
	5	11	10	8	12	7	48
3	2		3				3
	3	2	2	3			7
	4			1			1
	5	1	1	2			4
4	2	2	2				4
	3	2	7	3			12
	4		1	3	1		5
	5	2	1	3	1		7
5	2	8	4				12
	3	7	5	9			21
	4	4	3	1	3		11
	5	3	6	9	7	2	27
6	1	59					59
	2	1					1
	3		2	1			3
Total		136	87	69	26	11	329

De manière générale, la quantité moyenne d'ufc a tendance à légèrement augmenter au cours des cinq années de suivi (Figure 14).

Le nombre de valeurs manquantes est plus important en 2004 et 2005 (Tableau 10). Ceci peut introduire un biais dans la typologie, notamment pour le profil des élevages dont le niveau moyen en staphylocoques est élevé. Ce groupe d'élevages a en effet un nombre moyen de valeurs manquantes de 16,6 en 2005, contre 11,4 en moyenne pour l'ensemble des groupes.

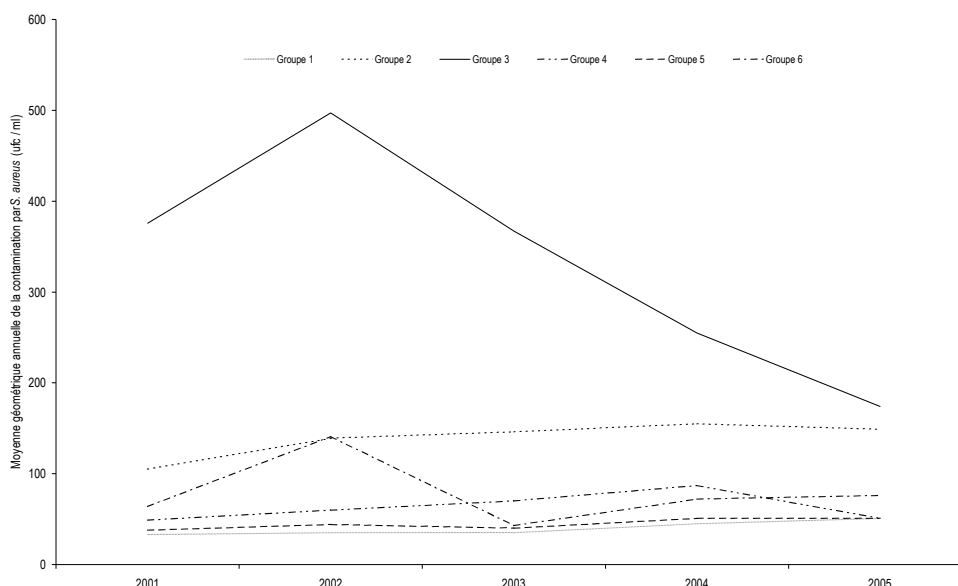


Figure 14 : Evolution au cours du temps des moyennes géométriques annuelles de contamination en SCP des laits de tank obtenues par chaque groupe typologique

1.4 Dynamique des niveaux de contamination des laits de tank au cours du temps

La dynamique des niveaux de contamination en SCP de chaque classe d'éleveurs – années à été décrite à l'aide de différents modèles :

- recours à un modèle ARIMA (1,0,0)(1,0,0)₂₄ pour les classes 1 (faibles niveaux de contamination en SCP : <100 ufc/ml) et 2 (niveaux de contamination intermédiaires : 100 à 300 ufc/ml) : le niveau de contamination observé à un contrôle donné dépend de celui mesuré lors du prélèvement précédent (composante non saisonnière) mais également du niveau observé l'année précédente à même époque (composante saisonnière) ;

Ce modèle peut s'écrire sous la forme suivante :

$$Y_t = c + \phi_1 Y_{t-1} + \Phi_1 Y_{t-24} - \phi_1 \Phi_1 Y_{t-25} + e_t$$

avec c : niveau moyen de contamination en SCP

Y_{t-j} : niveau de contamination en SCP à l'instant t-j

ϕ_1 : coefficient d'auto-régression d'ordre 1

Φ_1 : coefficient saisonnier d'auto-régression d'ordre 1

e_t : terme d'erreur à l'instant t

La part de variance expliquée par ce modèle est de 47 et 48 % respectivement pour les classes 1 et 2.

- recours à un modèle ARIMA (4,0,0) pour la classe 3 (niveaux élevés de contamination en SCP : > 300 voire 500 ufc/ml) : le niveau de contamination observé à un contrôle donné dépend de ceux mesurés au cours des quatre prélèvements précédents (ici, le prélèvement en t-3 apparaît cependant non-significatif) ;

Ce modèle peut s'écrire sous la forme suivante :

$$Y_t = c + \phi_1 Y_{t-1} + \phi_2 Y_{t-2} + \phi_3 Y_{t-3} + \phi_4 Y_{t-4} + e_t$$

avec c : niveau moyen de contamination en SCP

Y_{t-j} : niveau de contamination en SCP à l'instant t-j

ϕ_i : coefficient d'autoregression d'ordre i

e_t : terme d'erreur à l'instant t

La part de variance expliquée par ce modèle est de 34 %.

- recours à un modèle ARIMA (0,0,1)(0,0,1)₂₄ pour la classe 5 (faibles niveaux de contamination en SCP mais nombre de valeurs manquantes élevé) : le modèle prend en compte les moyennes mobiles ; le niveau de contamination observé à un contrôle donné dépend du terme d'erreur du prélèvement précédent (composante non saisonnière) et du terme d'erreur du prélèvement réalisé l'année précédente à la même date (composante saisonnière) ;

Ce modèle peut s'écrire sous la forme suivante :

$$Y_t = c - \theta_1 e_{t-1} - \Theta_1 e_{t-24} + \theta_1 \Theta_1 e_{t-25} + e_t$$

avec c : niveau moyen de contamination en SCP

e_{t-j} : terme d'erreur à l'instant t-j

θ_1 : coefficient de moyenne mobile d'ordre 1

Θ_1 : coefficient saisonnier de moyenne mobile d'ordre 1

e_t : terme d'erreur à l'instant t

La part de variance expliquée par ce modèle est de 23 %.

La série chronologique de données correspondant à la classe 4 apparaît comme un « bruit blanc », ce qui signifie que les variables ne sont pas corrélées entre elles et que la valeur à Y_t n'est pas fonction des valeurs précédentes obtenues à Y_{t-i} .

Une analyse temporelle similaire a également été conduite sur la série de données correspondant à l'ensemble des éleveurs-années sans distinction de classe. Malgré une légère tendance à l'augmentation des niveaux de contamination au cours du temps, la moyenne et la variance sont apparues comme globalement stationnaires. Le comportement de cette série a été décrit par un modèle ARIMA(1,0,0)(1,0,0)₂₄ à l'instar de ce qui avait été réalisé pour les classes 1 et 2 : niveau de contamination à un contrôle donné fonction de celui obtenu au contrôle précédent (composante non saisonnière) et dépendant du niveau observé l'année précédente à la même date (composante saisonnière). Le R^2 ajusté de ce modèle est de 56%.

L'analyse des séries temporelles des classes d'éleveur-année n'a révélé au sein de chacune des classes aucune tendance évolutive marquée sur les cinq ans de suivi. Pour deux classes (1 et 2), les modèles qui s'ajustent le mieux comprennent un effet retard d'ordre 1 (fonction de la valeur précédente) et une saisonnalité d'un an (fonction des valeurs de l'année précédente).

Pour la classe 3 correspondant aux niveaux les plus élevés de contamination en SCP, le modèle qui s'ajuste le mieux comporte une effet retard d'ordre 4. Plus précisément, la valeur en t dépend des valeurs en t-1, t-2 et t-4. Enfin pour les deux dernières classes (4 et 5) qui comportent un nombre important de valeurs manquantes, la modélisation est impossible pour l'une d'entre elles (données trop aléatoires) et de mauvaise qualité pour l'autre (R^2 de 23%).

1.5 Analyse croisée des profils de producteurs sur les numérations cellulaires et les germes totaux

L'analyse croisée des profils de producteurs selon leurs résultats de numérations cellulaires, germes totaux et SCP a concerné 466 producteurs de lait de chèvre. Bien que la fréquence des prélèvements soit en principe bimensuelle, le nombre d'analyses effectivement réalisées est variable d'un producteur à un autre et certains d'entre eux peuvent présenter des séries de données incomplètes en partie ou en totalité pour certains mois et/ou certaines années.

1.5.1 Analyse croisée avec la typologie des producteurs fondée sur les numérations cellulaires

Les numérations cellulaires des laits de chèvre sont plus faibles de mars à juin (Figure 15) et marquées par une certaine saisonnalité. Elles sont relativement stables d'une année à l'autre.

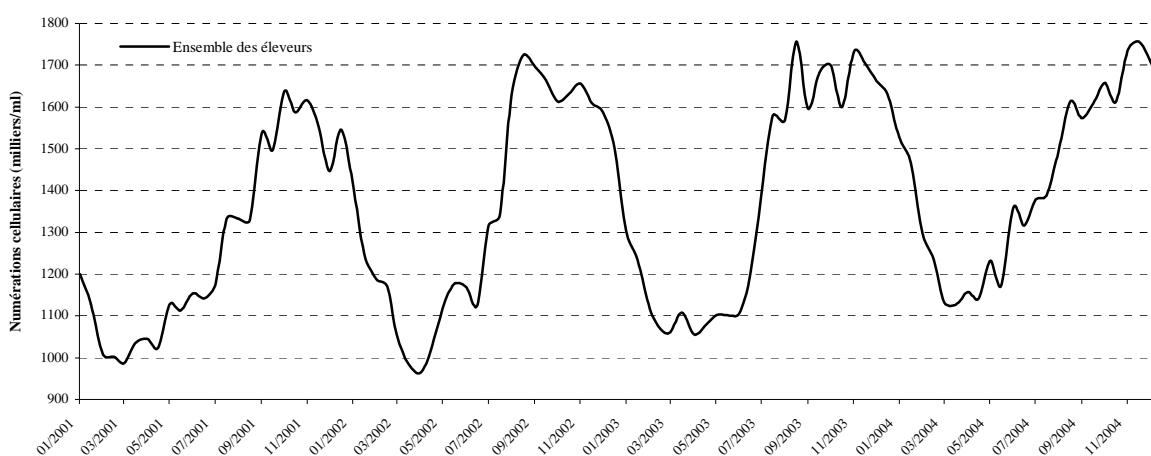


Figure 15 : Evolution de la moyenne géométrique des numérations cellulaires (milliers par ml) au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2004)

Six classes de numérations cellulaires auxquelles il faut rajouter une classe de « valeur manquante » ont été définies :

- moins de 750 000 cellules/ml ;
- de 750 000 à 1 million de cellules par ml ;
- de 1 à 1,25 millions de cellules par ml ;
- de 1,25 à 1,50 millions de cellules par ml ;
- de 1,50 à 2 millions de cellules par ml ;
- plus de 2 millions de cellules par ml.

Parmi les 1864 éleveurs-années (466 éleveurs * 4 années) *a priori* disponibles, seuls ceux pour lesquels au moins 12 prélèvements avaient été effectués l'année k ont été conservés, soit 955 éleveurs-années (51%) correspondant à 299 éleveurs. 167 éleveurs (36%) n'ont donc pas été pris en compte dans les analyses du fait d'un nombre trop élevé de données manquantes.

La première analyse réalisée sur les 955 observations éleveur-année a permis de définir une typologie en 8 classes (R^2 de 0,53 après consolidation) (Figure 1 et Tableau 1 en Annexe 1.1). La seconde analyse réalisée cette fois sur le tableau des éleveurs a conduit à une typologie en 9 groupes réalisée sur les 10 premiers facteurs de l'analyse en correspondances multiples qui restituaient 58% de l'information. Le R^2 de la typologie est de 0,65 après consolidation. Les groupes d'éleveurs peuvent être caractérisés comme suit (Figure 2 et tableau 2 en Annexe 1.1) :

- Groupe 1 : numérations cellulaires généralement inférieures à 750 00 cellules/ml ;

- Groupe 2 : numérations cellulaires généralement inférieures à 1 million de cellules/ml ;
- Groupe 3 : numérations cellulaires comprises entre 0,75 et 1,25 millions de cellules/ml ;
- Groupe 4 : numérations cellulaires comprises entre 1,25 et 2 millions de cellules/ml ;
- Groupe 5 : plus de 1,5 millions de cellules/ml ;
- Groupe 6 : plus de 2 millions de cellules/ml et présence de valeurs manquantes ;
- Groupe 7 : présence de valeurs manquantes et numérations cellulaires comprises entre 0,75 et 1,5 millions de cellules/ml ;
- Groupes 8 et 9 : présence de valeurs manquantes en nombre élevé (absence au cours de certaines années pour le groupe 9).

Une analyse descriptive de la dynamique des résultats de numérations cellulaires au cours du temps fait apparaître leur augmentation progressive à partir de juillet pour des maxima atteints vers la fin novembre. L'analyse temporelle des séries chronologiques (moyennes géométriques par groupe d'éleveurs sur l'ensemble de la période de suivi) témoigne de manière générale d'un lien entre le prélèvement réalisé au contrôle t, le prélèvement réalisé au contrôle précédent t-1 et les valeurs obtenues aux mêmes dates au cours de l'année précédente (composante saisonnière) (Annexe 1.2).

Les groupes définis en fonction des niveaux de contamination en SCP ont été comparés à ceux établis à partir des données de numérations cellulaires (Tableau 3 en Annexe 1.2). Cette comparaison a pu être effectuée pour 289 éleveurs sur 299. Les données coïncident pour les groupes caractérisés par la présence de valeurs manquantes. Les élevages présentant moins de 750 000 cellules/ml ont généralement un niveau de contamination faible en SCP (<100 ufc/ml). Pour les niveaux intermédiaires sur le plan des numérations cellulaires, les élevages se répartissent entre les groupes présentant une contamination en SCP faible (< 100 ufc/ml) à intermédiaire (100 à 300 ufc/ml). Le fait d'avoir des niveaux élevés de numérations cellulaires ne semble aucunement associé à des niveaux de contamination élevés en SCP (> 500 ufc/ml).

Le coefficient de corrélation de Spearman entre les deux classifications est de 0,47 ($p < 0,001$). Néanmoins, cette corrélation est en grande partie due aux groupes caractérisés par un nombre élevé de valeurs manquantes. En supprimant les élevages présents une seule année, la corrélation n'est plus que de 0,37 ($p < 0,001$). Il n'existe donc pas de lien apparent entre profils de numérations cellulaires et profils de contamination en SCP.

1.5.2 Analyse croisée avec la typologie des producteurs fondée sur les germes totaux

Sur les quatre ans de suivi, une diminution de la quantité de germes totaux apparaît.

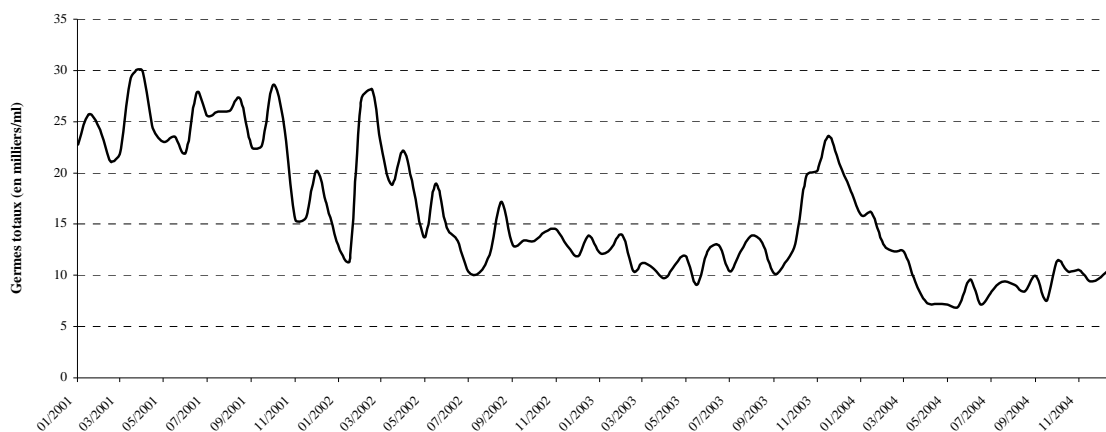


Figure 16 : Evolution de la moyenne géométrique des germes totaux (milliers par ml) au cours du temps (pas de temps bi-mensuel sur la période 2001 - 2004)

Il ne semble pas y avoir de cyclicité ou de pics saisonniers contrairement à ce qui était observé pour les niveaux de contamination en SCP ou les numérations cellulaires.

Quatre classes de niveaux de contamination en germes totaux auxquelles il faut rajouter une classe de « valeur manquante » ont été définies :

- moins de 10 000 germes totaux/ml ;
- de 10 000 à 20 000 germes totaux/ml ;
- de 20 000 à 30 000 germes totaux/ml ;
- plus de 30 000 germes totaux/ml.

La première analyse réalisée sur le tableau des éleveurs-années (957 observations) a permis de définir une typologie en 9 classes (R^2 de 0,53 après consolidation). (Figure 1 et Tableau 1 en Annexe 1.3). La seconde analyse réalisée cette fois sur le tableau des éleveurs a conduit à une typologie en 6 groupes (R^2 de 0,46 après consolidation). Les groupes d'éleveurs peuvent être caractérisés comme suit (Figure 2 et tableau 2 en Annexe 1.3) :

- Groupe 1 : caractérisé par des niveaux en germes totaux inférieurs à 20 000 ufc/ml ;
- Groupe 2 : caractérisé des niveaux en germes totaux supérieurs à 20 000 ufc/ml ;
- Groupe 3 : caractérisé par l'existence de valeurs manquantes et des niveaux en germes totaux de moins de 20 000 ufc/ml ;
- Groupe 4 : caractérisé par l'existence de valeurs manquantes et des niveaux en germes totaux compris entre 10 000 et 30 000 ufc/ml ;
- Groupe 5 : caractérisé par l'existence de valeurs manquantes et des niveaux en germes totaux supérieurs à 30 000 ufc/ml ;
- Groupe 6 : caractérisée par les éleveurs présents une seule année sur la période de suivi et par la fréquence élevée des valeurs manquantes.

Les groupes définis en fonction des niveaux de contamination en SCP ont été comparés à ceux établis à partir des données de germes totaux (Tableau 3 en Annexe 1.3). Cette comparaison a pu être effectuée pour 290 éleveurs sur 300. Les données coïncident pour les groupes caractérisés par la présence de valeurs manquantes. Les élevages présentant moins de 20 000 germes totaux/ml ont généralement un niveau de contamination faible en SCP (< 100 ufc/ml). Pour les niveaux intermédiaires en germes, les élevages se répartissent entre les groupes présentant une contamination en SCP intermédiaire à élevée (de 100 à 300 ufc/ml, voire plus de 500 ufc/ml).

Le coefficient de corrélation de Spearman entre les deux classifications est de 0,51 ($p < 0,001$). Néanmoins, cette corrélation n'est pas due aux groupes caractérisés par un nombre élevé de valeurs manquantes comme c'était le cas pour les numérations cellulaires. En supprimant les élevages présents une seule année, la corrélation reste stable (0,51 avec $p < 0,001$).

Les profils en germes totaux des élevages suivent de manière générale les profils définis à partir des résultats de contamination en SCP : niveaux de contamination faibles en SCP (< 100 ufc/ml) pour les éleveurs ayant peu de germes totaux (< 20 000 germes/ml) ; niveaux de contamination intermédiaires à élevés en SCP (100 – 300 ufc/ml et au delà) pour les éleveurs ayant plutôt plus de 20000 germes/ml..

2 Relation entre niveaux de contamination par *S. aureus* des laits et des fromages

2.1 Sélection des exploitations et nature des prélèvements

En transformation lactique, les éleveurs réalisant deux fabrications par jour ont été privilégiés afin de pouvoir recueillir le lait de mélange avant adjonction du lactosérum. Ont ensuite été considérées les exploitations pour lesquelles le lait du soir a été reporté sans prématuration (température de stockage inférieure à 10°C et absence d'ensemencement). Il s'agit plus particulièrement d'élevages appartenant à la zone Pélardon. En ce qui concerne le Banon, tous les producteurs fermiers ont été intégrés à l'étude. En pratique, parmi les 19 exploitations existantes, deux ont réalisé des produits de type lactique et non présure. Cela a également pu arriver périodiquement à quelques producteurs qui ont ainsi géré soit les demandes de leur clientèle, soit de mauvais résultats de contamination vis à vis de *S. aureus*.

Des analyses sur les laits et les fromages issus de ces laits ont été réalisées. Les fromages de type lactique ont été collectés dans les 48 heures après emprésurage. Ce délai, en principe porté à 72 heures en transformation présure a pu atteindre 96 heures chez les producteurs ne fabriquant du Banon qu'en milieu de semaine.

La durée des campagnes laitières a différé d'une région à l'autre avec des productions plus ou moins saisonnées. Ainsi les suivis des troupeaux en Ste Maure de Touraine se sont poursuivis jusqu'en décembre. Dans la zone Pélardon, les producteurs fermiers ont, pour la plupart, achevé leur campagne en octobre / novembre. En ce qui concerne le Banon, la production a été interrompue dès la fin du mois de septembre.

2.2 Résultats de contamination par *S. aureus* des laits et des fromages

L'expression des résultats de contamination des laits diffère légèrement selon les laboratoires avec un seuil inférieur pouvant être fixé à 10 ou 20 ufc/ml.

Sur l'ensemble du suivi, 66 % des laits (N= 167) ont été peu ou pas contaminés (< 20 ufc/ml), environ 62 % des fromages (N= 159) ont présenté un niveau de contamination inférieur à 10^3 ufc/g (42,7 % en deçà de 100 ufc/g) (Figures 17 et 18).

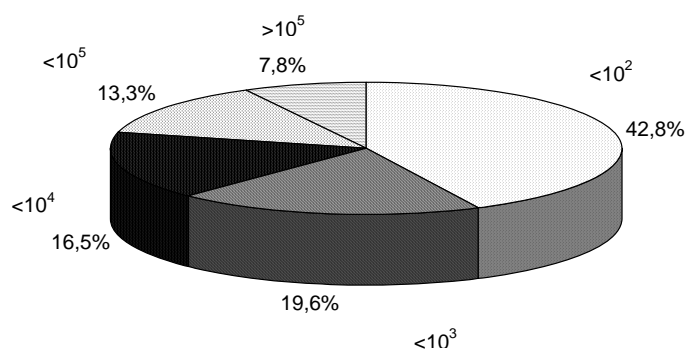
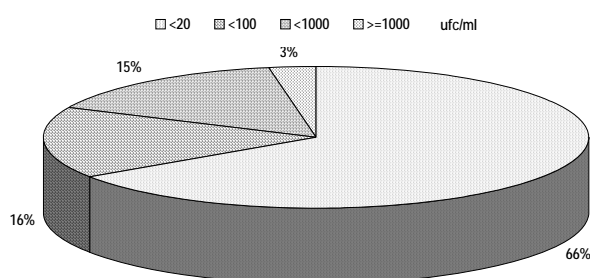


Figure 17 : Distribution des niveaux de contamination des laits de mélange (ufc/ml)

Figure 18 : Distribution des niveaux de contamination des fromages (ufc/g)

Ces résultats globaux masquent cependant à la fois des variations de niveaux de contamination au cours du temps (Figures 21 et 22) et d'une zone de production à l'autre (Figures 19 et 20).

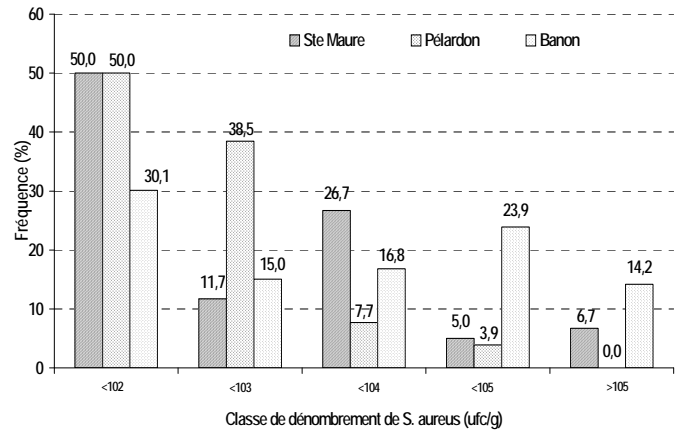
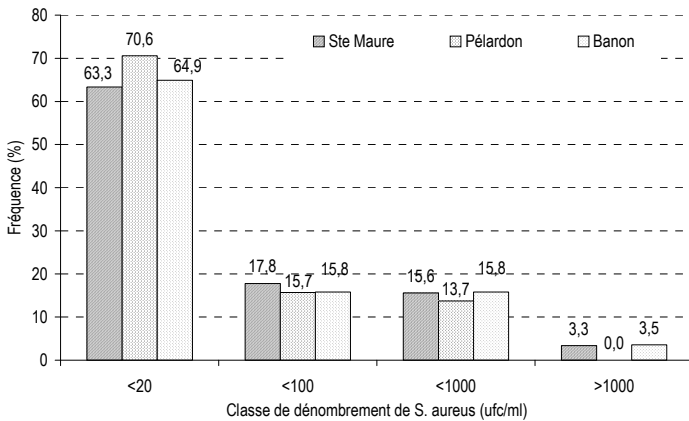


Figure 19 : Distribution de la contamination des laits dans les 3 secteurs AOC

Figure 20 : Distribution de la contamination des fromages dans les 3 secteurs AOC

En ce qui concerne les laits, les variations observées au cours du temps peuvent en partie être interprétées en tenant compte de l'étalement de la production (saisonnalité plus marquée en zone Banon comparativement à ce qui est observé en Ste Maure de Touraine ; démarrages des campagnes laitières différents). Sur le terrain, des interventions ont en outre été conduites face à des niveaux de contamination jugés trop élevés. Des réformes, en particulier, ont été réalisées.

Conformément à ce que l'on pouvait attendre, les fromages de type présure présentent des niveaux de contamination sensiblement plus élevés (Figure 23) que ceux des fromages issus d'une transformation lactique (plus grande amplitude de variation).

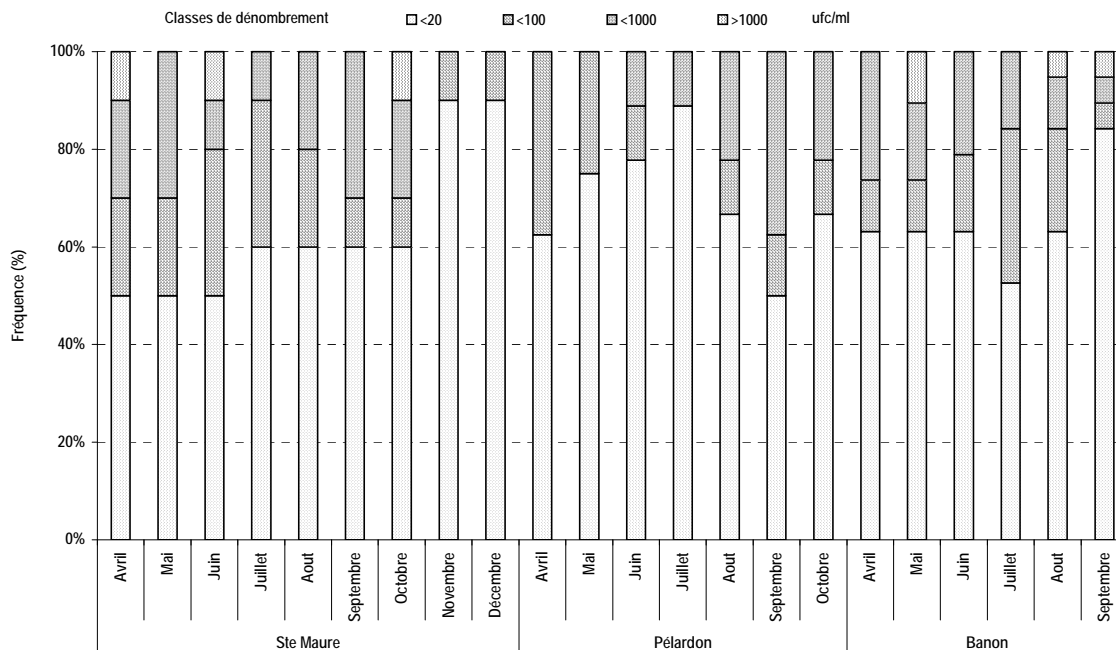


Figure 21 : Evolution de la distribution de la contamination des laits au cours du temps dans les 3 secteurs AOC

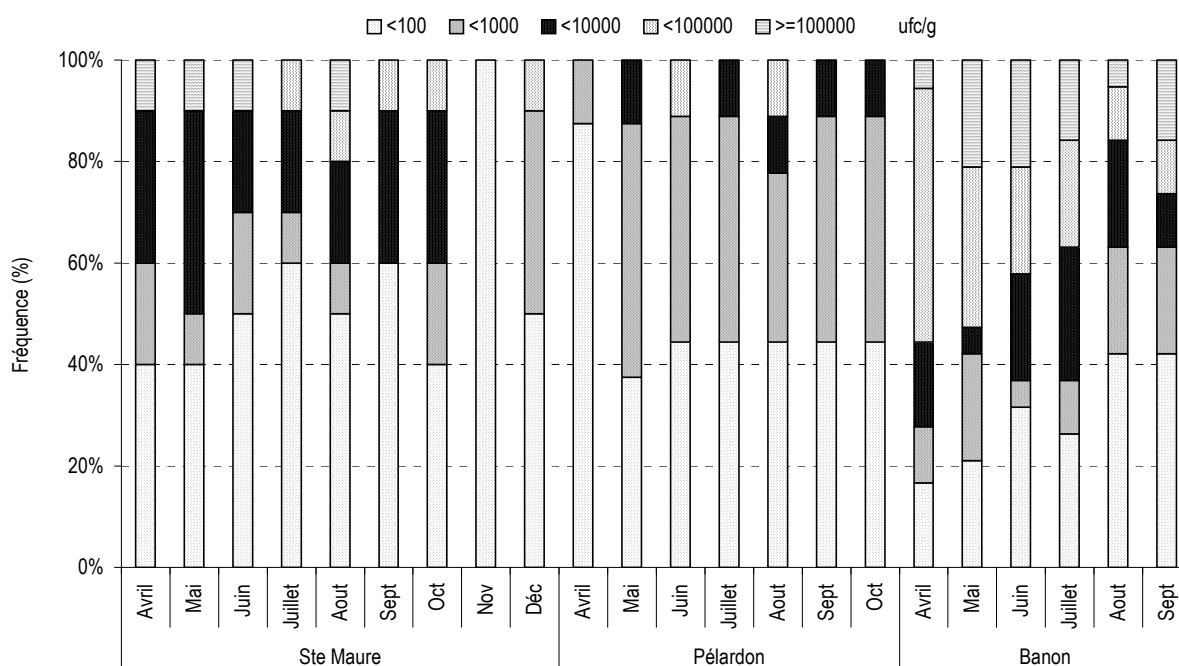


Figure 22 : Evolution de la distribution de la contamination des fromages au cours du temps dans les 3 secteurs AOC

Si l'on regarde conjointement les niveaux de contamination relatifs des laits et des fromages, on remarque tout d'abord qu'en partant de laits même très contaminés, les dénombrements obtenus sur les fromages dépassent rarement 10^4 ufc/g dans les fromages de type Pélardon et, que dans les autres productions, ils peuvent atteindre voire dépasser 10^5 (Ste Maure de Touraine) à 10^6 ufc/g (Banon) (Figure 23).

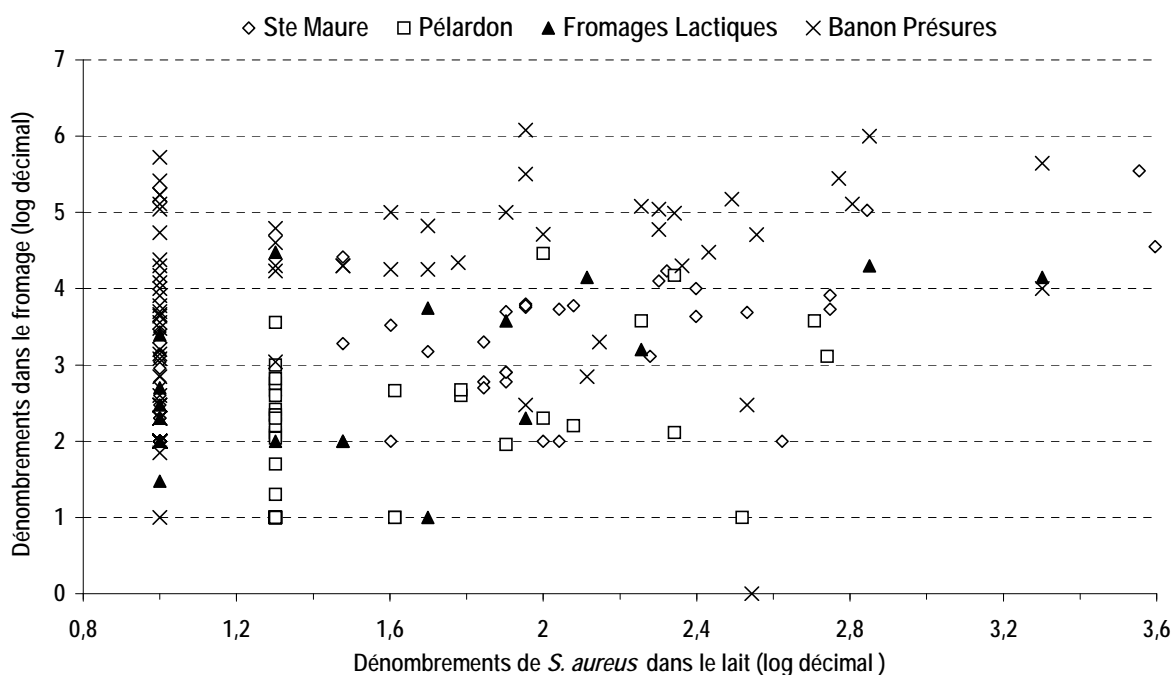


Figure 23 : Relation entre les niveaux de contamination des laits et des fromages selon le type de transformation réalisée

A l'inverse, des fromages modérément à très contaminés peuvent être obtenus à partir de laits apparemment non ou faiblement contaminés (Pélardon et Banon particulièrement) (Figure 23). Si la contamination du lait joue un rôle indéniable dans la qualité ultérieure des fromages, ces résultats tendent toutefois à démontrer l'existence d'autres facteurs intervenant en amont ou au cours du processus fromager (Jorgensen *et al*, 2005).

3 Evaluation des risques d'entérotoxinogénèse

3.1 Recherche des entérotoxines dans les fromages

Les résultats des dosages des entérotoxines totales (A à E) sont présentés en Annexe 1.4. Le dosage a été effectué en double, voire en triple.

Une présence potentielle d'entérotoxine a été détectée à l'aide du kit Transia dans 6 fromages. Même si ce kit n'est pas quantitatif, on peut estimer à partir de la densité optique qu'un échantillon (8127) semblait contenir moins d'entérotoxines que les cinq autres. Par ailleurs, un résultat était douteux (6034), une détermination étant positive et deux négatives. Trois autres échantillons (6039, 6032 et 7187) ont eu un, voire deux résultats, proches du seuil de positivité.

Ce ne sont pas les échantillons les plus contaminés en staphylocoques à coagulase positive dans lesquels des entérotoxines ont potentiellement été retrouvées. On peut faire l'hypothèse qu'il y a un effet de la technologie, ainsi que de la nature des souches de staphylocoques présentes.

Dans les 6 fromages trouvés positifs (sans ambiguïté) avec le kit Transia plate SET, le typage des entérotoxines a été réalisé dans un premier temps, à l'aide du kit Ridascreen. Cette détermination a été faite en double. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12: Typage d'entérotoxines dans les fromages à l'aide du kit Ridascreen

	Echantillons de fromage					
	4964	8127	56614	72727	56615	89119
Entérotoxine A	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Entérotoxine B	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Entérotoxine C	-/-	-/-	-/-	+/d	-/-	-/-
Entérotoxine D	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Entérotoxine E	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

d : douteux

Malgré une détermination positive à l'aide du kit Transia dans les 6 fromages étudiés, seule de l'entérotoxine C a été détectée dans le fromage 72727 à un faible niveau. Pour rappel, une population de staphylocoques à coagulase positive (SCP) de 35 800 ufc/g avait été dénombrée dans ce fromage. Les limites de détection des kits Transia et Ridascreen sont sensiblement les mêmes, soit 0,05 à 0,2 ng/ml et 0,1 ng/ml, respectivement (Lapeyre, 1997) et ne peuvent donc pas expliquer ces résultats que l'on peut considérer comme « incohérents ». En revanche, la présence de faux positifs a été soulignée dans les fromages avec l'utilisation du kit Transia, à cause notamment d'enzymes endogènes présentes (Lapeyre, 1997).

A la vue de ces résultats, un autre kit de typage des entérotoxines, le kit Transia ID SEs commercialisé par Diffchamb, a été employé. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 13.

Tableau 13: Typage d'entérotoxines dans les fromages à l'aide du kit Transia ID SEs

	Echantillons de fromage					
	4964 ⁽¹⁾	8127 ⁽²⁾	56614 ⁽²⁾	72727 ⁽¹⁾	56615 ⁽²⁾	89119 ⁽¹⁾
Entérotoxine A	+/+	+	+	+/+	+	+/+
Entérotoxine B	-/-	d	-	d/-	-	+/d
Entérotoxine C	+/+	+	+	+/+	+	+/+
Entérotoxine D	-/-	-	d	+/d	d	+/d
Entérotoxine E	+/d	+	+	+/+	+	+/+

d : douteux ; ⁽¹⁾ : double détermination ; ⁽²⁾ : simple détermination

A l'issue de la première détermination, différentes entérotoxines ont été trouvées dans les 6 échantillons étudiés. Le nombre d'entérotoxines détectées est cependant apparu comme étonnant : un minimum de trois entérotoxines a été détecté dans chaque échantillon, ce nombre pouvant aller jusqu'à 5 entérotoxines détectées (échantillon 89119), résultat non obtenu avec le kit Ridascreen et jamais obtenu auparavant (ni observé dans la littérature).

Dans ce contexte, avec les 6 barrettes restantes du kit Transia ID SEs, ont été analysés trois des 6 échantillons de l'étude (4694, 72727 et 89119) auxquels ont été rajoutés un échantillon négatif (8770) obtenu avec le kit Transia (permettant la recherche d'entérotoxines totales), ainsi que deux extraits de fromage à pâte pressée non cuite au lait de vache contenant, l'un de l'entérotoxine A et l'autre de l'entérotoxine D. Ces extraits provenaient du travail de thèse d'Helen Lamprell (2003) et les résultats de typage avaient été obtenus avec le kit Oxoid. L'ajout de ces 3 échantillons supplémentaires permettait de voir si c'était le kit Transia ID SEs qui posait problème ou pas.

La double détermination a permis globalement de confirmer les résultats obtenus lors de la première détermination (Tableau 13). Dans l'échantillon 8770 (échantillon négatif avec Transia), aucune entérotoxine n'a été retrouvée, et les résultats obtenus avec le kit Oxoid dans les deux autres échantillons ajoutés ont été confirmés. *A priori*, le kit Transia ID SEs utilisé n'était donc pas à remettre en cause.

A ce stade, il était difficile de conclure si vraiment il y avait présence ou pas d'entérotoxines dans les fromages étudiés et quel type d'entérotoxine avait le cas échéant été produit. Des interférences peuvent en effet exister avec la matrice « fromage de chèvre » (présence d'enzymes endogènes), mais aussi avec la protéine A de *S. aureus*. Ainsi, d'autres voies ont été explorées :

- Afin d'éliminer la piste « présence d'enzymes endogènes » pouvant donner des faux positifs, les extraits de fromages obtenus par dialyse-concentration, ont été chauffés à 80°C – 30s ;
- Suite à la parution de la note de service de la DGAL (note de service DGAL/SDSSA/SDRRCC/N2005-8194 du 27 juillet 2005), les extraits de fromages ont été traités avec des immunoglobulines de lapin (élimination des interférences avec la protéine A de *S. aureus*).
- Suite à ces deux traitements, une recherche des entérotoxines a été effectuée à l'aide du kit Transia plate SET.
- Enfin, une recherche d'entérotoxines a été effectuée à l'aide de l'appareil VIDAS par le Laboratoire Département d'Analyses du Jura à partir des extraits de fromage préparés par l'INRA de Poligny.

Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Résultats de la recherche d'entérotoxines dans les fromages à l'aide du kit Transia plate SET et de l'appareil VIDAS

Test Echantillon	Transia				VIDAS SET2
	Extrait de fromage	Extrait de fromage + lgs de lapin	Extrait de fromage chauffé à 80°C-30s	Extrait de fromage chauffé à 80°C-30s + lgs de lapin	Extrait de fromage
4964 ^a	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
8127 ^a	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
56614 ^b	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
72727 ^b	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
56615 ^b	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
89119 ^b	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-

^a : échantillons de Banon ; ^b : échantillons de Ste Maure de Touraine

Les résultats de dosage à l'aide du kit Transia plate SET sont conformes à ceux obtenus précédemment, excepté pour l'échantillon 4964 qui est devenu négatif. Lors de l'analyse des extraits de fromage obtenus précédemment (mai 2005) avec le kit Transia, un résultat douteux a été obtenu sur cet échantillon (résultats non montrés).

Avec l'ajout d'immunoglobulines de lapin, seul un échantillon (8127) est devenu négatif.

Après chauffage des extraits de fromage à 80°C-30s, tous les échantillons sont devenus négatifs ; cependant le chauffage a entraîné un trouble des extraits qui a pu gêner l'analyse.

Finalement, tous les échantillons ont été trouvés négatifs après analyse avec le kit VIDAS SET2. Dans leur étude, Vernozy-Rozand *et al* (2004) concluaient que le kit VIDAS SET2 avait un seuil de détection des entérotoxines équivalent, voire plus bas que celui du kit Transia Plate, ainsi qu'une meilleure spécificité et une meilleure sensibilité.

Ainsi, peut on raisonnablement conclure que les échantillons de fromages analysés, ne contenaient pas d'entérotoxines.

3.2 Caractérisation génomique des souches de *S. aureus*

Parmi les souches de collection, 65,9 % présentent un gène codant l'entérotoxine C (Tableau 15).

Tableau 15 : Caractérisation du potentiel entérotoxino-gène des souches de collection issues de mammites

Entérotoxine	Gène	Souches positives	
		Nombre	%
A	<i>sea</i>	0	0
B	<i>seb</i>	0	0
C	<i>sec</i>	27	65,9
D	<i>sed</i>	0	0
E	<i>see</i>	0	0
G	<i>seg</i>	4	9,8
H	<i>seh</i>	2	4,9
I	<i>sei</i>	4	9,8
J	<i>sej</i>	0	0
K	<i>sek</i>	4	9,8
L	<i>sel</i>	4	9,8
M	<i>sem</i>	4	9,8

Chaque souche présente au moins un gène codant une entérotoxine. Les gènes *sei*, *sek*, *sel* et *sem* sont présents dans 9,8 % des souches. Par contre, aucune souche ne possède les gènes codant les entérotoxines A, B ou D, habituellement incriminées dans les cas de toxi-infections alimentaires.

Soixante et une souches ont été isolées du lait des chèvres excrétrices présentes dans 14 exploitations. Les résultats correspondants sont présentés en Annexe 1.4 et 1.5. La plupart des souches de chèvres excrétrices isolées dans le cadre de l'étude présentent des profils identiques du point de vue de leur potentiel entérotoxigène. La plupart des souches isolées (80,3 %) possède le gène codant l'entérotoxine de type C. Conformément à ce qui est rapporté dans la littérature (Matsunaga *et al.*, 1993 ; Srinivasan *et al.*, 2006 ; Stephan *et al.*, 2001 ; Zschöck *et al.*, 2004), le gène *tsst* est presque systématiquement associé à *sec* (48 souches sur 49, soit 98 %). Il ne code pas une entérotoxine mais la TSST dont on sait qu'elle est impliquée dans des chocs toxiques chez l'homme (Crass et Bergdoll, 1986 ; Kansal *et al.*, 2007 ; Kunstmann *et al.*, 1989 ; Thomas *et al.*, 2007).

Chaque souche sauf une présente au moins un gène codant une entérotoxine. Les gènes *sea* et *sed* codant les entérotoxines A et D ont été retrouvés dans respectivement 3,3 % (N=2 ; 1 exploitation concernée) et 13,1% (N= 8 ; 3 exploitations concernées) des souches. Aucune n'est porteuse de *seb* (gène correspondant à l'entérotoxine B). A peine 9,8 % des souches (N=6) sont porteuses du gène codant la staphylokinase (*sak*).

Les souches ayant fait l'objet d'une détermination pour l'allèle *agr* (N=32), se répartissent entre les types *agr* 1 (59,4 %) et *agr* 3 (40,6 %).

Les résultats issus de l'analyse des laits de mélange et de fromages sont présentés par bassin de production dans les tableaux 16 à 18.

Tableau 16 : Zone AOC Banon : Caractérisation du potentiel entérotoxigène des mélanges de souches provenant des prélèvements de laits de mélange et des fromages issus de ces laits

Eleveur	Prélèvement	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>sek</i>	<i>sel</i>	<i>sem</i>	<i>tsst</i>	<i>stk</i>	<i>nuc</i>
2	Lait biofilm	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	Lait de tank	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
4	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	Fromage	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
6	Lait de tank	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	Fromage	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
7	Fromage	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
8	Lait de tank	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	Lait de tank	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
	Fromage	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
12	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
17	Lait de tank	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
	Fromage	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
18	Lait de tank	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
	Fromage	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+

Tableau 17 : Zone AOC Pélardon : Caractérisation du potentiel entérotoxigène des mélanges de souches provenant des prélèvements de laits de mélange et des fromages issus de ces laits

Eleveur	Prélèvement	sea	seb	sec	sed	see	seg	seh	sei	sej	sek	sel	sem	tsst	sak	nuc
A	Lait de tank*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+''	-	-	+	-	+
B	Lait de tank*	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
C	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D	Lait de tank	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	Fromage	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
E	Lait de tank	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Fromage	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
F	Lait de tank*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
H	Lait de tank*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fromage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
I	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

*<20 ufc.ml

Tableau 18 : Zone AOC Ste Maure de Touraine : Caractérisation du potentiel entérotoxigène des mélanges de souches provenant des prélèvements de laits de mélange et des fromages issus de ces laits

Eleveur	Prélèvement	sea	seb	sec	sed	see	seg	seh	sei	sej	sek	sel	sem	tsst	sak	nuc
J	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
K	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
L	Fromage	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
M	Lait de tank	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	Fromage	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
N	Lait de tank	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	Fromage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
O	Fromage	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tous échantillons confondus, sec est présent dans 78 % des cas (74 % pour les laits de tank et 82 % pour les fromages). Le gène *tsst* qui lui est le plus souvent associé est mis en évidence dans 68 % des échantillons. Le gène *sea* a été rencontré dans les fromages de deux exploitations différentes. Le gène *sed* a été mis en évidence dans le lait de tank et le fromage d'une même exploitation. La souche isolée d'une des chèvres excrétrices présentes dans cette exploitation présentait cette même caractéristique. Le gène codant la staphylokinase est présent dans 37 % des échantillons analysés avec toutefois une fréquence différente en fonction de l'origine géographique des prélèvements : 65 % en AOC Banon, 17 % en AOC Pélardon, 9 % en AOC Ste Maure de Touraine. Les gènes codant les toxines F à N ont été identifiés dans un à deux échantillons en AOC Pélardon et Ste Maure de Touraine. Ils apparaissent plus fréquemment en AOC Banon (47 à 71 % des échantillons analysés).

4 Typage et traçabilité des souches de *S. aureus*

En s'intéressant exclusivement aux produits obtenus en transformation de type présure, l'étude de la contamination des laits et des fromages par *S. aureus* (§2.2) met en évidence la fréquence élevée (63,5 % ; N = 96) des laits de tank (N=96) présentant des niveaux de contamination inférieurs ou égaux à 10 ufc/ml. La contamination des fromages reste inférieure à 10² et 10⁴ ufc/g dans, respectivement, 29 % et 58 % des cas. Cependant, 16,7 % des fromages fabriqués peuvent être considérés comme non conformes avec des dénombrements supérieurs à 10⁵ ufc/g (N=16). Parmi ceux-ci, 37,5 % ont néanmoins été fabriqués à partir de laits peu ou pas contaminés (dénombrements ≤ 10 ufc/ml) (Figure 23).

4.1 Prévalence de la contamination par *S. aureus* selon le site de prélèvement

La prévalence des infections intramammaires occasionnées par *S. aureus* atteint en moyenne 2,8 % : une seule chèvre excrétrice a été détectée dans 5 exploitations, aucune dans une exploitation. Un portage nasal ou sur les mains des producteurs (trayeurs ou fromagers) a été mis en évidence chez, respectivement, 28,6 et 9,5 % des personnes soumises aux prélèvements soit, globalement, 33 % des personnes concernées.

L'air collecté en salle de traite peut être ponctuellement contaminé par des souches de *S. aureus*. Cette contamination est réduite : 1 à 2 ufc/10 litres d'air. Parallèlement, on observe une contamination plus importante (> 300 ufc/ 10 litres d'air) par des souches de staphylocoques coagulase négative. Ces niveaux de contamination ne s'accroissent cependant pas en cours de traite (Tableau 19).

Tableau 19 : Contamination par *S. aureus* de l'air en salle de traite (ufc/10 litres d'air)

N° éleveur	Avant l'entrée des animaux		Pendant la traite	
	Staphylocoques coagulase négative	Staphylocoques coagulase positive	Staphylocoques coagulase négative	Staphylocoques coagulase positive
1	35	0	512	0
2	>300	1	>300	1
3	30	0	126	0
4	373	2	19	0
6	104	1	95	0
8	>300	0	284	0
9	51	0	118	0
10	>300	0	422	0
12	>300	0	>300	0
17	>300	0	>300	0
18	>300	0	>300	0

Dans 4 installations sur 10, la présence de *S. aureus* a été décelée dans les biofilms des installations de traite (Tableau 20).

Tableau 20 : Contamination par *S. aureus* des biofilms des installations de traite

N° éleveur	Recherche de <i>S. aureus</i> après enrichissement	Dénombrement de <i>S. aureus</i> (ufc/ml)
4	Absence	1000
10	Présence	200
2	Présence	10
6	Absence	10
1	Absence	<10
3	Absence	<10
8	Absence	<10
9	-	<10
12	Absence	<10
17	-	<10
18	Traite manuelle	

4.2 Diversité des souches

Cinq allèles ont été différenciés avec les TRs des loci *SAV1078*, *coa*, *clfA* et *clfB*. Le TR *fnb* s'avère le plus discriminant avec 10 allèles obtenus. La fréquence relative des différents allèles de chaque TR est précisée en Annexe 1.7 en fonction de l'origine des isolats dans lesquels ils ont été mis en évidence. Certains allèles prédominent : allèle A1 pour *coa* et *clfA*, allèle A3 pour *sav1078*, allèle A4 pour *clfB* et allèle A6 pour *fnb*. Cependant leur fréquence relative peut varier en fonction de leur provenance (Annexe 1.7).

En prenant en compte à la fois les résultats des VNTR (combinaison des résultats obtenus pour les 5 TRs) et la présence du gène codant la staphylokinase, 57 profils de souches différents ont été identifiés. Les profils sont caractéristiques de chaque exploitation dans 81 % des cas (46 profils sur 57). Cependant des combinaisons peuvent être communes à 2 ou plusieurs exploitations (jusqu'à 5 différentes).

Pour chaque exploitation, sont rapportés en Annexe 1.8 les différents profils de souches et l'analyse des sources de contamination.

Au sein de chaque exploitation, toutes origines confondues, le nombre de profils varie de 3 à 17 (en moyenne 6 profils par exploitation) ce qui traduit la diversité des souches isolées (Tableau 21).

Tableau 21 : Nombre moyen par exploitation de profils MLVA des souches de *S. aureus* en fonction de leur provenance

	Chèvres infectées	Peau des mamelles	Biofilm	Fosses nasales	Mains	Laits de tank	Fromages	Total
Moyenne	1,5	0,7	0,2	0,6	0,3	3,8	3,5	6,3
Minimum	0	4	0	0	0	0	2	3
Maximum	3	4	1	3	2	10	7	17

MLVA : Multi Locus VNTR Analysis

La présence du gène codant la staphylokinase a été observée pour 187 souches (Tableau 22). Toutes les souches isolées des mains et des fosses nasales des producteurs étaient porteuses du gène, ce qui

confirme sa présence chez les souches d'origine humaine. Les souches isolées chez l'animal (origine cutanée ou intramammaire) sont également porteuses du gène dans la majorité des cas (61,2 %). La proportion des souches « staphylokinase positives » isolées des laits de tank est sensiblement du même ordre de grandeur (57,1 %). En revanche, seules 20 souches sur 179 isolées dans les fromages étaient « staphylokinase positives » (11,2 %).

Tableau 22 : Nombre de souches de *S. aureus* porteuses du gène codant la staphylokinase en fonction de leur provenance

Provenance :	Nb de souches portant sak/ Nb total de souches	%
Chèvres :		
▪ Chèvres infectées	18 / 33	54,5
▪ Peau des mamelles	31 / 47	66,0
Trayeurs / transformateurs (portage) :		
▪ Fosses nasales	24 / 24	100,0
▪ Mains	5 / 5	100,0
Biofilm (installation de traite)	1 / 12	8,3
Laits de tank	88 / 154	57,1
Fromages	20 / 179	11,2
Total	187 / 454	41,2

4.3 Origine de la contamination des laits de tank et des fromages

Selon les exploitations, le nombre de profils MLVA des souches isolées des laits de tank et des fromages varie respectivement de 0 à 10 et de 2 à 7 (Tableau 21), soit en moyenne plus de trois profils distincts par élevage pour chacun de ces milieux.

Sur 33 profils MLVA de souches de *S. aureus* isolées des laits de tank, dix, soit moins d'un tiers, sont identiques à ceux de souches isolées du lait de chèvres excrétrices (Tableau 23). Certains sont identiques à ceux de souches présentes sur la peau des mamelles et moins fréquemment, de souches isolées des biofilms des installations de traite (Nb = 1) ou encore des fosses nasales des trayeurs (Nb = 2). En ce qui concerne cette dernière source potentielle de contamination, deux situations ont pu être distinguées. Dans la première, les souches d'origine nasale et les souches isolées du lait de tank présentant un profil identique sont issues de deux exploitations différentes. Dans la seconde, le profil MLVA correspondant aux souches d'origine nasale est commun, au sein du même élevage, à des souches isolées du lait de tank et des souches provenant du lait de chèvres infectées (Tableau 25). Il est également commun à des souches isolées du lait de tank d'une autre exploitation.

Tableau 23 : Origine des souches de *S. aureus* ayant un profil MLVA identique à celui identifié dans les laits de tank de 12 producteurs

Laits de tank		Nombre de profils identiques				
Nombre de souches	Nombre de profils	Chèvres infectées	Peau des mamelles	Biofilm	Fosses nasales	Mains
154	33	10	4	1	2	0

MLVA : Multi Locus VNTR Analysis

L'origine de la contamination des fromages peut également être étudiée (Tableau 24). Dix sept profils MLVA (56,7 %) sont communs aux souches isolées des laits de tank et des fromages. Sur un total de 30 profils, seuls 7 (23,3 %) sont identiques à ceux de souches isolées des chèvres excrétrices.

Tableau 24 : Origine des souches de *S. aureus* ayant un profil MLVA identique à celui identifié dans les fromages de 12 producteurs

Fromages		Nombre de profils identiques					
Nombre de souches	Nombre de profils	Laits de tank	Chèvres infectées	Peau des mamelles	Biofilm	Fosses nasales	Mains
179	30	17	7	4	1	1	0

MLVA : Multi Locus VNTR Analysis

Le typage des souches permet, pour une exploitation donnée, de formuler des hypothèses sur les sources principales de contamination du lait ou des fromages, ce qu'illustre le tableau 25 pour 4 producteurs.

Tableau 25 : Origine et nombre de souches de *S. aureus* présentant le même profil MLVA chez 4 producteurs

Producteurs	Fromages	Laits de tank	Chèvres en lactation		Biofilm	Portage humain	
			Chèvres infectées	Peau des mamelles		Fosses nasales	Mains
Producteur 4							
▪ Nb total de souches	15	8	1		10		
▪ Nb total de profils	4	4	1		1		
▪ Nb de souches de profil identique	6	1					
	7	2			10		
	1		1				
Producteur 8							
▪ Nb total de souches	10	29	6	16		10	
▪ Nb total de profils	7	10	1	4		3	
▪ Nb de souches de profil identique	1			4			
	1	3		10			
	1	1		1			
	1			1			
	1		6				
	1	2					
	4	3					
Producteur 12							
▪ Nb total de souches	34	14	6				
▪ Nb total de profils	5	4	3				
▪ Nb de souches de profil identique	8	1	3				
	1	3	1				
	23	9	2				
Producteur 20							
▪ Nb total de souches		45	7	25		8	
▪ Nb total de profils		3	5	2		1	
▪ Nb de souches de profil identique		6		1			
		7	2				
		15	2			8	

MLVA : Multi Locus VNTR Analysis

Chez le producteur 4, une seule chèvre excrétrice a été identifiée et ne constitue que l'une des sources de contamination du fromage. Parmi les autres sources susceptibles d'être incriminées, figure le biofilm de l'installation de traite, 7 des 15 souches isolées dans les fromages ayant le même profil MLVA que le sien.

Chez le producteur 8, les chèvres en lactation interviennent dans la contamination du fromage à double titre : par la peau des mamelles et des trayons, en contact indirect avec le lait par l'intermédiaire de la machine à traire (4 souches de fromages sur 10 et 4 profils MLVA sur 7) et par la présence de 6 chèvres infectées excrétrices (1 souche de fromage et 1 profil MLVA).

Chez le producteur 12, toutes les chèvres infectées (Nb = 6) participent à la contamination des laits de tank et des fromages issus de ces laits. Il s'agit vraisemblablement de la source principale (32 souches de fromages sur 34) mais non unique (3 profils MLVA sur 5) de contamination du produit final.

Enfin, chez le producteur 20, il est intéressant de noter que les souches d'origine nasale du producteur sont identiques aux souches isolées du lait de deux des chèvres excrétrices (Nb = 7) et de 15 des 45 souches isolées du lait de tank (1 profil MLVA sur 3).

4.4 Persistance de la contamination par *S. aureus*

Dans plusieurs cas, des souches de profils MLVA identiques ont pu être isolées à des périodes différentes, soit au sein de la même campagne laitière, soit au cours de deux campagnes successives (Tableau 26).

Tableau 26 : Nombre de cas où des souches de profils MLVA identiques ont été isolées à des périodes différentes

Fromages	Laits de tank	Fromages et laits de tank	Fromages et chèvres*
9	5	6	6

*Portage cutané ou infection intramammaire ; MLVA : Multi Locus VNTR Analysis

C. Discussion

L'analyse des résultats des analyses de dénombrement réalisées à l'initiative des entreprises laitières a permis de faire un premier état des lieux en matière de contamination des laits de tank et de citernes. Sur le plan opérationnel, le nombre restreint de laits de troupeaux intervenant dans la contamination ponctuelle d'une citerne permet d'envisager des interventions ciblées et d'autant plus efficaces chez les producteurs concernés. Cela permet notamment d'expliquer le faible nombre de cas pour lesquels une contamination en SCP élevée (> 500 ufc/ml) persiste au cours du temps : 15 éleveurs identifiés soit 4,5 % de l'effectif étudié. Inversement, l'irrégularité des résultats des producteurs est révélatrice des difficultés de maîtrise de la contamination à la production. D'autres aspects doivent néanmoins être considérés. Le premier concerne les techniques de dénombrement elles-mêmes. Les staphylocoques sont en effet regroupés en grappes. Des résultats différents peuvent être obtenus selon que ces grappes auront ou non été dissociées, ce qui fait intervenir les conditions de prélèvement, de transport ainsi que les procédures de laboratoire. Au delà de ces aspects analytiques, le niveau de contamination du tank est le reflet de l'excrétion mammaire des chèvres du troupeau. A la différence des numérations cellulaires que l'on associe à une prévalence présumée d'infections, le niveau de contamination en SCP traduit aussi voire surtout la variabilité de l'excrétion mammaire des chèvres infectées. La notion de variabilité nécessite d'être explicitée. Elle recouvre en effet différentes réalités relatives aux techniques de dénombrement, aux sources de contamination et à l'excrétion mammaire proprement dite. Sur le plan analytique, Lombard (2004), dans une étude sur les essais inter-laboratoires en microbiologie des aliments, indique qu'au delà de la méthode d'analyse et du niveau de fidélité que l'on peut en attendre, l'échantillonnage et le traitement des échantillons revêtent une importance considérable. Selon

Lombard, les valeurs générales de répétabilité et de reproductibilité pour le dénombrement des staphylocoques coagulase positive sont respectivement de 0,28 et 0,43 pour la méthode BP (Baird-Parker) et de 0,22 et 0,33 pour la méthode RPFA (recours à un milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène). Ces valeurs générales de fidélité sont jugées acceptables pour des méthodes de dénombrement bactérien, en particulier pour la méthode BP qui comporte une étape de confirmation. Cette estimation de la fidélité ne prend néanmoins pas en compte la variabilité introduite par l'hétérogénéité de contamination des échantillons, elle-même dépendante de leur homogénéisation. Une homogénéisation minutieuse est en principe requise lors de la prise d'échantillon initiale puis ensuite, au niveau du laboratoire, lors de la prise d'essai. Cet aspect ne peut être éludé dans l'interprétation des résultats des analyses ainsi qu'il a été acté dans la norme ISO/TS 19036:2006. Cette norme définit les lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives en microbiologie alimentaire, qui recouvre à la fois les erreurs liées à la technique de mesure, propre à chaque laboratoire, et la variabilité due à l'échantillon lui-même et à la concentration du microorganisme dans l'aliment. La note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009 en date du 14 janvier 2008 rappelle qu'à ce jour, la notion de tolérance liée aux techniques d'analyses n'est pas prise en compte dans le règlement (CE) n°2073/2005 en vigueur et qu'au niveau communautaire, aucune mesure n'a été instaurée sur la manière dont l'incertitude de mesure doit être prise en compte dans l'interprétation des résultats des analyses microbiologiques.

Outre ces aspects analytiques, la variabilité des résultats de dénombrement peut être aussi le reflet de la diversité des sources de contamination du lait de tank. Enfin, l'excrétion mammaire des chèvres infectées est également quantitativement variable au cours du temps : variabilité d'un jour à l'autre, d'une période à l'autre.

Dans la typologie des producteurs réalisée à partir de la base de données fournie par les entreprises, la présence de valeurs manquantes constitue une limite pour l'analyse et l'interprétation des groupes et des profils de niveaux de contamination correspondants. Ces données manquantes peuvent être de différents types : absence de collecte du lait liée à la saisonnalité de la production, interruption temporaire de la collecte du producteur suite à une non conformité de son lait (présence d'un agent pathogène tel que *Listeria*,...), modification des tournées de collecte (et notamment ajustement des collectes en fonction des besoins saisonniers de la laiterie), redéfinition des zones de collecte (en particulier, limitation du lait collecté en cru depuis 2004). Dans la mesure où ce manque d'information n'est pas une conséquence du profil de l'éleveur (notamment pas de relation évidente entre la mauvaise qualité des résultats et l'absence de collecte et consécutivement d'analyse), il est probable que les valeurs manquantes n'induisent pas de biais. Ce point nécessiterait toutefois d'être validé.

D'un point de vue dynamique, on constate pour la majeure partie des classes de producteurs une relation entre les résultats obtenus à un contrôle donné, ceux du contrôle précédent (voire de plusieurs contrôles antérieurs pour les classes présentant les niveaux les plus élevés) et ceux obtenus l'année précédente. La cinétique d'évolution des niveaux de contamination en SCP est donc caractérisée par l'existence d'une composante saisonnière. Les contaminations sont plus fréquentes et de plus grande amplitude en début de printemps, soit pendant et juste après la période des mises-bas. Or, c'est le plus souvent en début de lactation, au cours des premiers mois de la campagne que surviennent les infections cliniques et de façon plus générale les nouvelles infections. Il est possible que cette augmentation de la fréquence des animaux infectés et des formes cliniques d'infections mammaires se traduisent par une augmentation des niveaux d'excrétion et corollairement des niveaux de contamination des laits de mélange. Par ailleurs, les primipares mettent bas en léger décalage (environ un mois) avec la population des adultes en février – mars (avec des variations en fonction des zones de production et de l'adaptation des éleveurs aux demandes des entreprises). Considérées comme plus sensibles aux conditions de traite (de Cremoux *et al.*, 2001) que les multipares, les primipares

s'infectent précocement et en relativement forte proportion. Les pics de contamination observés au printemps pourraient donc être consécutifs, notamment, à l'infection des jeunes.

D'autres critères de qualité du lait (numérations cellulaires de tank, nombre de germes totaux,...) ont été étudiés pour évaluer dans quelle mesure les groupes d'élevages présentant des niveaux de contamination en SCP élevés se distinguent également sur d'autres paramètres. L'analyse croisée des différentes typologies de producteurs montre que les résultats de numérations cellulaires des laits de tank ne permettent en rien de présager des risques de contamination par *S. aureus*. De fait, les numérations cellulaires constituent un indicateur individuel des infections mammaires : leur augmentation dans le lait est une réponse non spécifique face à l'atteinte de la mamelle et traduit la présence d'une infection et non un niveau d'excrétion (qui est par ailleurs variable au cours du temps).

En ce qui concerne les germes totaux, il n'existe pas non plus de corrélation entre les niveaux de contamination en germes et ceux en SCP comme en témoignent notamment les cinétiques de contamination au cours du temps : caractère saisonné des contaminations en SCP, non saisonné pour les germes totaux ; tendance à une baisse des germes totaux au cours d'une période de 4 ans de suivi, légère tendance à la hausse des SCP. Cependant, on constate que les élevages présentant des niveaux de contamination en germes totaux (plus de 20000 germes /ml) sont également ceux dans lesquels la maîtrise de la contamination en SCP est la plus difficile. Ces premières observations demanderaient à être confirmées. Des investigations complémentaires permettraient sans doute d'évaluer en quoi les profils de germes totaux sont révélateurs de pratiques (d'hygiène, de traite, d'entretien des installations de traite et/ ou des tanks à lait,...) ou de conduites de troupeau éventuellement favorables à la contamination et/ou à la multiplication des SCP dans les laits de tank.

La comparaison des niveaux de contamination des laits de tank et des fromages indique que si ceux-ci sont corrélés, une contamination faible du lait ne saurait néanmoins garantir, particulièrement pour des produits considérés comme sensibles, comme les fromages de type présure, la qualité sanitaire du produit final. Ce résultat confirme l'importance de la contamination initiale du lait mis en fabrication, mais apporte une nouvelle illustration de l'influence du processus de transformation fromagère dans la maîtrise de la contamination du produit fini. Compte tenu de ces éléments, la connaissance des sources de contamination par *S. aureus* des laits de tank et des fromages peut s'avérer utile, voire indispensable, lorsque cette contamination persiste en dépit des mesures de contrôle habituellement prises à l'égard des infections mammaires et qu'elle constitue un risque économique pour l'élevage concerné. Les récentes modifications apportées dans la réglementation fixant notamment la réalisation des dénombrements au moment d'obtention théorique du pic de croissance maximale des bactéries (période variable à déterminer en fonction des produits), rendent en effet nécessaire la maîtrise des niveaux de contamination en SCP très précocement au cours de la transformation (pas de prise en compte de la diminution des niveaux de contamination au cours de l'affinage).

La méthode de typage MLVA utilisée dans le cadre de cette étude s'avère très discriminante comparativement aux autres méthodes employées dans ce domaine telles que la REP-PCR ou encore l'électrophorèse en champ pulsé (Jorgensen *et al.*, 2005 ; Vautor *et al.*, 2003). Elle met en évidence une importante hétérogénéité génétique des souches de *S. aureus* également décrite par Aarestrup *et al.* (1995), Da Silva *et al.* (2006). Enfin, elle révèle une très grande diversité de souches circulant dans l'ensemble des exploitations, mais un nombre relativement limité pour chaque site considéré et ayant fait l'objet de prélèvements. Quelques souches issues d'élevages différents ont présenté des profils MLVA identiques. La prise en compte d'un TR supplémentaire dans le profil génomique aurait sans doute permis de les dissocier (Sabat *et al.*, 2003).

L'étude de souches issues des laits de tank et des fromages témoigne de la multiplicité des sources possibles de contamination. La contamination des fromages fait le plus souvent suite à celle du tank. Les chèvres excrétrices peuvent constituer l'une des sources principales de contamination (Muehlherr *et al.*, 2003 ; Roberson *et al.*, 1994, 1998 ; Vautor *et al.*, 2003). Agent prépondérant des mammites cliniques chez la chèvre (Abu-Samra *et al.*, 1988 ; Ameh et Tari, 2000 ; Dewani *et al.*, 2002 ; Sharma *et al.*, 1999), *S. aureus* intervient également, mais dans une moindre mesure, dans les infections subcliniques. A cet égard, la présente étude confirme la faible prévalence des infections mammaires chroniques ou subcliniques à *S. aureus* chez la chèvre (Bergonier *et al.*, 2002). (Alawa *et al.*, 2000 ; Bergonier *et al.*, 1999 ; Ndegwa *et al.*, 2001 ; Ryan et Greenwood, 1990 ; Sung *et al.*, 1999 ; White, 1999). Sur le plan pratique, cela signifie que l'identification et la ségrégation des chèvres excrétrices peuvent ne pas suffire à contrôler ou supprimer la contamination du lait de tank et des fromages.

Le typage des souches ne permet pas d'identifier de manière certaine les autres sources de contamination. Le fait de ne typer qu'une certaine proportion de souches isolées sur des milieux sélectifs, ainsi que les faibles niveaux de contamination parfois rencontrés, peuvent introduire un biais quant à la représentativité de l'échantillon tant sur le plan qualitatif que quantitatif. Différentes sources de contamination susceptibles d'être incriminées ont néanmoins pu être mises en évidence, parmi lesquelles figurent le portage cutané des mamelles (Alhendi *et al.*, 1993 ; Mahanta *et al.*, 1997 ; Valle *et al.*, 1990), les biofilms présents dans les installations de traite et, de manière plus exceptionnelle, le portage humain (Matos *et al.*, 1991 ; Roberson *et al.*, 1994 ; Zadocks *et al.*, 2002). Si le rôle de la machine à traire et de la technique de traite dans la transmission active (Sinapis *et al.*, 2000 ; Williams et Mein, 1985 ; Zschöck *et al.*, 2000) ou passive (Bergonier *et al.*, 2003) des infections a été largement décrit, la possibilité d'une contamination des produits par *S. aureus* consécutive à la constitution d'un biofilm sur le matériel de traite n'avait jusqu'à présent que peu été envisagée (Fox *et al.*, 2005).

En élevage, le contrôle de ces infections repose sur l'ensemble des mesures curatives et préventives classiquement préconisées chez la vache laitière et adaptées aux particularités de l'espèce caprine (prépondérance du réservoir mammaire sur le plan épidémiologique, conduite en lots, saisonnalité de la production,...) (Baudry *et al.*, 2000 ; de Cremoux *et al.*, 1995 ; Menzies et Ramanoon, 2001 ; Mercier *et al.*, 1998 ; Poutrel *et al.*, 1997 ; Sinapis *et al.*, 2000). Au delà de leur absence de spécificité à l'égard de *S. aureus*, ces mesures n'ont pas encore pleinement fait la preuve de leur efficacité (de Cremoux *et al.*, 2001). Le caractère multifactoriel des infections mammaires rend délicate la définition et la hiérarchisation des mesures à mettre en œuvre en élevage. Le typage des souches peut permettre, selon les exploitations, de formuler des hypothèses sur les sources principales de contamination du lait et des fromages. Il permet de ce fait d'envisager des moyens d'action différents et ciblés selon la source incriminée :

- identification des animaux excréteurs, en vue de l'établissement d'un ordre de traite, de leur traitement ou de leur réforme, à court ou moyen terme ;
- amélioration de l'hygiène de traite : mise en place d'une antiseptie des trayons en fin de traite (voire d'un prétrempage) sur tout ou partie du troupeau, pendant tout ou partie de la campagne laitière ;
- soin apporté aux mamelles en cas de lésions cutanées, de staphylococcies ;
- modification des pratiques de nettoyage-désinfection de l'installation de traite ;
- précautions supplémentaires pour limiter les contaminations d'origine humaine à certaines étapes de la transformation,

...

La persistance des sources de contamination n'a pu être observée que de manière parcellaire et souvent très indirectement. Ainsi, les chèvres ayant généralement été prélevées en avril – mai 2004, le fait de trouver des souches issues d'animaux excréteurs dans le lait ou le fromage prélevé

ultérieurement traduit une persistance de l'excrétion dans le temps. Par contre, si une souche issue d'un lait individuel n'est pas isolée dans le lait de tank ou le fromage prélevé à la même période, on peut suspecter une excrétion quantitativement faible au moment de la prise d'échantillon (en cas d'infection d'origine staphylococcique, des fluctuations de l'intensité de l'excrétion en fonction du temps, sont classiquement décrites), l'origine mammaire de la contamination des produits devant alors être relativisée. La persistance des souches a également été mise en évidence par des contaminations communes d'une période à l'autre, voire d'une année sur l'autre (Contreras *et al.*, 1997 ; Mercier *et al.*, 1998). Dans ces conditions, la détection précoce des animaux infectés, l'adoption de traitements antibiotiques ciblés et enfin la réforme des chèvres incurables peuvent être considérés comme des éléments clés de la maîtrise de la contamination par *S. aureus* à l'échelle de la production.

En cas de toxi-infection alimentaire d'origine staphylococcique impliquant des fromages, les entérotoxines de type A et D sont les plus fréquemment incriminées. On montre par ailleurs, en analysant la répartition des *S. aureus* d'origine alimentaire en fonction de leur biotype, que plus de 80 % des souches entérotoxinogènes sont potentiellement d'origine humaine (Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999 ; Rosec, 1999). Le biotype des souches peut ainsi fournir une indication à la fois sur la provenance des souches (même si un biotype donné n'est pas systématiquement associé à une espèce-hôte) et sur les risques liés à leur potentiel d'entérotoxigénicité. Cet aspect de la caractérisation des souches a été abordé ici au travers de la recherche du gène codant la staphylokinase pour chaque isolat typé et, à l'échelle des élevages, par la recherche des gènes codant les entérotoxines.

Les souches « staphylokinase positives » ont pu être isolées chez l'homme (toutes les souches isolées sur les mains ou dans les fosses nasales) comme chez les chèvres. La présence de ce gène ne saurait donc présager à elle seule de l'origine des souches. La présence de souches de *S. aureus* « staphylokinase positives » sur les mains et dans les fosses nasales est conforme à ce que l'on pouvait attendre dans la mesure où ce gène est habituellement considéré comme un marqueur des souches humaines (Hajek et Marsalek, 1991). Sa forte présence pour les souches isolées des laits de demi-mamelles, de la peau des mamelles et des laits de tank pose la question de la possible contamination croisée homme/animal et /ou de la spécificité réelle de ce gène pour les souches d'origine humaine... L'existence de souches produisant la staphylokinase mais non associées à un hôte en particulier (biotypes non spécifiques) a pu être mise en évidence (Hennekine *et al.*, 2003). Il est possible que, dans le cas présent, tout ou partie des souches porteuses du gène codant la staphylokinase appartiennent à cette catégorie. La détermination des allèles *agr* sur un ensemble de souches isolées de mammites subcliniques va également dans le sens d'une proximité entre les souches d'origine humaine et celles impliquées dans les infections mammaires. Les souches se répartissent en effet entre les types *agr 1* (59,4 %) et 3 (40,6 %) ce qui constitue une différence avec la vache laitière. Chez cette espèce, *agr 1* est considéré comme très majoritaire pour les souches issues de mammites (environ 80%), le type *agr3* étant très rare (moins de 5%) (Cabral *et al.*, 2004 ; Takeuchi *et al.*, 2001). Les souches de type *agr3* sont plus couramment isolées chez l'homme (pathologie et portage), sachant toutefois que le type *agr* des souches de portage n'a pas été étudié chez les ruminants. L'absence d'hygiène de traite, répandue dans l'espèce caprine, pourrait éventuellement faciliter une contamination passive de la peau des mamelles préalable à la survenue d'infections.

Dans les fromages, la faible proportion de souches « staphylokinase positives » (11,2 %) traduit à la fois la faible probabilité de contamination des fromages par des souches susceptibles d'être d'origine humaine, possédant le gène de la staphylokinase, et la probable sélection des souches de *S. aureus* dès les premières étapes de la transformation : conditions de température et de pH influant la croissance, compétition microbienne incluant une possible compétition des souches de *S. aureus* entre elles...

La recherche des gènes codant les entérotoxines confirme la fréquence élevée des souches potentiellement entérotoxigènes parmi celles isolées de mammites caprines, la prédominance du gène *sec* codant l'entérotoxine C (da Silva *et al.*, 2005 ; Smyth *et al.*, 2005 ; Vimercati *et al.*, 2006) et la coexistence de *sec* et *tssE*. Les gènes *sea* et *sed* sont présents en faibles proportions (environ 3 % pour *sea*). D'autres gènes ont pu être détectés, parmi lesquels *seg* (6,7 %), *sej* (18 %), *sek* (9,8 %), *sel* (13,1 %) et *sem* (11,5 %). L'activité émétique des toxines correspondantes a été mise en évidence chez le singe pour les toxines SEG et SEH mais reste mal connue pour les toxines F à N. Il n'existe pas de données quant à leur implication dans les TIAC à ce jour.

Les résultats obtenus sur les raclages de souches rendent compte de la diversité des sources de contamination, les profils génomiques observés différant de ceux des souches isolées des laits individuels. Ils font également apparaître des différences selon la provenance géographique des laits et des fromages. Dans les fromages, ces variations sont vraisemblablement liées à l'adoption dans certaines régions de processus de transformation fromagère favorables à la croissance des souches de staphylocoques initialement présentes en faible quantité. Dans le lait de tank, en revanche, les différences entre secteurs géographiques sont plus difficilement interprétables et pourraient révéler des pratiques d'élevage également différentes.

En dépit de la fréquence élevée des souches potentiellement entérotoxigènes, aucune présence d'entérotoxines n'a été décelée dans les fromages analysés. Ces résultats confirment ceux obtenus par Lamprell (2003) qui mentionnait un risque accru de production d'entérotoxines de la part des souches porteuses des gènes *sea* et *sed* (minoritaires) comparativement aux souches potentiellement productrices de SEB ou SEC, ceci y compris pour des populations de *S. aureus* atteignant 10^7 à 10^8 ufc/g en début d'affinage. Le risque d'intoxication lié à ces produits semble donc extrêmement restreint.

D. Conclusions et perspectives

Un premier état des lieux de la contamination par *S. aureus* des laits et des fromages a été réalisé en filière caprine. Les premiers constats peuvent être considérés comme rassurants et ceci à double titre : d'une part, la proportion d'élevages présentant régulièrement des résultats élevés de contamination en staphylocoques coagulase positive dans les laits de tank peut être considérée comme faible (moins de 5 %), d'autre part les risques de production d'entérotoxines semblent limités (aucune détection dans le cadre du programme d'étude) en raison notamment des caractéristiques des souches les plus fréquemment isolées (pour la plupart potentiellement productrices d'entérotoxines de type C).

La présence des souches porteuses des gènes *sea* ou *sed* a néanmoins été rapportée. Ces souches, bien que minoritaires peuvent par conséquent être rencontrées dans les produits si les conditions de transformation le permettent, ce qui est notamment le cas en technologie de type présure (sans acidification), les conditions de température et de pH adoptées étant favorables à la croissance bactérienne.

Le typage des souches a mis en évidence une diversité des souches de *S. aureus* circulant dans les élevages que la prévalence (faible) des infections mammaires occasionnées par *S. aureus* ne laissait pas présager. Cette diversité rend également compte de l'existence de nombreuses sources possibles de contamination qu'il conviendrait de mieux identifier (certains profils de souches n'ont pu être rapportés à aucune source identifiée) et de hiérarchiser. A titre d'exemple, l'importance relative de la contamination cutanée (trayons notamment) dans la contamination finale du lait et des fromages demande à être quantifiée plus précisément. Il serait également intéressant d'apprécier l'incidence de différents facteurs individuels (présence de lésions cutanées, ...) ou de conduite d'élevage pour mieux

appréhender les modalités de contamination des laits de mélange puis des produits. Des travaux doivent être poursuivis en ce sens.

En s'appuyant sur la méthode MLVA qui figure parmi les méthodes de typage les plus discriminantes actuellement disponibles, il pourrait être envisagé de concevoir un outil diagnostique d'aide à la décision pour les éleveurs et les techniciens ou vétérinaires qui les accompagnent. Dans des contextes d'absence de maîtrise de la contamination par *S. aureus* (cas de produits sensibles notamment), lorsque l'identification et la gestion des animaux excréteurs ne suffisent pas à contrôler les niveaux de contamination du lait et/ ou des produits, un typage des souches pourrait servir à retracer l'origine des contaminations en *S. aureus* dans les laits et fromages et à définir les mesures de contrôle prioritaires à mettre en place en fonction des sources identifiées.

Chapitre 2

Evaluation d'un test ELISA pour le dépistage des chèvres infectées par *S. aureus*

La prise en considération des infections mammaires chez la chèvre et de leur incidence sur la qualité sanitaire du lait et des produits laitiers est encore récente dans la filière caprine. Dans un contexte étiologique caractérisé par la prédominance des infections d'origine staphylococcique (staphylocoques coagulase négative majoritairement et *Staphylococcus aureus*), les mesures de contrôle de la pathologie mammaire sont en principe connues et reposent à la fois sur des mesures curatives (traitement antibiotique au tarissement ; réforme des individus incurables) et préventives (adoption d'un ordre de traite, mise en place de mesures d'hygiène pendant tout ou partie de la lactation, amélioration des conditions de traite tant sur le plan de la technique de traite que de la conception et de l'entretien des installations). Ces mesures restent toutefois diversement appliquées en raison notamment de leur inadéquation avec les besoins des producteurs mais aussi des entreprises de collecte et de transformation du lait notamment en filière lait cru.

Au delà d'une exigence légitime de limitation des risques de santé publique, d'autres aspects de la conduite des troupeaux sont désormais considérés et incluent aussi bien le recours raisonné aux médicaments vétérinaires susceptible de prolonger l'efficacité des antibiotiques à usage vétérinaire (réduction des phénomènes d'antibiorésistance) que la prise en compte du bien-être animal. Concernant l'antibiothérapie, le problème est particulièrement aigu dans la filière caprine. Chez la chèvre en effet, le nombre restreint de spécialités bénéficiant d'une Autorisation de Mise sur le Marché (une seule disponible à ce jour) n'est pas sans conséquence, les producteurs ne disposant le plus souvent d'aucune référence sur les délais d'attente à respecter suite à l'utilisation d'antibiotiques dont la posologie et les protocoles d'emploi n'ont pas été adaptés à cette espèce. Dans ce contexte, il est important de définir précisément la cible des actions de gestion sanitaire (*S. aureus* est le pathogène majeur le plus fréquemment rencontré en élevages caprins), de hiérarchiser les mesures jugées prioritaires et de les mettre en œuvre de manière sélective plutôt que systématique.

Pour l'application de tels plans de contrôle, ciblés vis-à-vis des infections mammaires à *S. aureus*, le repérage des animaux excréteurs constitue indéniablement un point critique. Si l'on exclut les analyses bactériologiques, coûteuses et de réalisation délicate (nécessité de réaliser des prélèvements aseptiques), les seuls outils de dépistage actuellement disponibles sont fondés sur les numérations cellulaires individuelles encore souvent controversées (Haenlein, 2002) et dont la valeur prédictive positive à l'égard de *S. aureus* atteint seulement 30 % (de Cremoux et Poutrel, 2000). Le développement de techniques ELISA constitue une alternative intéressante car elles sont peu coûteuses (automatisables) et facilitent, lorsqu'elles sont fondées sur la détection d'anticorps, les prises d'échantillons (absence d'asepsie).

Des premières investigations, chez la vache laitière, ont porté sur le repérage direct ou indirect de la nucléase de *S. aureus* (Khan *et al.*, 1998 ; Yazdankhah *et al.*, 1999). Ces techniques, qui visent la détection directe des bactéries, présentent de nombreuses limites parmi lesquelles leur manque de sensibilité lié notamment à la variabilité de l'excrétion bactérienne au cours du temps et à l'absence d'accumulation des antigènes induite par la vidange de la mamelle à chaque traite. Par ailleurs ces techniques ne permettent pas non plus de s'affranchir des contraintes imposées par la réalisation de prélèvements aseptiques de lait.

Une autre stratégie a visé à détecter des anticorps spécifiques de *S. aureus* sécrétés en réponse à l'infection. Dans ce cas, des résultats faussement négatifs peuvent être obtenus pour des infections très récentes (Snoep *et al.*, 1995). Par ailleurs, une forte proportion d'animaux possédant des anticorps naturels dirigés contre *S. aureus*, une transudation importante des anticorps du sang vers la mamelle peut induire des résultats faussement positifs (Ménard et Heuchel, 1994). Le choix des préparations antigéniques est par conséquent primordial. Un premier test ELISA a été développé par Adams *et al.* (1988) à partir d'une fraction de protéines extracellulaires de petite masse moléculaire non caractérisées obtenue par chromatographie de tamisage moléculaire. Ce test, commercialisé aux Etats-Unis (Pro-Staph™), n'a pas donné, après évaluation sur le terrain, en France, les résultats escomptés, avec notamment une proportion de résultats faussement négatifs de 70%. Privilégiant pour le choix des préparations antigéniques des molécules vis-à-vis desquelles les animaux possèdent le moins d'anticorps naturels possible, Meunier (1999) a alors suggéré de recourir soit à un mélange de protéines basiques obtenu à partir du surnageant de culture de *S. aureus* après chromatographie d'échanges d'ions, soit à une protéine cellulaire présentant des homologues avec une protéine de *S. aureus* fixant la vitronectine.

Ces travaux préliminaires ont d'abord été poursuivis chez la vache laitière dans le cadre du Programme de recherche AQS 2001 piloté par l'INRA de Nouzilly. Dans le prolongement de cette étude, un travail exploratoire a été réalisé sur les laits de chèvres avec l'objectif d'évaluer son intérêt pour le repérage spécifique des chèvres excrétrices de *S. aureus*.

A. Matériel et méthodes

1 Sélection des exploitations et réalisation des échantillons

Une première série de tests a été réalisée en 2004 dans 8 exploitations caprines situées dans la zone AOC Banon. Des prélèvements aseptiques de lait par demi-mamelle ont été effectués sur les chèvres en lactation. Ils ont été transportés sous couvert du froid et congelés à -20°C en attente de leur traitement par l'INRA de Nouzilly. Des analyses bactériologiques ont ensuite été effectuées afin de définir le statut infectieux de chaque mamelle. Des échantillons de lait individuel ont été reconstitués à partir des prélèvements des laits de chaque demi-mamelle en vue de la recherche d'anticorps.

En 2005, cinq exploitations supplémentaires ont été choisies sur la base de l'existence d'autocontrôles positifs (dépassement du seuil de 10^5 ufc/g sur un échantillon de fromages) : 3 en zone AOC Banon, 1 en zone AOC Pélardon, 1 en zone AOC Ste Maure de Touraine. Des analyses bactériologiques (INRA de Nouzilly) et des dénombrements sur milieu spécifique BP-RPF (Laboratoire d'analyse du Vaucluse) ont été réalisés sur les laits de demi-mamelles afin d'isoler les souches issues des laits des chèvres excrétrices. Des prélèvements de laits individuels (mélange des laits des deux demi-mamelles) ont été effectués simultanément afin de permettre la réalisation, sur les mêmes échantillons et après adjonction d'un conservateur, de comptages cellulaires (laboratoires d'analyses laitières de chacune des régions dont proviennent les exploitations) et de l'ELISA. Les prélèvements ont été réalisés entre mai et juillet 2005.

2 Principe et réalisation du test

L'ELISA vise à détecter de manière spécifique la présence d'anticorps dans le lait des chèvres infectées par *S. aureus*. Sachant que *S. aureus* présente un portage cutané et muqueux, il est probable que l'ensemble des animaux possèdent des anticorps dans le lait contre *S. aureus* sans pour autant qu'ils aient tous des mammites à *S. aureus*. D'où l'importance du choix des préparations antigéniques

supportant le test, l'objectif étant de recourir dans la mesure du possible à des antigènes susceptibles de n'être rencontrés que lors d'une infection mammaire effective de l'animal.

Trois préparations antigéniques différentes (une préparation contenant deux protéines en quantité égale et deux préparations contenant une protéine) ont été initialement évaluées. L'une d'entre elles a par la suite été écartée au vu des résultats obtenus tant chez la vache laitière que chez la chèvre.

L'expérience acquise au cours du programme AQS a orienté la méthode d'évaluation du test. Il semble en effet qu'un seuil de positivité global, valable dans tous les élevages, puisse difficilement être défini. Les seuils ont par conséquent été raisonnés à l'échelle du troupeau.

Ainsi, dans chaque exploitation, prend on en compte l'ensemble des densités optiques à 450 nm (DO) obtenues à partir des laits de tous les animaux. La moyenne arithmétique et l'écart-type des DO sont calculés et permettent de définir un seuil de positivité.

Sur cette base, plusieurs essais ont été effectués :

- définition des seuils sur des laits purs ou dilués au dixième ;
- définition de seuils en écartant les 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus fortes (ou, le cas échéant, les plus faibles).

Les résultats obtenus par ELISA ont été comparés à ceux déterminés par des analyses bactériologiques (méthode de référence). La valeur des tests a ainsi pu être évaluée en s'appuyant sur le calcul des valeurs de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives et efficience.

3 Evaluation des possibilités d'adaptation du test aux conditions d'encadrement et de suivi de la filière caprine

Sous réserve de l'efficacité de l'ELISA pour le dépistage des animaux excréteurs, ses conditions d'emploi sur le terrain doivent être discutées afin d'être en adéquation avec les besoins des producteurs et des techniciens qui les accompagnent. Ainsi différentes questions se sont posées et ont concerné :

- les objectifs du dépistage : utilisation du test dans un contexte d'urgence (repérage rapide et précis des chèvres excrétrices de manière à ce que le lait ou le fromage puisse de nouveau être commercialisé) ou au contraire dans un contexte de prévention des risques de non-conformité (repérage des animaux excréteurs en vue d'une optimisation de la gestion sanitaire du troupeau : ciblage des traitements et/ou des réformes ou encore définition de lots de traite) ;
- les caractéristiques des animaux soumis au dépistage : réalisation ou non d'un tri préalable des chèvres par l'analyse de leurs numérations cellulaires. L'enjeu est en partie économique. Le recours à un tri préalable des chèvres implique de considérer *a priori* que la sensibilité peut être légèrement détériorée sans que l'éleveur soit pénalisé de manière importante.
- Le moment de réalisation du test : nécessité ou non de définir des périodes à privilégier pour la réalisation du test.

3.1 Ciblage préalable des chèvres présumées infectées

Après concertation avec les partenaires de terrain et en tenant compte de la réalité des investigations conduites en production fermière en cas d'autocontrôle positif, il a semblé intéressant d'évaluer dans quelle mesure le test ELISA pourrait remplacer des analyses bactériologiques pour repérer des chèvres excrétrices de *S. aureus* dans une population ciblée d'animaux. Des simulations ont donc été réalisées

en ne considérant qu'une fraction de la population après ciblage des chèvres à partir de leurs résultats de numérations cellulaires individuelles. Différents seuils de numérations cellulaires ont été envisagés.

3.2 Evaluation du recours à un seuil universel de positivité

La possibilité de définir un seuil universel de positivité identique pour l'ensemble des troupeaux a été examinée. Pour ce faire, trois essais ont été réalisés en recourant aux antigènes 3 et 4 considérés comme les plus prometteurs au regard des précédents résultats. L'antigène 3 a fait l'objet de deux analyses correspondant à des protocoles de purification différents.

3.3 Evolution des densités optiques (DO) des laits provenant de chèvres d'un même élevage au cours du temps

Un essai a été conduit fin 2006 sur les chèvres de la station caprine expérimentale du Pradel en vue de décrire la cinétique des anticorps au cours du temps.

3.3.1 Protocole d'étude

59 chèvres ont été suivies entre juillet et octobre 2006. Leurs laits ont été prélevés 2 fois par mois en vue de leur analyse par ELISA (mesure des DO sur les laits de mélange des deux demi-mamelles). Les numérations cellulaires des chèvres ont également été déterminées. Enfin une analyse bactériologique a été faite sur les laits de demi-mamelles en fin de lactation.

Compte tenu de l'objectif visé, l'ensemble des prélèvements (N=8) provenant d'un même animal a été analysé simultanément. Six plaques ont été employées. Sur chacune d'elle, six lait différents ont été systématiquement déposés : laits des chèvres 246 du 07/07, 52 du 20/07, 452 du 02/08, 349 du 18/08, 5041 du 31/08 et 945 du 19/09.

3.3.2 Traitement des données

La variabilité des densités optiques a été étudiée afin :

- d'évaluer l'incidence du statut infectieux des animaux (et/ou des numérations cellulaires) sur les résultats de DO ;
- de comparer la variabilité intra- et inter- individuelle afin d'apprécier la capacité du test à détecter les animaux infectés à des moments différents sur la période d'étude.

L'étude de la variation de la DO en fonction du statut infectieux et des numérations cellulaires a reposé sur le modèle suivant :

$$y_{ijks} = \mu + \alpha_i + \beta(\alpha)_{ij} + \theta_k + \delta_s + \lambda_c + \delta_s * \lambda_c + e_{ijk}$$

y_{ijk} densité optique pour la chèvre j de la plaque i à la date k au statut infectieux s

μ moyenne générale

α_i effet de la plaque i (6 plaques)

$\beta(\alpha)_{ij}$ effet de la chèvre j hiérarchisé dans l'effet de la plaque i

θ_k effet de la date de prélèvement (8 dates)

δ_s effet du statut infectieux (2 classes)

λ_c effet des numérations cellulaires (3 classes)

$\delta_s * \lambda_c$ interaction numération cellulaire*statut infectieux

Les effets plaques, chèvre et date de prélèvement ont été considérés comme facteurs aléatoires.

Deux classes de statut infectieux ont été définies :

- absence d'infection dans les deux demi-mamelles : chèvre saine ;
- infection dans au moins une des demi-mamelles par des staphylocoques coagulase négative.

Une seule chèvre s'est révélée infectée par *S. aureus* (infection unilatérale). Cette catégorie d'infection n'a donc pas pu être prise en compte dans l'analyse.

Trois classes de numérations cellulaires ont été établies :

- moins de 0,75 million cellules/ml ;
- de 0,75 à 2 millions de cellules par ml ;
- plus de 2 millions de cellules par ml.

L'étude comparée des variations intra-individu et des variations inter-individus a été réalisée par une analyse de variance en s'appuyant sur le modèle suivant :

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta(\alpha)_{ij} + \theta_k + e_{ijk}$$

y_{ijk} densité optique pour la chèvre j de la plaque i à la date k

μ moyenne générale

α_i effet de la plaque i (6 plaques)

$\beta(\alpha)_{ij}$ effet de la chèvre j hiérarchisé dans l'effet de la plaque i

θ_k effet de la date de prélèvement (8 dates)

Les effets plaques, chèvre et date de prélèvement ont été considérés comme facteurs aléatoires.

B. Résultats

1 Evaluation de l'ELISA en élevages caprins

1.1 Evaluation en élevage en l'absence de sélection des exploitations sur des critères sanitaires (2004)

Dans cette première partie de l'étude, 280 chèvres issues de 8 exploitations ont été suivies parmi lesquelles 18 ont été reconnues infectées par *S. aureus* sur la foi des analyses bactériologiques réalisées sur les laits de demi-mamelles.

Une synthèse des résultats correspondants est présentée dans le tableau 1 et en Annexe 2.

En écartant les 3 chèvres présentant les plus fortes valeurs de DO et en définissant un seuil de positivité à $M+sd$, les résultats obtenus conduisent à une sensibilité comprise entre 67 et 94 % et une spécificité comprise entre 79 et 83 % selon la préparation antigénique considérée. Ces résultats peuvent donc être considérés comme prometteurs.

Tableau 1 : Résultats globaux des tests ELISA obtenus à partir des laits de chèvres de 8 exploitations : évaluation de trois préparations antigéniques

			Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	Efficienc	
Ag2	Laits 1/1	M	66,7	68,7	12,8	96,8	68,6	
		M+Sd	44,4	87,8	20,0	95,8	85,0	
	-3ch	M						
		M+Sd	66,7	74,8	15,4	97,0	74,3	
	Laits 1/10	M	66,7	71,0	13,6	96,9	70,7	
		M+Sd	44,4	92,4	28,6	96,0	89,3	
-3ch		M						
		M+Sd	72,2	79,0	19,1	97,6	78,6	
Ag3	Laits 1/1	M	88,9	62,2	13,9	98,8	63,9	
		M+Sd	61,1	86,3	23,4	97,0	84,6	
	-3ch	M	94,4	54,2	12,4	99,3	56,8	
		M+Sd	83,3	77,1	20,0	98,5	77,5	
	Laits 1/10	M	94,4	67,2	16,5	99,4	68,9	
		M+Sd	72,2	89,7	32,5	97,9	88,6	
		-3ch	M	94,4	62,6	14,8	99,4	64,6
			M+Sd	94,4	80,2	24,6	99,5	81,1
Ag4	Laits 1/1	M	86,7	58,4	10,9	98,7	60,0	
		M+Sd	73,3	88,2	26,8	98,3	87,4	
	-3ch	M	86,7	52,2	9,6	98,5	54,1	
		M+Sd	86,7	83,5	23,6	99,1	83,7	

Ag : antigène; laits 1/1 : laits purs ; laits 1/10 : laits dilués au dixième ; -3 ch : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus fortes ; M: moyenne; Sd : écart type ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative

1.2 Evaluation dans des élevages sélectionnés sur l'existence d'autocontrôles positifs (2005)

Une synthèse des résultats obtenus dans les 5 exploitations identifiées sur la base d'autocontrôles positifs dans les produits est présentée dans les tableaux 2 et 3.

En écartant les 3 chèvres présentant les plus fortes valeurs de DO et en définissant un seuil de positivité à M+sd, les résultats obtenus permettent d'obtenir une sensibilité de 47 à 94 % et une spécificité de 53 à 92 % selon la préparation antigénique et la dilution considérées. La valeur prédictive négative est supérieure à 92 % tandis que la valeur prédictive positive varie de 20 à 49 %.

Ces résultats pourraient sans doute être améliorés si on éliminait 3 chèvres de l'un des élevages (P4) qui ne manifestent aucune réaction cellulaire malgré la présence de *S. aureus* dans leurs laits. La question est posée de la justesse de la suspicion de mammites dans de telles circonstances.

Une synthèse des travaux conduits en 2004 et 2005 montre que les meilleurs résultats sont obtenus en recourant à l'antigène 3 sur des laits dilués 10 fois et en utilisant la moyenne additionnée d'un écart-type comme seuil de positivité après retrait des 3 valeurs de DO les plus fortes (Tableau 4).

Dans ces conditions, sur un ensemble de 516 chèvres étudiées, le test détecte 42 chèvres excrétrices sur 50 et 426 chèvres non excrétrices de *S. aureus* sur 516 soit : une sensibilité de 84 % et une spécificité de 82,6 %. Les valeurs prédictives positive et négative atteignent respectivement 39,7 et 96,9 %.

Tableau 2 : Evaluation de la concordance entre les résultats obtenus par analyse bactériologique et par l'ELISA selon la préparation antigénique employée et les seuils de densité optique retenus : détermination des effectifs pour chacune des 5 exploitations suivies

Antigène Laits			Codes des élevages suivis											
			P1		P2		P3		P4		P5		Total	
			SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+
			1	45	6	35	4	41	20	72	1	61	32	254
			Elisa	E +	E -	E +	E -	E +	E -	E +	E -	E +	E -	
			Bact	b +	b -	b +	b -	b +	b -	b +	b -	b +	b -	
Ag2	1/1	M	1	23	5	22	4	26	16	54	1	41	27	166
		M+Sd	0	39	3	33	2	35	9	66	1	53	15	226
	-3ch	M	1	20	5	20	4	24	16	52	1	35	27	151
		M+Sd	1	34	4	31	3	33	19	10	1	50	28	158
	1/10	M	0	29	4	34	3	32	11	57	1	45	19	197
		M+Sd	0	38	1	40	1	38	9	67	0	55	11	238
	-3ch	M	1	25	4	22	4	30	13	52	1	41	23	170
		M+Sd	0	32	4	30	3	35	10	64	1	52	18	213
Ag3	1/1	M	1	22	5	22	4	21	18	42	1	31	29	138
		M+Sd	1	40	3	31	1	38	8	66	1	53	14	228
	-3ch	M	1	18	5	19	4	20	18	41	1	31	29	129
		M+Sd	1	37	4	30	2	37	9	65	1	48	17	217
	1/10	M	1	30	6	25	4	21	17	52	1	35	29	163
		M+Sd	1	39	5	34	2	39	14	69	1	49	23	230
	-3ch	M	1	27	6	21	4	21	18	49	1	35	30	153
		M+Sd	1	35	5	33	4	33	14	66	1	49	25	216
Ag4	1/1	M	1	31	5	26	4	22	16	44	1	35	27	158
		M+Sd	1	39	5	33	4	35	11	65	1	53	22	225
	-3ch	M	1	27	5	21	4	20	16	44	1	32	27	144
		M+Sd	1	35	5	31	4	35	11	63	1	50	22	214
	1/10	M	1	30			4	28	14	57	1	41	20	156
		M+Sd	1	39			3	35	9	71	1	57	14	202
	-3ch	M	1	27			4	24	15	52	1	41	21	144
		M+Sd	1	33			4	35	12	62	1	49	18	179

Ag : antigène; laits 1/1 : laits purs ; laits 1/10 : laits dilués au dixième ; -3 ch : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus fortes ;

M: moyenne; Sd : écart type ;

E+ : animaux considérés comme infectés par *S. aureus* par la technique ELISA ; E- : animaux considérés comme non infectés par *S. aureus* par la technique ELISA ; b+ : animaux considérés comme infectés par *S. aureus* après analyse bactériologique de leur lait ; b - : animaux considérés comme non infectés par *S. aureus* après analyse bactériologique de leur lait

Tableau 3 : Résultats globaux des tests ELISA obtenus à partir des laits de chèvres de 5 exploitations : évaluation de trois préparations antigéniques

			Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	Efficience (%)	
Ag2	Laits 1/1	M	84,4	65,4	23,5	97,1	67,5	
		M+Sd	46,9	89,0	34,9	93,0	84,3	
		-3ch	M	84,4	59,4	20,8	96,8	62,2
			M+Sd	87,5	62,2	22,6	97,5	65,0
	Laits 1/10	M	59,4	77,6	25,0	93,8	75,5	
		M+Sd	34,4	93,7	40,7	91,9	87,1	
		-3ch	M	71,9	66,9	21,5	95,0	67,5
			M+Sd	56,3	83,9	30,5	93,8	80,8
Ag3	Laits 1/1	M	88,9	90,6	54,3	20,0	97,9	
		M+Sd	61,1	43,8	89,8	35,0	92,7	
		-3ch	M	94,4	90,6	50,8	18,8	97,7
			M+Sd	83,3	53,1	85,4	31,5	93,5
	Laits 1/10	M	90,6	64,2	24,2	98,2	67,1	
		M+Sd	71,9	90,6	48,9	96,2	88,5	
		-3ch	M	93,8	60,2	22,9	98,7	64,0
			M+Sd	78,1	85,0	39,7	96,9	84,3
Ag4	Laits 1/1	M	84,4	62,2	22,0	96,9	64,7	
		M+Sd	68,8	88,6	43,1	95,7	86,4	
		-3ch	M	84,4	56,7	19,7	96,6	59,8
			M+Sd	68,8	84,3	35,5	95,5	82,5
	Laits 1/10	M	76,9	71,2	24,1	96,3	71,8	
		M+Sd	53,8	92,2	45,2	94,4	88,2	
		-3ch	M	80,8	65,8	21,9	96,6	67,3
			M+Sd	69,2	81,7	31,0	95,7	80,4

Tableau 4 : Evaluation de l'ELISA : synthèse des résultats obtenus au cours des années 2004 et 2005

		SC+		Non SC+		Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	Efficience (%)
		Effectif	50	516						
		Elisa Bact	E + b +	E - b -						
Ag2	Laits purs	M	39	346	78,0	67,1	18,7	96,9	68,0	
		M+Sd	23	456	46,0	88,4	27,7	94,4	84,6	
		-3ch	M	39	241	78,0	46,7	12,4	95,6	49,5
			M+Sd	40	364	80,0	70,5	20,8	97,3	71,4
	Laits 1/10	M	31	383	62,0	74,2	18,9	95,3	73,1	
		M+Sd	19	480	38,0	93,0	34,5	93,9	88,2	
		-3ch	M	34	296	68,0	57,4	13,4	94,9	58,3
			M+Sd	31	420	62,0	81,4	24,4	95,7	79,7
Ag3	Laits purs	M	45	301	90,0	58,3	17,3	98,4	61,1	
		M+Sd	25	454	50,0	88,0	28,7	94,8	84,6	
		-3ch	M	46	271	92,0	52,5	15,8	98,5	56,0
			M+Sd	32	419	64,0	81,2	24,8	95,9	79,7
	Laits 1/10	M	46	339	92,0	65,7	20,6	98,8	68,0	
		M+Sd	36	465	72,0	90,1	41,4	97,1	88,5	
		-3ch	M	47	317	94,0	61,4	19,1	99,1	64,3
			M+Sd	42	426	84,0	82,6	31,8	98,2	82,7
Ag4 Laits purs	M	43	314	91,5	61,7	18,1	98,7	64,2		
	M+Sd	35	458	74,5	90,0	40,7	97,4	88,7		
	-3ch	M	43	280	91,5	55,0	15,8	98,6	58,1	
		M+Sd	38	434	80,9	85,3	33,6	98,0	84,9	

Ag : antigène; laits 1/1 : laits purs ; laits 1/10 : laits dilués au dixième ; -3 ch : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus fortes ; M : moyenne; Sd : écart type ; E+ : animaux considérés comme infectés par S. aureus par la technique ELISA ; E- animaux considérés comme non infectés par S. aureus par la technique ELISA ; b+ : animaux considérés comme infectés par S. aureus après analyse bactériologique de leur lait ; b - : animaux considérés comme non infectés par S. aureus après analyse bactériologique de leur lait

2 Adaptation des conditions de mise en œuvre de l'ELISA

2.1 Détermination des méthodes de dépistage des chèvres infectées par *S aureus* appliquées sur le terrain

Un ensemble d'enquêtes a été réalisé en vue de mieux appréhender la manière dont est abordée la problématique des contaminations par *S. aureus* du lait collecté ou des produits en filière caprine.

Deux types de contextes ont été définis :

- *Pour les éleveurs livreurs* : C'est l'analyse du lait de tank qui donne l'alerte. Le seuil dépend de l'entreprise collectrice (du type de produit fabriqué) : 100 ufc / ml (AOC Banon), 500 ufc/ml (AOC Ste Maure de Touraine) ;
- *Pour les éleveurs fermiers* : C'est l'analyse du fromage qui donne l'alerte (10000 ufc/ g pour le Banon ; nombre très variable pour le Ste Maure), éventuellement l'analyse du lait.

Dans tous les cas, ni les numérations cellulaires de tank ni l'existence de mammites cliniques ne sont en soit des éléments susceptibles de déclencher une intervention dans l'exploitation.

Le repérage des chèvres excrétrices peut reposer sur deux ensembles d'informations :

- *Recours aux numérations cellulaires individuelles* (le plus souvent dans le cadre de suivi au contrôle laitier)
 - Les chèvres sont triées en fonction de leur historique de numérations cellulaires : chèvres présentant plus de 3 contrôles supérieurs à 2 000 000 cellules par ml ou ayant été présumées infectées par des pathogènes majeurs l'année précédente. Si le nombre de contrôles disponibles est inférieur à 6, c'est le plus souvent le contrôle le plus récent qui est considéré. Se rajoutent à ces animaux toutes les chèvres sélectionnées par l'éleveur (état général pris en compte).
 - Environ 10 à 15 % des chèvres sont concernées.
 - Des analyses bactériologiques sont réalisées sur les laits individuels (lait de mélange des deux demi-mamelles) : il s'agit d'analyses en frais sur milieu sélectif. Le niveau de dénombrement permettant de considérer la chèvre comme infectée est lié à la sensibilité de l'analyse : > 10 ufc/ml.
- *Recours à des analyses bactériologiques sur laits de petit mélange* (le plus souvent hors contrôle laitier)
 - Les chèvres sont mises en lot au hasard. La taille des lots est variable : 5 à 10 chèvres (soit 10 à 20 laits de demi-mamelles). Les analyses sont conduites en frais, sur milieu sélectif, éventuellement après enrichissement (cas de l'AOC Banon).
 - Des analyses individuelles sont réalisées dès que le lait de petit mélange est considéré comme positif : > 10 ufc/ml ou notification d'une présence de *S. aureus* si l'analyse a été faite après enrichissement. La proportion de chèvres concernées varie de 5 à 10 % en moyenne (mais cela peut atteindre 40 % dans certaines exploitations).
 - *A priori* les chèvres sont considérées comme positives dès lors qu'il y a plus de 10 ufc/ml dans le lait. Cependant cela ne présage pas de la nature de l'intervention à réaliser sur l'animal. Les décisions de traitement ou de réforme dépendent de la proportion des animaux excréteurs dans le troupeau. Sont généralement visées les chèvres considérées comme les plus excrétrices (le seuil est alors variable et peut éventuellement être supérieur à 1000 ufc/ml) de manière à ce que l'éleveur puisse continuer à transformer la majeure partie de son lait. Les animaux sont susceptibles d'être recontrôlés, le plus souvent si les résultats de contrôle des fromages sont à nouveau positifs (non conformes).

Ces démarches de terrain présentent toutes certaines limites liées notamment aux modalités de réalisation des analyses bactériologiques. Le recours à des milieux sélectifs ne permet pas d'évaluer la qualité des prélèvements et leur possible contamination. La seule présence de bactéries dans le lait révèle l'existence d'une infection mammaire. La réalisation de dénombrements et la prise en compte d'un seuil peuvent donc paraître discutables. De même la variabilité de l'excrétion au cours du temps ne permet aucunement d'assurer que les chèvres considérées comme les plus excrétrices à un moment donné, soient effectivement celles qui contribuent le plus à la contamination persistante du lait du troupeau ni qu'elles doivent être traitées ou réformées en priorité.

2.2 Ciblage préalable des chèvres à partir des résultats de numérations cellulaires

Pour l'évaluation du test ELISA après ciblage d'une partie de la population sur un critère cellulaire, seules les préparations antigéniques 3 et 4 ont été retenues. Les seuils ont été définis après détermination des densités optiques dans la population ciblée uniquement. Le tri des chèvres testées a reposé sur une détermination ponctuelle des numérations cellulaires individuelles (pas de prise en compte d'un éventuel historique). Deux seuils ont été évalués : 750 000 cellules par ml et 1 000 000 cellules par ml. Les tableaux 5 et 6 synthétisent les résultats obtenus dans la population ciblée.

Tableau 5 : Résultats des tests ELISA dans 5 exploitations : évaluation après ciblage des individus présentant des résultats de numérations cellulaires supérieurs à 750 000 cellules par ml

Effectif		Codes des élevages suivis												Sens. (%)	Spé.; (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eff. (%)	
		P1		P2		P3		P4		P5		Total							
		SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+						
Ag3	Laits 1/1	M	1	7	4	5	3	16	13	7	1	88	22	43	78,6	58,9	42,3	87,8	64,4
		M+Sd	1	9	1	7	1	22	5	15	1	11	9	64	32,1	87,7	50,0	77,1	72,3
	-3ch	M	1	6	4	4	4	13	15	7	1	7	25	37	89,3	50,7	41,0	92,5	61,4
	Max	M+Sd	1	6	3	6	3	20	5	14	1	9	13	55	46,4	75,3	41,9	78,6	67,3
	-3ch	M	1	8	3	6	3	18	10	9	1	8	18	49	64,3	67,1	42,9	83,1	66,3
	Min	M+Sd	1	9	1	8	1	23	5	15	1	13	9	68	32,1	93,2	64,3	78,2	76,2
	Laits 1/10	M	1	7	4	7	4	16	14	12	1	8	24	50	85,7	68,5	51,1	92,6	73,3
		M+Sd	1	9	2	7	2	24	4	15	1	12	10	67	35,7	91,8	62,5	78,8	76,2
	-3ch	M	1	4	4	6	4	13	16	10	1	6	26	39	92,9	53,4	43,3	95,1	64,4
	Max	M+Sd	1	7	4	7	3	21	4	15	1	9	13	59	46,4	80,8	48,1	79,7	71,3
	-3ch	M	1	8	4	7	4	18	14	11	1	9	24	53	85,7	72,6	54,5	93,0	76,2
	Min	M+Sd	1	10	2	7	1	24	2	15	1	13	7	69	25,0	94,5	63,6	76,7	75,2
Ag4	Laits 1/1	M	1	5	4	6	4	16	14	11	1	9	24	47	85,7	64,4	48,0	92,2	70,3
		M+Sd	1	9	2	6	2	22	5	13	1	11	11	61	39,3	83,6	47,8	78,2	71,3
	-3ch	M	1	5	4	5	4	15	14	11	1	8	24	44	85,7	60,3	45,3	91,7	67,3
	Max	M+Sd	1	6	3	6	4	20	7	13	1	12	16	57	57,1	78,1	50,0	82,6	72,3
	-3ch	M	1	6	3	6	4	17	14	12	1	11	23	52	82,1	71,2	52,3	91,2	74,3
	Min	M+Sd	1	9	1	6	2	22	4	13	1	12	9	62	32,1	84,9	45,0	76,5	70,3
	Laits 1/10	M	1	7	2	6	4	20	12	12	1	11	20	56	71,4	76,7	54,1	87,5	75,2
		M+Sd	1	9	1	7	3	25	4	15	1	14	10	70	35,7	95,9	76,9	79,5	79,2
	-3ch	M	1	5	4	5	4	13	12	11	1	6	22	40	78,6	54,8	40,0	87,0	61,4
	Max	M+Sd	1	6	4	7	4	20	9	14	1	10	19	57	67,9	78,1	54,3	86,4	75,2
	-3ch	M	1	9	2	7	4	20	12	13	1	12	20	61	71,4	83,6	62,5	88,4	80,2
	Min	M+Sd	1	10	1	7	3	25	3	15	1	14	9	71	32,1	97,3	81,8	78,9	79,2

Ag : antigène; laits 1/1 : laits purs ; laits 1/10 : laits dilués au dixième ; -3 ch Max : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus fortes ; -3 ch Min : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus faibles ; N : effectif de chèvres infectées par *S. aureus* (SC+) ou non infectées par *S. aureus* (Non SC+) au sein de la population triée sur la foi des numérations cellulaires ; N tot : effectifs des chèvres infectées ou non infectées dans la population totale ; M : moyenne; Sd : écart type ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative ; Sens : sensibilité ; Spé : spécificité ; Eff : efficacité

Tableau 6 : Résultats des tests ELISA dans 5 exploitations : évaluation après ciblage des individus présentant des résultats de numérations cellulaires supérieurs à 1 000 000 cellules par ml

		Codes des élevages suivis																		
		P1		P2		P3		P4		P5		Total		Sens. (%)	Spé.; (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eff. (%)		
Effectif	N/Ntot	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+							
Ag3	Laits 1/1	M	1	3	3	3	3	13	11	6	1	3	19	28	73,1	56,0	46,3	80,0	61,8	
		M+Sd	1	5	1	4	1	19	4	12	1	7	8	47	30,8	94,0	72,7	72,3	72,4	
	-3ch	M	1	1	4	3	4	9	12	4	1	3	22	20	84,6	40,0	42,3	83,3	55,3	
		M+Sd	1	2	3	3	3	16	5	12	1	4	13	37	50,0	74,0	50,0	74,0	65,8	
	-3ch	M	1	5	2	3	3	14	8	8	1	5	15	35	57,7	70,0	50,0	76,1	65,8	
		M+Sd	0	5	1	4	1	19	5	12	1	7	8	47	30,8	94,0	72,7	72,3	72,4	
	Laits 1/10	M	1	4	4	4	4	14	14	9	1	4	24	35	92,3	70,0	61,5	94,6	77,6	
		M+Sd	1	6	2	4	1	19	2	12	1	6	7	47	26,9	94,0	70,0	71,2	71,1	
		-3ch	M	1	2	4	3	4	11	15	8	1	2	25	26	96,2	52,0	51,0	96,3	67,1
		Max	M+Sd	1	3	4	4	3	17	4	12	1	4	13	40	50,0	80,0	56,5	75,5	69,7
		-3ch	M	1	5	2	4	4	14	14	11	1	6	22	40	84,6	80,0	68,8	90,9	81,6
		Min	M+Sd	1	6	2	4	1	19	2	12	1	7	7	48	26,9	96,0	77,8	71,6	72,4
Ag4	Laits 1/1	M	1	3	4	4	4	12	13	9	1	5	23	33	88,5	66,0	57,5	91,7	73,7	
		M+Sd	1	5	3	4	2	18	4	10	1	6	11	43	42,3	86,0	61,1	74,1	71,1	
	-3ch	M	1	3	4	3	4	11	13	9	1	3	23	29	88,5	58,0	52,3	90,6	68,4	
		M+Sd	1	3	4	3	1	20	6	10	1	3	13	39	50,0	78,0	54,2	75,0	68,4	
	-3ch	M	1	5	2	4	4	15	12	9	1	5	20	38	76,9	76,0	62,5	86,4	76,3	
		M+Sd	1	6	1	4	1	19	4	11	1	6	8	46	30,8	92,0	66,7	71,9	71,1	
	Laits 1/10	M	1	5	2	4	4	15	11	10	1	6	19	40	73,1	80,0	65,5	85,1	77,6	
		M+Sd	1	6	2	4	3	18	3	12	1	7	10	47	3	94,0	76,9	74,6	75,0	
		-3ch	M	1	1	4	3	4	14	11	9	1	2	21	29	80,8	58,0	50,0	85,3	65,8
		Max	M+Sd	1	4	4	4	3	17	8	10	1	4	17	39	65,4	78,0	60,7	81,3	73,7
		-3ch	M	1	5	2	4	4	15	9	10	1	6	17	40	65,4	80,0	63,0	81,6	75,0
		Min	M+Sd	1	6	1	4	3	20	3	0	1	7	9	37	34,6	74,0	40,9	68,5	60,5

Ag : antigène; laits 1/1 : laits purs ; laits 1/10 : laits dilués au dixième ; -3 ch Max : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus fortes ; -3 ch Min : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus faibles ; N : effectif de chèvres infectées par *S. aureus* (SC+) ou non infectées par *S. aureus* (Non SC+) au sein de la population triée sur la foi des numérations cellulaires ; N tot : effectifs des chèvres infectées ou non infectées dans la population totale ; M : moyenne ; Sd : écart type ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative ; Sens : sensibilité ; Spé : spécificité ; Eff : efficacité

La valeur du test varie selon les modalités d'application du test ELISA. Les meilleurs résultats de sensibilité sont obtenus avec l'antigène 3 après dilution au 1/10^{ème} des laits et retrait des 3 chèvres présentant les valeurs de densités optiques les plus fortes. Elle atteint dans ce cas 92,9 à 96,2 % pour des seuils de numérations cellulaires fixés respectivement à 750 000 et 1 000 000 cellules par ml. Pour la population ciblée, la spécificité est de l'ordre de 52 à 53 %. La valeur prédictive négative est supérieure à 95 % environ. La valeur prédictive positive augmente légèrement et atteint de 43,3 à 51 %.

Le seuil de 750 000 cellules par ml apparaît comme le plus favorable dans la mesure où il permet de détecter 26 chèvres excrétrices de *S. aureus* contre 25 seulement en fixant le seuil à un million de cellules par ml.

A l'échelle de l'élevage, l'intérêt de cette démarche dépend à la fois de la sensibilité et la spécificité des numérations cellulaires et de celles de l'ELISA. Les résultats sont, de fait, conditionnés au mode de tri préalable des animaux. Les animaux présentant des résultats de numérations cellulaires inférieurs au seuil sont d'emblée présumés non infectés. Quatre chèvres pour lesquelles les recherches de *S. aureus* dans le lait s'étaient avérées positives sont ainsi écartées et non testées par l'ELISA. Trois d'entre elles, appartenant à l'élevage P4, peuvent cependant être considérées comme « douteuses ». Une fois éliminées, on peut considérer que la succession des tests permet de repérer 25 à 26 chèvres excrétrices sur 29, soit 86 à 89 % selon le seuil de numérations cellulaires retenu.

2.3 Evaluation d'un seuil universel de positivité

La distribution des résultats de densité optique au cours des trois essais réalisés est présentée Figure 1 et synthétisée Tableau 7 en fonction des antigènes employés et des méthodes de purification appliquées.

Tableau 7 : Densités optiques moyennes et médianes en fonction du statut infectieux des animaux et des antigènes employés en ELISA

	Stériles	Autres pathogènes	<i>S. aureus</i>
Effectifs	48	58	47
<i>Antigène 3 Purification 1</i>			
Moyenne +/- Ecart-type	0,74 +/- 0,4	0,869 +/- 0,49	1,36 +/- 0,43
Médiane	0,60	0,79	1,43
<i>Antigène 3 Purification 2</i>			
Moyenne +/- Ecart-type	0,24 +/- 0,2	0,27 +/- 0,19	0,46 +/- 0,27
Médiane	0,20	0,195	0,37
<i>Antigène 4</i>			
Moyenne +/- Ecart-type	0,34 +/- 0,19	0,505 +/- 0,33	0,96 +/- 0,49
Médiane	0,27	0,46	0,90

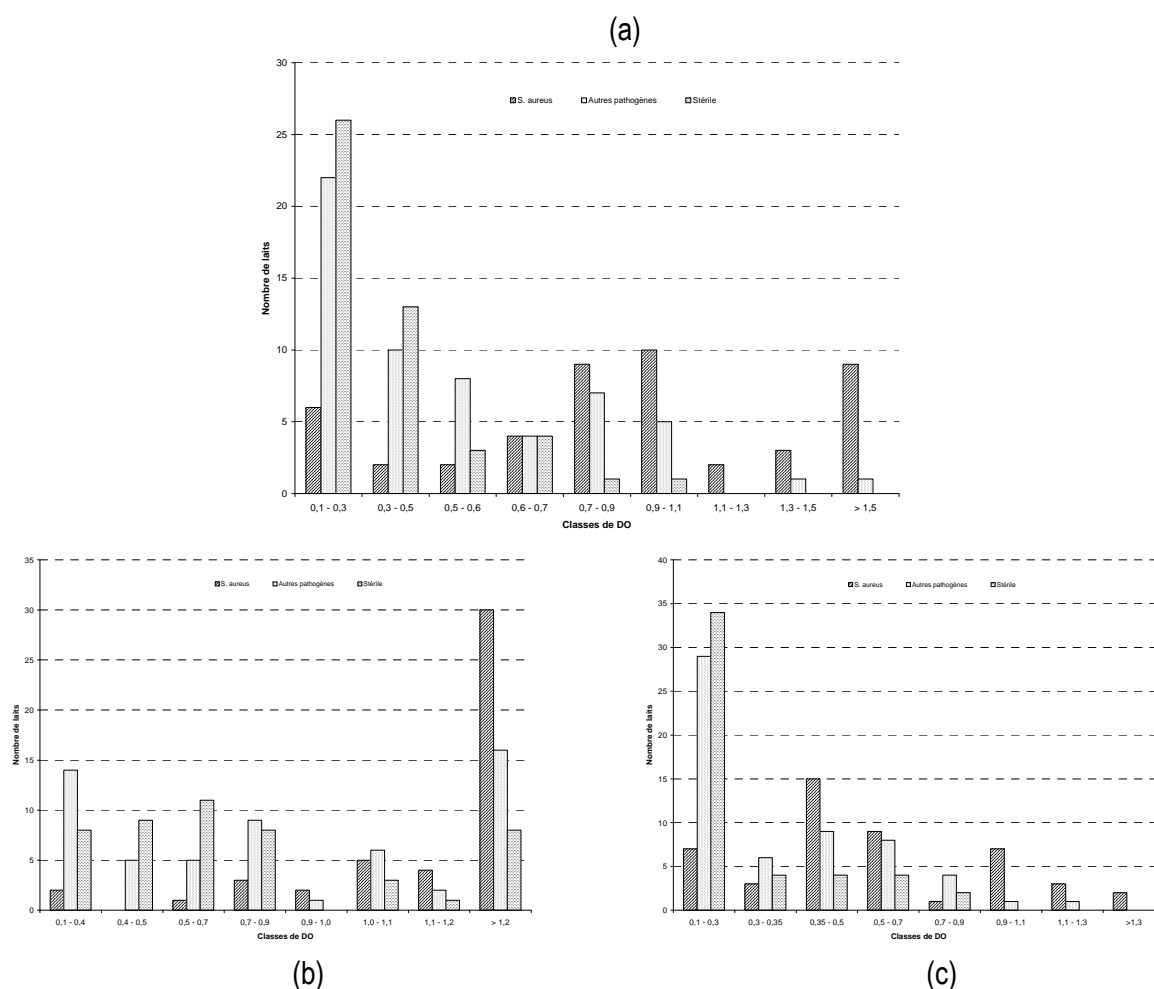


Figure 1 : Distribution des résultats de densité optique selon le statut infectieux des animaux en cas d'utilisation de l'antigène 4 (a) ou de l'antigène 3 (b : protocole de purification 1 ; c : protocole de purification 2)

Les résultats d'évaluation des tests sont rapportés Tableau 8. En adoptant un seuil universel, l'antigène 4 (test sur des laits purs) permet d'obtenir une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité que l'antigène 3 (test sur des laits dilués au dixième), pourtant considéré comme le plus intéressant lors des essais précédents.

Tableau 8 : Efficacité des tests ELISA en fonction des antigènes retenus et des méthodes de purification adoptées : définition de seuils universels

Essai	Statut infectieux	Effectifs	Seuil DO	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN	Efficiace
Antigène 3 Purification 1	<i>S. aureus</i> +	34	1,1	72,34	74,50	56,67	86,02	74,51
	Non <i>S. aureus</i> +	27						
Antigène 3 Purification 2	<i>S. aureus</i> +	37	0,35	78,70	69,00	63,93	91,30	80,39
	Non <i>S. aureus</i> +	33						
Antigène 4	<i>S. aureus</i> +	37	0,6	78,72	77,30	60,66	89,13	77,78
	Non <i>S. aureus</i> +	24						

S. aureus + : chèvre infectée par *S. aureus* ; Non *S. aureus* + : Autres statuts infectieux ; DO : densité optique ; VPP et VPN : valeurs prédictives positive et négative

3 Etude de la variabilité des densités optiques de laits d'animaux prélevés à plusieurs reprises

3.1 Etude descriptive des densités optiques par plaque et date de contrôle

Les résultats de densité optique sont présentés graphiquement par plaque (Figure 2) et par contrôle (Figure 3).

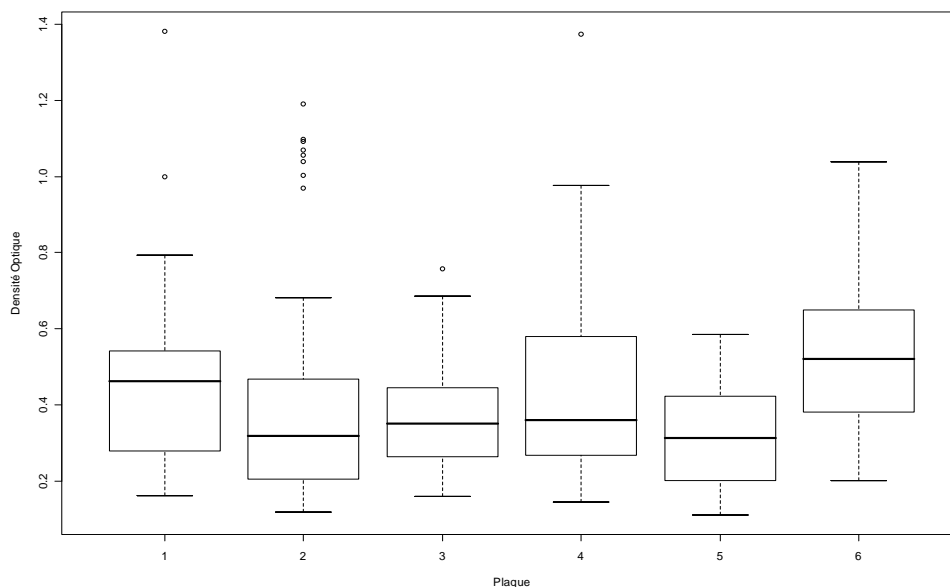


Figure 2 : Box plots (médiane et quartiles) de la densité optique pour chacune des plaques ELISA employée

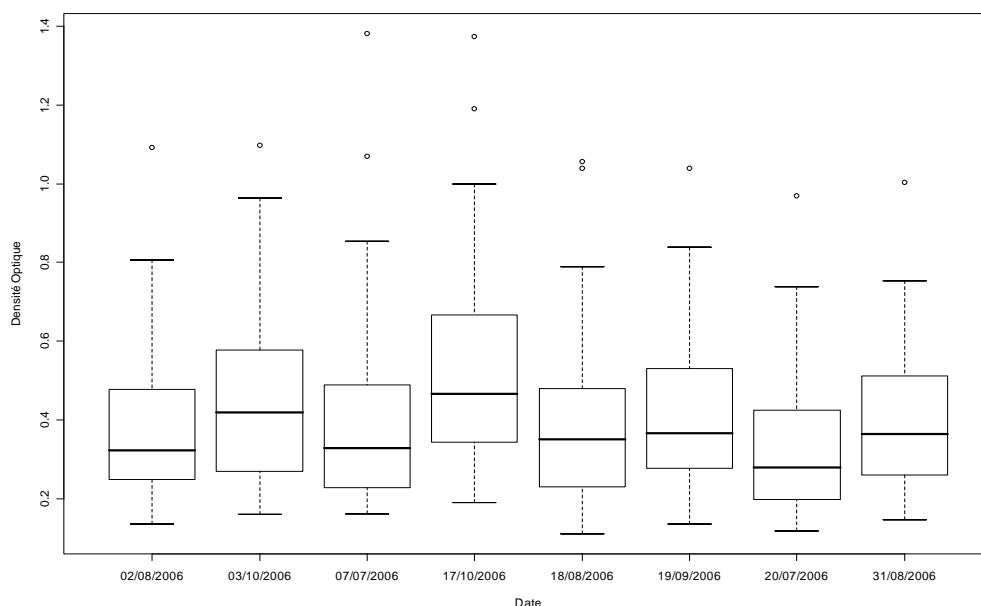


Figure 3 : Box plots (médiane et quartiles) de la densité optique par date de prélèvement

On observe globalement une augmentation des densités optiques au cours du temps.

3.2 Relation entre densités optiques, statut sanitaire et numérations cellulaires

Parmi les chèvres suivies ont été identifiées :

- 18 chèvres infectées par des staphylocoques coagulase négative ;
- 1 chèvre infectée unilatéralement par *S. aureus* ;
- 40 chèvres bactériologiquement saines.

Les résultats de densité optique obtenus par chaque animal sont présentés graphiquement en Annexe 2.2.

Le coefficient de corrélation entre les numérations cellulaires et les densités optiques est de 0,30 (Annexe.2.3).

Les effets « chèvre », « date », et « numérations cellulaires » sont significatifs (respectivement $p < 0.0001$, $p = 0,03$ et $p = 0.0007$). Le statut infectieux n'est pas significatif à 5% mais l'est à 10% ($p = 0,095$). Ainsi, les densités optiques augmentent chez les animaux présentant des numérations cellulaires élevées. Elles augmentent également chez les chèvres infectées par des bactéries autres que *S. aureus* : augmentation concomitante de l'ensemble des taux d'anticorps. Enfin, l'interaction entre numérations cellulaires et statut infectieux n'apparaît pas significative, cependant le tableau des moyennes ajustées montre une augmentation de la DO lorsque le statut infectieux est positif et les numérations cellulaires élevées (larges intervalles de confiance) (Tableau 9).

Tableau 9 : Moyennes ajustées des densités optiques par classe de numérations cellulaires et par statut infectieux

Effet	Estimation	Erreur type	Intervalle de confiance	
			Inférieur	Supérieur
<i>Classes de numérations cellulaires</i>				
- de 0,75 million cell/ml	0,40	0,03	0,34	0,47
de 0,75 à 2 millions cell/ml	0,41	0,03	0,35	0,48
+ de 2 millions cell/ml	0,50	0,04	0,42	0,58
<i>Classes de statut infectieux</i>				
Absence d'infection	0,40	0,03	0,34	0,47
Infections à staphylocoques coagulase négative (SC-)	0,48	0,05	0,38	0,57
<i>Interactions entre numérations cellulaires et statut infectieux</i>				
<0,75 million cell/ml* Absence d'infection	0,37	0,03	0,31	0,44
<0,75 million cell/ml *Infection à SC-	0,43	0,05	0,34	0,52
0,75 – 2 millions cell/ml* Absence d'infection	0,38	0,03	0,31	0,45
0,75 – 2 millions cell/ml * Infection à SC-	0,45	0,05	0,35	0,54
> 2 millions cell/ml * Absence d'infection	0,45	0,04	0,37	0,52
> 2 millions cell/ml * Infection à SC-	0,55	0,06	0,43	0,66

3.3 Analyse des variations intra- et inter- individus

La variabilité de la DO s'explique principalement par la variabilité inter-chèvres (68,5%) et par la variance résiduelle qui correspond ici à l'interaction date*chèvre (plaque) (23%) (Tableau 10). Cette part importante de la résiduelle revient à dire que les chèvres évoluent différemment au cours du temps (DO stable pour certaines, en augmentation pour d'autres, etc.). L'effet date est légèrement significatif mais ne représente que 8% de la variabilité totale.

Ces résultats confirment que la variabilité inter-animal est supérieure à la variabilité intra-animal, bien que celle-ci soit légèrement significative.

Tableau 10 : Estimation de la variance des paramètres

Paramètres	Estimation	Erreur type	Valeur Z	Pr Z	Part relative (en %)
Plaque	0,000	0,002	0,060	0,4776	0,22
Chèvre(plaque)	0,027	0,005	5,780	<,0001	68,51
Date	0,003	0,002	1,780	0,0374	7,88
Résiduelle	0,009	0,001	14,370	<,0001	23,38
Total	0,039				

C. Discussion

Comme chez la vache laitière, les travaux réalisés pour l'évaluation terrain de l'ELISA soulèvent un ensemble de questions concernant notamment les modalités de réalisation des prélèvements aseptiques de lait. Certaines chèvres présentaient en effet des *S. aureus* dans les premiers jets de lait sans que l'on puisse observer de réponse cellulaire notable (donc d'inflammation) associée chez l'animal (moins de 250 000 cellules par ml). Ces chèvres ont été considérées comme négatives en ELISA, résultat confirmé pour l'une d'entre elles par une deuxième analyse bactériologique. Dans ce cas, la possibilité d'une colonisation ponctuelle du trayon peut vraisemblablement être évoquée. La

bibliographie fait état de la nécessité d'une double analyse bactériologique avant détermination du statut infectieux de la mamelle. Cette interrogation sur le test de référence n'est pas sans conséquence sur l'évaluation de l'ELISA.

Parmi les limites du test figure l'impossibilité de détecter les infections très récentes : une quinzaine de jours sont en effet nécessaires pour que l'animal développe des anticorps. Enfin, les taux d'anticorps évoluent au cours du temps et augmentent en particulier en fin de lactation. Une première analyse de la variabilité des densités optiques tend néanmoins à montrer que la variabilité inter-individus prime sur la variabilité intra-individus ce qui permet d'envisager *a priori* un dépistage des animaux excréteurs à tout moment. Cette évaluation n'ayant pu être conduite que sur une période de durée limitée, il conviendrait de l'étendre sur l'ensemble d'une campagne de production afin d'en confirmer les résultats et de mesurer si nécessaire les différences d'efficacité du test au cours du temps.

L'ELISA présente entre autres principaux avantages un coût faible, de donner une réponse rapide (quelques heures), de ne pas nécessiter de prélèvements aseptiques de lait, ni de transport sous couvert du froid. Les différents essais réalisés ouvrent de nombreuses perspectives quant à son utilisation pour le dépistage des chèvres infectées. Le recours à l'antigène 3 donne les meilleurs résultats (84 % de sensibilité, 82,6 % de spécificité) mais nécessite que le seuil de positivité soit défini intra-troupeau sur tout ou partie du cheptel. Le recours à l'antigène 4 semble devoir être privilégié si l'on souhaite disposer d'un seuil unique de positivité pour tous les élevages. Cette dernière solution a le mérite de la simplicité et favoriserait l'automatisation de la technique (lecture et interprétation des résultats de DO) après étalonnage à l'aide de lait(s) de référence (étape indispensable à l'amélioration de la répétabilité et de la reproductibilité de cette technique). Elle donne en revanche des résultats inférieurs tant de sensibilité que de spécificité (77 à 78 %). Une évaluation à plus grande échelle serait nécessaire pour confirmer ces résultats et valider le choix de la préparation antigénique la plus appropriée.

Les résultats obtenus, notamment de spécificité ne permettent pas de définir des stratégies de réforme qui ne doivent être confirmées par des analyses bactériologiques ou assorties de la prise en compte d'autres critères notamment mais non exclusivement sanitaires : antécédents de mammites cliniques, observation d'indurations ou de déséquilibres de la mamelle, niveau de production faible,... Ils sont par contre suffisants pour réaliser un repérage rapide des animaux présumés infectés par *S. aureus* en cas d'observation d'une non conformité des produits ou pour estimer les statuts des animaux à des moments clés de la lactation en vue d'orienter les traitements ou d'envisager les allotements.

Enfin, les limites du test ne doivent pas occulter le fait que la valeur prédictive positive de l'ELISA (61 % lors de l'application d'un seuil universel) est extrêmement supérieure à celle que peut avoir un test fondé sur les numérations cellulaires : sur la foi d'un seul comptage cellulaire, la valeur prédictive positive en cas de dépassement d'un seuil de 1 750 000 cellules par ml est de 14 % environ pour une sensibilité de 71 % et une spécificité de 72 %. Malgré un contexte de faible prévalence des infections à *S. aureus* (cas général dans l'espèce caprine), l'ELISA constitue par conséquent un outil d'aide à la décision tout à fait pertinent.

Les travaux engagés dans le cadre du présent programme ont permis de dégager différentes pistes d'utilisation de l'ELISA sur le terrain. Plusieurs stratégies d'utilisation peuvent être envisagées en fonction des exploitations, des caractéristiques de leur encadrement technique (adhésion ou non au contrôle laitier) et de la nature des informations disponibles (résultats d'autocontrôles, disponibilité des numérations cellulaires,...). Elles demanderaient désormais à être précisées et évaluées à grande échelle afin de permettre le développement du test sur le terrain.

Chapitre 3

Dynamique des écosystèmes microbiens des laits et des fromages

Il n'existe à l'heure actuelle aucune référence concernant les caractéristiques des écosystèmes microbiens du lait de chèvre et le rôle qu'ils pourraient jouer sur le contrôle des contaminations par *S. aureus*. Or, la possibilité de s'appuyer sur les interactions microbiennes pour limiter le développement des staphylocoques impose que les variations des caractéristiques structurelles des écosystèmes microbiens des laits au cours de la lactation ne soient pas de nature à modifier de façon substantielle leur comportement vis-à-vis de *S. aureus*. Qu'il s'agisse d'orienter la production des écosystèmes microbiens des laits (secteur fermier) ou d'utiliser des consortia microbiens dans le cadre de process technologiques (secteur industriel), la connaissance et la prise en compte des évolutions des écosystèmes microbiens au cours du temps sont indispensables. L'objet de ce travail concerne donc l'étude, à titre exploratoire, de la dynamique des écosystèmes microbiens au cours de la lactation.

A. Matériel et méthodes

La dynamique des écosystèmes microbiens des laits, incluant l'étude de l'évolution des inhibiteurs naturels du lait (lactoferrine et système lactopéroxydase) au cours de la lactation, a été étudiée à la Station expérimentale caprine du Pradel pendant deux années consécutives, 2004 et 2005.

Les écosystèmes ont été étudiés à différentes périodes de la lactation correspondant *a priori* à des changements de conduite (notamment alimentaire) du troupeau susceptibles d'avoir une incidence sur la composition des communautés microbiennes et/ou la composition du lait.

Au cours de la première année de suivi, l'étude a porté essentiellement sur l'analyse des écosystèmes des laits dans leur globalité et leur devenir dans les fromages. La seconde année de suivi a davantage été axée sur l'étude de la diversité de la flore du lait de chèvre et son évolution au cours du temps en relation avec la conduite du troupeau.

1 Conduite du troupeau à la station expérimentale du Pradel

Le troupeau comporte environ 120 chèvres laitières de race Alpine dont certaines conduites en lactation longue suite à des échecs de reproduction. Les chèvres ont un niveau laitier supérieur à 1000 kg de lait par chèvre et par an pour un TB de 34g/l et un TP de 32 g/l. Les mises-bas se déroulent habituellement en janvier et février. Le lait est introduit dans le tank 7 jours après mise-bas (à une traite près). A cette période, on observe de fortes variations de taux rendant notamment difficile le réglage des rendements fromagers (période « non stabilisée »).

1.1 Conduite alimentaire

La conduite alimentaire est adaptée en fonction du statut physiologique des animaux (notamment, période péri-partum), de la gestion des prairies et des conditions climatologiques.

L'alimentation est généralement apportée en chèvrerie jusqu'au début mars : apport de foin, de légumineuses, de luzerne déshydratée ainsi que de concentrés (maïs ou granulés).

Lors de la mise à l'herbe, les animaux pâturent dans un premier temps de 8-9 heures le matin jusque vers 16 heures le soir (pour des horaires de traite fixés à 6 h et 16h30). Une complémentation en fourrage est alors fournie à l'auge et adaptée en fonction du niveau de refus (15-20 %). Le plein pâturage est assuré dès lors que les animaux repâturent après la traite du soir, soit entre 18 et 21 heures. La ration de base reste toutefois évolutive et dépend du temps d'accès au pâturage : une

complémentation à l'auge avec des fourrages (foin et/ou luzerne déshydratée) peut en effet être ponctuellement envisagée. Selon la nature des parcelles pâturées, on distingue une période de pâturage sur graminées et une période de pâturage sur légumineuses.

1.2 Saisonnalité de la production : définition de périodes de production

Compte tenu de la saisonnalité de la production chez la chèvre, la notion de « période » est définie à la fois par des critères physiologiques et saisonniers. Dans le cas d'élevages conduits au pâturage tels que la station expérimentale du Pradel, la gestion de l'alimentation ne peut être dissociée de ces différents aspects. Des périodes de production peuvent par conséquent être déterminées en fonction à la fois de la saison et des pratiques d'élevage correspondantes.

Les situations identifiées en 2004 (Tableau 1) incluent :

- trois phases de rationnement en chèvrerie, l'une après la période des mises bas (« chèvrerie stabilisée » : P1), la seconde en période estivale (« chèvrerie été » : P4) et la troisième à l'automne, en partie au moment du tarissement (« chèvrerie automne » ou « tarissement » : P6) ;
- deux phases de pâturage sur graminées, au printemps (« pâturage de printemps » : P2) puis à l'automne (« pâturage d'automne » : P5), le moment de la mise à l'herbe pouvant le cas échéant être traité de manière indépendante ;
- une phase correspondant à l'apport de légumineuses dans la ration (« pâturage légumineuses » : P3), leur introduction s'avérant parfois critique en terme de transformation fromagère (possible accroissement de la fréquence d'incidents).

Le volume de lait produit quotidiennement par le troupeau a dépassé 500 litres au printemps, a été compris entre 300 et 500 litres en été et a diminué progressivement à l'automne en fin de campagne laitière (20 à 300 litres).

En 2005, quatre périodes ont été définies (Tableau 2) et ont été caractérisées comme suit :

- à la période hivernale (P1), le volume de lait produit quotidiennement par le troupeau a dépassé 400 litres de lait. La ration, apportée à l'auge, a comporté de la luzerne déshydratée ;
- au printemps (P2), le niveau de production du troupeau a atteint 400 à 500 litres de lait par jour. La ration a alors été caractérisée par des apports de luzerne déshydratée en complément d'un pâturage sur graminées ;
- en période estivale (P3), on a retrouvé une alimentation proche de celle fournie en P1 (alimentation en chèvrerie). Le volume de lait produit quotidiennement par le troupeau a été compris entre 200 et 400 litres ;
- enfin, la période de production s'est achevée à l'automne (P4) avec une prédominance de graminées apportées par le pâturage.

Tableau 1 : Définition des périodes de production en 2004 en fonction des saisons, du type d'alimentation et du volume de lait de tank produit

Périodes	Saison	Volumes de lait (litres)	Mise à l'herbe	Graminaceae	Légumineuses	Luzerne déshydratée
P1	hiver	150 - > 500	non			X
P2	printemps	> 500	oui	X		X
P3	été	450 - 500	oui		X	
P4	été	300 - 450	non			X
P5	automne	100 - 300	oui	X		X
P6	automne	20 - 100	non			X

Tableau 2 : Définition des périodes de production en 2005 en fonction des saisons, du type d'alimentation et du volume de lait de tank produit

Périodes	Saison	Volumes de lait (litres)	Mise à l'herbe	Graminaceae	Luzerne déshydratée
P1	hiver	>400	non		X
P2	printemps	400-500	oui	X	X
P3	été	200-400	non		X
P4	automne	100-200	oui	Prédominant	

1.3 Enregistrements des données zootechniques

Des enregistrements sur les données d'ordre zootechnique sont réalisés quotidiennement. Elles concernent quatre principaux domaines :

- les animaux :
 - interventions réalisées soit à titre individuel (événements sanitaires et traitements consécutifs), soit à titre collectif (traitements par lots) ;
 - gestion de la reproduction : insémination artificielle, introduction ou sortie des boucs ;
 - période et nombre de mises bas ;
- l'alimentation :
 - apports relatifs à l'auge et/ou au pâturage
- l'installation de traite :
 - intervention du contrôle laitier ;
 - nettoyage (trois modalités) ;
 - intervention sur les tuyauteries ;
- l'ambiance :
 - paramètres climatologiques : pluviométrie, enregistrement des températures ;
 - curage du fumier ;
 - livraison d'aliments.

Certains de ces enregistrements ont été réalisés en continu : le rationnement des animaux ou les modalités de lavage de l'installation de traite. Les autres informations collectées correspondent à des événements ponctuels voire d'apparition exceptionnelle.

1.4 Enregistrements en fromagerie

Les laits de mélange ont systématiquement été mis en fabrication : application d'une technologie lactique. Au cours de la transformation, un relevé des cinétiques d'acidification a été effectué. Les incidents de fabrication et les correctifs apportés (éventuels recours pour l'ensemencement à du lactosérum congelé ou à des ferments de commerce,...) ont été recensés. Les fabrications de type présure réalisées dans le cadre des essais conduits en 2004 ont été suivies selon les mêmes modalités.

2 Prélèvements et échantillonnage

Au cours de la première année de suivi, six types de régimes alimentaires avaient été définis *a priori* (§1.2). Au cours de la campagne laitière et à la suite de la mise en place de chaque type de régime, ont été prélevés pendant trois jours consécutifs, les laits de tank provenant de la traite du matin et les laits

de mélange correspondant aux deux traites du matin et du soir. Simultanément, deux types de fabrications ont été conduits en parallèle selon une technologie présure (type « caillé doux ») et une technologie lactique (Annexes 4.1 et 4.2) : 3 stades de fabrication ont alors été considérés, à 48 heures, 72 heures et 8 jours. Si les fromages lactiques étaient réalisés à partir du lait de mélange de deux traites, les fromages présure, en revanche, étaient fabriqués à partir du lait de la traite du matin uniquement.

Au cours de la seconde année de suivi, les capacités d'analyse ont été redéployées et l'étude a été centrée sur les seuls laits de mélange, de manière à appréhender l'évolution des écosystèmes microbiens non plus à des périodes fixes prédéterminées et définies au travers de la conduite alimentaire mais de façon plus continue tout au long de la campagne laitière. 125 échantillons de 30 ml de lait de mélange (traites du matin et du soir) ont été collectés à cet effet entre février et novembre 2005, à raison de 3 à 5 laits par semaine (identification et jour de prélèvement précisés en annexe 3.1). Les laits 45 à 86 ont été collectés en période hivernale (P1), les laits 87 à 163 en période P2, les laits 164 à 269 en période P3 et les laits 270 à 330 en fin de campagne laitière (P4). Seule une partie des échantillons a fait l'objet d'analyses complémentaires en vue du dosage des molécules à activité antimicrobienne (protocole d'échantillonnage conduit selon des modalités identiques à celles de l'année 2004).

Les prélèvements de laits (années 2004 et 2005) et de fromages (année 2004) ont été systématiquement stockés et congelés à -20°C dans l'attente de leur analyse.

3 Analyse microbiologique des laits

Les laits analysés ont d'abord été décongelés au bain-marie à 25°C . Les flores microbiennes ont ensuite été dénombrées sur différents milieux (Annexe 3.2) parmi lesquels les milieux M17 (selon la température d'incubation : flore totale thermophile ou mésophile), Turner (Lactocoques), MSE (bactéries lactiques dont *Leuconostocs* producteurs de dextrans), SB (bactéries lactiques dont *Enterococcus*), FH (lactobacilles mésophiles), OGA (Levures-moisissures), CFC (Gram- dont *Pseudomonas*), VRBG (Coliformes), RPF (Staphylocoques coagulase positive).

4 Collection d'isolats

La collection d'isolats a été constituée à partir des laits collectés au cours de la campagne de lactation 2005. Les colonies poussant sur les différents milieux de dénombrement ont été collectées à partir des boîtes de dénombrement de deux laits (49 et 151), sélectionnés pour leurs niveaux de flores et leur diversité microbiologique (Tableau 3). Deux cent quatre-vingt un isolats ont ainsi été collectés, purifiés et conservés à -20°C dans un mélange 50/50 (v/v) de bouillon BHI et de lait glycérolé à 10%.

Tableau 3 : Caractéristiques des laits 49 et 151 après dénombrements sur différents milieux de culture

Laits	Lait 151			Lait 49						
	CRBM	PCA + CV	M17 30°C	M17 42°C	Turner 30°C	SB	MSE	FH	RPF	CFC
Dénombrement (en log)	3,71	3,33	4,21	3,74	6,41	3,9	3,77	2,46	2,9	2,92
Nombre d'isolats										
Total : 281	40	18	67	10	8	11	54	19	42	12

Les levures ont été collectées sur milieu OGA à partir des boîtes de dénombrement de 6 laits : 72 et 81, 168, 181 et 209, 280. Quarante six isolats ont été repiqués, purifiés et conservés à -20°C dans un mélange 50/50 (v/v) de bouillon Yeast Peptone Glucose (YPG) et de lait glycérolé à 10% (Tableau 4).

Tableau 4 : Dénombrements sur milieu OGA des laits 72, 81, 168, 181 et 209, 280 et nombre d'isolats conservés.

Laits	Lait 72	Lait 81	Lait 168	Lait 181	Lait 209	Lait 280
Dénombrement (en log)	1,78	1,70	2,04	1,30	2,81	3,33
Nombre d'isolats						
Total 46	6	5	7	10	5	13

5 Description des communautés microbiennes

La diversité de la flore des laits a été étudiée au travers de deux approches complémentaires :

- une approche indirecte avec identification moléculaire d'isolats collectés sur différents milieux de dénombrement du lait ;
- une approche moléculaire directe par clonage et identification des ADNr 16S du lait.

L'ensemble des méthodes de laboratoire mises en œuvre sont décrites en Annexe 3.

5.1 Identification d'isolats (Annexe 3.3)

a) Bactéries

L'identification des isolats d'origine bactérienne a nécessité d'avoir recours à une méthode de génétique moléculaire, la Polymerase Chain Reaction (PCR). Après extraction de l'ADN total, les 450 paires de bases de l'extrémité 5' de l'ADNr 16S ont été amplifiées avec les amorces universelles W02 et W18. Les produits d'amplification ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% en tampon TBE 0,5X et BET (Bromure d'éthidium).

Tous les ADNr 16S ont été analysés par la méthode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) à l'aide de deux enzymes de restriction EcoR1 et HaeIII. A la suite de la migration des produits de digestion sur gel d'agarose à 2 %, les profils RFLP générés ont été analysés en recourant au logiciel BioNumerics et comparés entre eux. Des groupes de profils à 90% de similarité et plus ont été constitués, les ADNr 16S d'un ou plusieurs représentants de chaque groupe étant alors séquencés. Les différents profils obtenus ont été comparés aux profils d'une banque de référence RFLP constituée de souches de référence et de souches isolées de divers projets et appartenant aux principales espèces identifiées dans des laits et fromages.

Les ADN des isolats Gram positif et catalase négatif ont été amplifiés avec des amorces spécifiques de genre (*Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus*) et d'espèce (*Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis lactis/cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei/paracasei* et *Lactococcus garvieae*). Les PCR spécifiques ont été réalisées selon les protocoles décrits par Callon *et al.*, 2004.

L'ADNr 16S a été séquencé, les 450 paires de base de l'extrémité 5' étant comparées aux séquences correspondantes disponibles dans la banque de données GeneBank. Les séquences ayant un pourcentage de similarité supérieur à 97% ont été considérées comme appartenant à la même espèce.

b) Levures

Les levures ont été identifiées par l'analyse de tests morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les isolats ont été assignés à une espèce grâce à l'utilisation des clés dichotomiques de Barnett *et al.*, 1990. Leur identification moléculaire a reposé sur l'amplification du domaine D1/D2 de l'ADNr 26S de

chaque isolat en utilisant les amorces NL1-NL4. Les produits d'amplification ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% en tampon TBE 0,5X et BET (Bromure d'ethidium). Les ADNr 26S obtenus ont été séquencés, chaque séquence partielle étant ensuite comparée par un système d'algorithme (blasts : « basic local alignment search tool ») avec celles déposées dans la banque de données GenBank.

5.2 Identification des clones

Des banques de clones d'ADNr 16S ont été réalisées à partir de différents échantillons de lait (lait de tank 116, 188, 95, 103 et 90 et 151). Après extraction de l'ADN total du lait, une PCR 16S a été réalisée selon les mêmes procédures que précédemment (recours aux amorces WO2 et W18). Les produits d'amplification ont été insérés dans le vecteur PCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen). Après transformation de cellules One Shot®, 340 clones ont été sélectionnés.

Deux PCR 16S ont été effectuées sur les inserts clonés, la première avec les amorces M13F et M13R, la seconde avec les amorces WO2 et W18 en vue de l'analyse des séquences 16S par RFLP. Le tri des clones par RFLP a été effectué comme décrit pour les isolats.

Le séquençage des ADNr 16S de 86 clones a été réalisé, les séquences obtenues étant ensuite comparées à celles disponibles dans les bases de données.

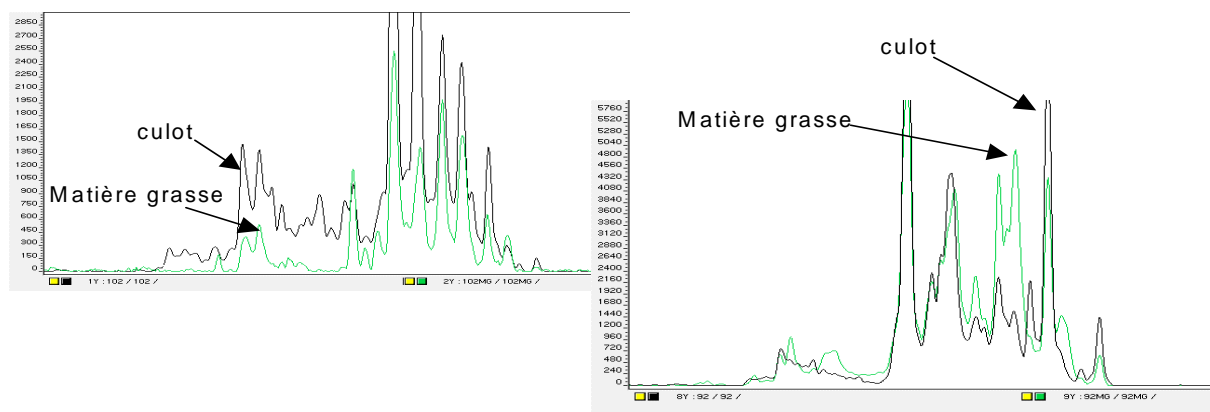
6 Description des équilibres microbiens (Annexe 3.4)

Les équilibres entre les populations microbiennes ont été décrits par une approche moléculaire culture indépendante, la méthode SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

La première étape de l'analyse est constituée par l'extraction de l'ADN microbien. Dans ce domaine, la méthode de référence (Duthoit *et al*, 2003, Callon *et al*, 2005) initialement adoptée n'ayant pas permis d'extraire systématiquement l'ADN microbien des laits collectés en 2004 et les profils de SSCP obtenus étant de faible amplitude, plusieurs autres méthodes d'extraction ont dû être testées. Les modifications de la méthode par i) traitement des laits à la protéinase K à 55°C pendant 2h, ii) l'élimination des cellules somatiques par centrifugation à 200g 5 minutes, iii) la transpatisation des laits avant extraction, iv) l'utilisation d'un plus grand volume de lait, n'ont pas amélioré l'extraction et n'ont pas permis d'obtenir des profils SSCP d'amplitude suffisante. Pour résoudre ces problèmes d'extraction, la méthode de Lafargue *et al*. (2004) a été également testée. Les conditions suivantes ont été appliquées et évaluées :

- décongélation des laits à 25°C ;
- traitement de 10ml de lait avec 150 µl de pronase à 10mg/ml et incubation à 37°C pendant 2h30 puis poursuite de l'incubation 1h à 37°C après adjonction d'1 ml de SDS 20 % ;
- centrifugation à froid (4°C) de la suspension (20 min à 8500 G) ;
- élimination de la matière grasse figée ;
- incubation (10 min à 30°C) puis centrifugation (10 min à 8500 G), à température ambiante ;
- reprise du culot contenant les micro-organismes dans 150 µl de thiocyanate de guanidium 4M-Tris-Cl pH 7,5 0,1M, N-Lauroyl sarcosine 1 % ;
- adjonction de 200 µl d'une solution d'acétate de sodium - EDTA, de 200 µl de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1) pH 8.0 et de 200 mg de billes de zirconium ;
- traitement du culot par broyage aux billes de zirconium ;
- extraction des acides nucléiques au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1) et au chloroforme-alcool isoamylique (24/1) avant précipitation par addition de 50 µl d'acétate de sodium 3M et d'1 ml d'éthanol ;
- après centrifugation (20 min, 13 000 G), lavage à l'éthanol 70 % ;
- reprise de l'ADN dans 40 µl d'eau.

Cette méthode s'est avérée probante et a, dès lors, été retenue pour extraire les acides nucléiques microbiens des laits de 2005. Il a cependant été noté qu'une partie des populations microbiennes est éliminée dans la partie grasse. La nature des populations dans la matière grasse s'est néanmoins avérée la même que celle observée à partir des laits dans lesquels la matière grasse avait été éliminée (Figure 1).



➔ Pas de différence qualitative de répartition

Figure 1 : Répartition des micro-organismes : culot / matière grasse / Extraction d'ADN à partir du culot et en parallèle à partir de la matière grasse

La méthode SSCP repose ensuite sur l'amplification des régions variables :

- de l'ARN 16S des bactéries (région V3 amplifiée avec les amorces W34 et W49 (Duthoit *et al.*, 2003) : analyse des ADN totaux de 118 laits ;
- et de l'ARN18S de levures (région V4 amplifiée avec les amorces Lev1 et Lev2 (Callon *et al.*, 2006) : analyse des ADN totaux de 49 laits.

Après dénaturation à 95 ou 96°C, les produits d'amplification sont séparés au cours d'une électrophorèse capillaire. Des profils microbiens sont ainsi obtenus. L'analyse des produits d'amplification a été conduite sur séquenceur ABIPRISM 310 selon le protocole décrit par Duthoit *et al.* (2003).

Les régions V3 des ADNr 16S clonés et des ADNr 16S des isolats, la région V4 des ADNr des isolats ont été amplifiées selon des protocoles similaires à ceux employés pour la réalisation des profils SSCP. Leurs migrations ont été respectivement comparées aux profils SSCP V3 et V4 des laits. Les pics des profils SSCP V3 des laits ont ainsi pu être assignés à des séquences de bactéries et les pics des profils SSCP V4 des laits à des séquences de levures (Figure 2).

La méthode SSCP permet une approche globale des flores dominantes des écosystèmes microbiens. Il s'agit d'une méthode semi-quantitative qu'il convient d'interpréter en terme d'équilibre entre populations. La proportion relative de chaque pic est, dans ce cas, calculée par rapport à l'ensemble des pics d'un même profil.

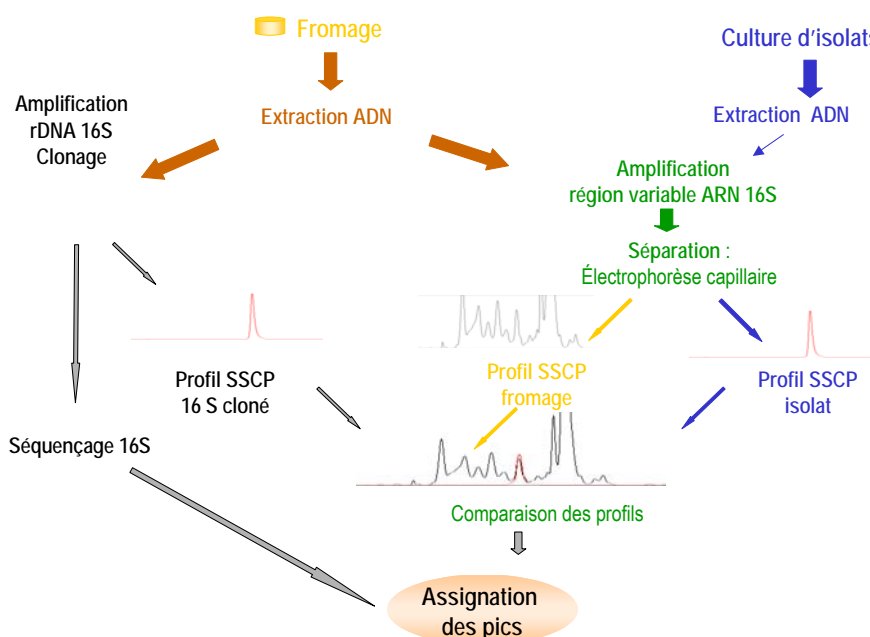


Figure 2 : Schéma descriptif des techniques employées pour décrire les écosystèmes microbiens dans leur globalité

7 Evolution des molécules à activité antimicrobienne au cours de la lactation

7.1 Système lactoperoxydase

Le système lactoperoxydase est un système à trois composantes : la lactoperoxydase, le thiocyanate et l' H_2O_2 . L'action de ce système est non spécifique. Seuls ont été dosés, au cours de ce programme, la lactoperoxydase et le thiocyanate par méthode enzymatique (Kumar et Bhatia, 1999) et chimique (IDF, 1988), respectivement. Durant l'année 2004, les dosages ont été effectués sur les laits du matin et les laits de mélange. Pour l'année 2005, seuls les laits de mélange ont été analysés, les laits du matin et de mélange analysés durant l'année 2004 ayant présenté des teneurs identiques en composés antimicrobiens.

7.2 Lactoferrine

Le dosage de la lactoferrine a d'abord été effectué par méthode immunochimique (méthode ELISA) à l'aide d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, selon une méthode préalablement mise au point à l'INRA de Poligny pour la lactoferrine bovine (Dupont *et al*, 2006), ce que rendait *a priori* possible l'existence d'une forte homologie de séquence (97%) entre la lactoferrine bovine et la lactoferrine caprine.

Quatre laits collectés à deux périodes différentes sur le plan alimentaire (« Chèvrerie stabilisée » et « Pâturage sur légumineuses »), ont été analysés. Les résultats obtenus sont présentés tableau 3.

Tableau 3: Résultats des dosages de lactoferrine dans le lait en fonction du type de lait collecté (traite du matin seule ou mélange des traites du matin et du soir) et de la conduite alimentaire

	Lactoferrine (matin) en mg/L	Lactoferrine (mélange) en mg/L
Chèvrerie stabilisée	12	15
Légumineuses	22	23

Des différences ont été observées entre les deux périodes. Toutefois les valeurs obtenues ont semblé globalement faibles. Elles étaient en effet, en moyenne, 10 fois plus faibles que celles observées dans le lait de vache. Les quelques travaux disponibles en matière de lactoferrine caprine faisaient également état de teneurs sensiblement plus élevées. Ainsi, Chen et Mao (2004) ont trouvé en moyenne 200 mg/l de lactoferrine (de 166 à 217 mg/l), tandis que Avci et Sel (2004) ont rapporté des valeurs allant de 39 à 64 mg/l. Dans ce contexte, une modification du format du test ELISA a été réalisée. D'autres problèmes sont survenus et n'ont pas permis l'obtention de résultats fiables. Parmi les problèmes recensés figure la nécessité de recourir à de la lactoferrine bovine pour réaliser la courbe de calibration, la lactoferrine caprine n'étant pas disponible dans le commerce. C'est pourquoi il a été finalement envisagé de purifier de la lactoferrine caprine et de l'utiliser pour calibrer le test ELISA.

De la lactoferrine caprine a été purifiée à partir de lait de chèvre par méthode d'immuno-affinité. Cette lactoferrine caprine purifiée a servi à constituer une gamme étalon pour calibrer le test ELISA. De cette manière, les quatre laits précédents ont été de nouveau analysés (Tableau 4).

Tableau 4 : Résultats des dosages de lactoferrine dans quatre laits obtenus avec une gamme étalon de lactoferrine caprine

	Lactoferrine (matin) en mg/l	Lactoferrine (mélange) en mg/l
Chèvrerie stabilisée	117	138
Légumineuses	247	226

Les valeurs obtenues ont été environ 10 fois supérieures à celles obtenues avec la gamme étalon de lactoferrine bovine et sont en accord avec celles trouvées par Chen et Mao (2004).

Les caractéristiques analytiques de la méthode ont été déterminées. Ainsi, la limite de détection est de 0,2 mg/L et la répétabilité de 12% (intra plaque) à 17% (inter plaques).

Suite à cette mise au point méthodologique, le dosage de la lactoferrine a été étendu aux autres laits collectés au cours de l'année 2004 et à ceux prélevés en 2005.

8 Traitement des données

Compte tenu des phases de mise au point méthodologique concernant la définition de profils d'écosystèmes microbiens par SSCP, les données SSCP relatives à l'année 2004 ont été *in fine* exclues des analyses.

8.1 Variabilité des caractéristiques des flores microbiennes des laits et des fromages

La variabilité des flores des laits et des fromages selon respectivement, le type de lait mis en fabrication et le type de technologie employée, a été étudiée à partir des données issues de la première année de suivi (2004).

Ont d'abord été abordées les données relatives à la flore des laits (comparaison des laits de la traite du matin et des laits de mélange), puis les données relatives aux fromages (prise en compte du type de technologie fromagère et du stade d'affinage) et enfin celles obtenues sur les lactosérums. La période de production a été prise en compte.

La même procédure a été adoptée pour chacun de ces domaines :

- description des données (statistiques élémentaires, corrélation et histogramme des variables) ;
- analyse discriminante permettant de trouver des combinaisons linéaires des variables qui permettent de séparer aux mieux les classes ou catégories (période de production, type de lait

et type de fromage). La recherche de combinaisons a été basée sur la maximisation de la variance inter classe et la minimisation de la variance intra classe.

8.2 Influence des facteurs zootechniques sur les flores microbiennes

Dix volets zootechniques ont été identifiés. Deux concernent des évènements enregistrés de manière continue (alimentation et lavage de l'installation de traite). Huit volets concernent des évènements de nature plus exceptionnelle (mises-bas, traitements individuels ou collectifs, contrôle laitier, intervention sur les tuyauteries, climatologie, curage du fumier, livraison des aliments et en fromagerie). (§ 1.3)

Si les données zootechniques ont été enregistrées quotidiennement (§1.3), les données microbiologiques, bien que fréquentes, ont en revanche été obtenues avec un pas de temps variable. Réalisées sur des échantillons répartis de manière aléatoire au cours de la lactation, elles n'ont en particulier pas été effectuées sur des échantillons préalablement ciblés en fonction de la survenue d'évènements zootechniques particuliers.

Les analyses statistiques ont été effectuées sur les milieux de dénombrement pris séparément. Dans un premier temps, elles ont été conduites par volet zootechnique. Pour les volets zootechniques renseignés en continu, on s'est intéressé aux modalités enregistrées au cours des jours précédents la réalisation d'analyses microbiologiques. Pour les autres volets, ont été prises en compte toutes les données de dénombrements obtenues dans les jours précédents et suivants chacun des évènements zootechniques. Cette dernière analyse s'est finalement révélée non réalisable, le nombre d'évènements pour un volet donné étant restreint, les analyses microbiologiques n'étant pas systématiquement effectuées dans l'intervalle de temps correspondant ou étant acquises à des pas de temps variables par rapport à l'évènement analysé.

En définitive, seuls ont donc été analysés les volets zootechniques renseignés en continu.

Les variables explicatives sont les données zootechniques acquises au cours des 5 jours précédents les analyses microbiologiques (de t-1 à t-5). La variable expliquée (y_i) est le dénombrement (après transformation logarithmique - log10-) d'un milieu donné à l'instant t (en jour).

Chaque variable de t-1 à t-5 a été étudiée en univarié :

$$y_{i,t} = \mu + x_i^{t-j} + \varepsilon_{i,t}$$

avec $y_{i,t}$: le dénombrement à t sur un milieu donné pour le niveau i du facteur étudié,

μ la moyenne générale,

x_i^{t-j} effet de la valeur i du facteur zootechnique à t-j (soit à t-1, t-2, t-3, t-4, t-5),

$\varepsilon_{i,t}$ l'erreur résiduelle.

Ces analyses ont permis d'étudier le délai au cours duquel un facteur zootechnique peut avoir une incidence sur la flore microbienne.

Un modèle multivarié progressif a alors été posé pour les milieux pour lesquels le facteur zootechnique étudié est apparu comme significatif à t-j. Dans ce modèle, les variables explicatives de x_i^{t-5} à x_i^{t-1} ont été introduites de manière chronologique (Somme des carrés de type I) : test de x_{t-5} , puis de x_{t-4} ajusté de x_{t-5} , de x_{t-3} ajusté de x_{t-5} et de x_{t-4} , ... On peut ainsi tester le facteur x_i^{t-j} à x_i^{t-j-1} fixé et évaluer la

part de variabilité expliquée par x_i^{t-j} connaissant l'incidence relative de x_i^{t-j-1} . Dès qu'un facteur apparaît non significatif, l'analyse progressive est interrompue.

Dans le volet « alimentation », quatre classes ont été définies :

- Classe 1 : alimentation en chèvrerie des mises bas jusqu'à la mise à l'herbe ;
- Classe 2 : pâturage sur graminées ;
- Classe 3 : pâturage sur légumineuses ;
- Classe 4 : alimentation en chèvrerie en période estivale.

La phase de rationnement en chèvrerie de fin de lactation, à l'automne, n'a pu être prise en compte dans les analyses, une seule observation ayant été réalisée à cette période. L'analyse a porté sur 123 jours de suivi.

Dans le volet « lavage de l'installation de traite », deux classes ont été définies :

- Classe 1 : Emploi d'une lessive acide le soir ;
- Classe 2 : Rinçage seul le soir.

Une troisième modalité correspondant au lavage à l'aide d'une lessive basique n'a pas été considérée faute de pouvoir mettre en relation des données de dénombrement en nombre suffisant (quatre observations). L'analyse a porté sur 115 jours.

8.3 Etude de la dynamique des écosystèmes microbiens au cours du temps

Pour chaque profil SSCP, les aires A_i des différents pics P_i ont été relevées, et les ratios $R_i=A_i/\Sigma A_i$ ont été calculés.

Des Analyses Factorielles Discriminantes (AFD) ont été réalisées avec le logiciel Statistica (Statsoft, version 6) avec les 4 périodes comme variables de classification, les résultats de dénombrements ou les ratios des pics 16S V3 SSCP et des pics 18S V4 SSCP comme variables et les laits comme observations. Les laits mal classés ont été enlevés pour la suite des analyses statistiques.

Les données de dénombrement (Log UFC/ml) et les ratios des pics SSCP bactéries et levures permettent de définir un profil d'écosystème global pour chaque lait analysé. Une analyse de variance multivariée (MANOVA) a été réalisée sur ces données en s'appuyant sur quatre tests statistiques multivariés (test lambda de Wilks, trace de Pillai, tests du maximum de vraisemblance de Hotelling-Lawley et test de Roy). Cette première analyse a été suivie d'une analyse de variance (ANOVA) sur les données de dénombrements obtenues sur chaque milieu de culture ou sur les ratios des pics des différents profils SSCP afin de décrire plus précisément ceux qui ont été le mieux discriminés par la période. Le test de Tukey a été réalisé pour comparer les moyennes (différences à $P < 0.05$).

B. Résultats

1 Description des écosystèmes des laits de chèvre

1.1 Caractéristiques bactériennes des laits de chèvre

1.1.1 Sélectivité des milieux de culture

Les caractéristiques microbiennes des laits ont été évaluées par des dénombrements sur différents milieux de culture. L'identification d'isolats sur divers milieux a permis de mettre en évidence leur sélectivité (Tableau 5).

Tableau 5. Fréquence (en %) de chaque espèce bactérienne identifiée sur les différents milieux de culture.

Milieux	Nb*						
CRBM	40	<i>Kocuria sp</i>	30%	<i>Enterococcus faecalis</i>	30%	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13%
		<i>Corynebacterium variabilis</i>	5%	<i>Salinicoccus sp</i>	5%	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>	5%
		<i>Corynebacterium stationis</i>	3%	<i>Brevibacterium stationis</i>	3%	<i>Brachy bacterium</i>	3%
		<i>Arthrobacter sp</i>	3%			<i>paraconglomerans</i>	
PCAI	18	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	56%	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	17%	<i>Delftia acidovorans</i>	11%
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11%	<i>Pantoea agglomerans</i>	5%		
M17 30°C	67	<i>Acinetobacter baumannii</i>	35%	<i>Kocuria sp</i>	13%	<i>Microbacterium oxydans</i>	7%
		<i>Enterococcus faecalis</i>	7%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7%	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	6%
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6%	<i>Micrococcus luteus</i>	3%	<i>Citrobacter freundii</i>	3%
		<i>Pseudomonas putida</i>	3%	<i>Brachy bacterium</i>	2%	<i>Exiguobacterium</i>	2%
		<i>Lactococcus garvieae</i>	2%	<i>paraconglomerans</i>			
M17 42°C	10	<i>Enterococcus faecalis</i>	80%	<i>Streptococcus mitis</i>	10%	<i>Pantoea agglomerans</i>	10%
TA	8	<i>Enterococcus faecalis</i>	50%	<i>Lactococcus lactis</i>	50%		
SB	11	<i>Enterococcus faecalis</i>	100 %				
FH	19	<i>Lactobacillus casei</i>	100 %				
MSE	54	<i>Enterococcus faecalis</i>	95%	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5%		
CFC	12	<i>Pseudomonas putida</i>	92%	<i>Leuconostoc. mesenteroides</i>	8%		
RPF	42	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	53%	<i>Microbacterium oxydans</i>	16%	<i>Exiguobacterium</i>	14%
		<i>Staphylococcus simulans</i>	8%	<i>Staphylococcus caprae</i>	3%	<i>Brevibacterium stationis</i>	3%
		<i>Enterococcus faecalis</i>	3%				

* Total d'isolats par milieu

La communauté microbienne du milieu CRBM est composée essentiellement d'espèces Gram positif catalase positif (*Staphylococcus*, *Kocuria*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Salinicoccus*, *Jeotgalicoccus*, *Brevibacterium* and *Brachy bacterium*), bien que 30% d'*Enterococcus* aient également été identifiés. Les isolats sur milieu PCAI appartiennent tous à des genres Gram négatif tels que *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Pseudomonas* and *Pantoea*.

Les bactéries isolées du milieu M17 à 30°C appartiennent à divers genres Gram positif comme *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Brachy bacterium*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* et Gram négatif comme *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* and *Citrobacter*.

Le même milieu à 42°C est plus sélectif avec une dominance d'*Enterococcus*, 20% de *Streptococcus mitis* et bactéries Gram négatif (*Pantoea agglomerans*). Le milieu TA sélectionne des entérocoques et des lactocoques. La majorité des bactéries isolées du milieu MSE de ces laits appartiennent à l'espèce *E. faecalis*, avec seulement 5% de *Leuconostoc mesenteroides*.

La communauté bactérienne sur le milieu RPF est essentiellement composée des genres *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Exiguobacterium*, *Brevibacterium* et sporadiquement d'*Enterococcus*. Les deux milieux FH et SB sont respectivement sélectifs des lactobacilles mésophiles et des entérocoques alors que le milieu CFC est sélectif des *Pseudomonas*.

1.1.2 Diversité bactérienne des laits de chèvre

Les résultats d'identification des 281 isolats et 340 clones, après criblage par analyse RFLP et séquençage de l'ADN 16S de quelques représentants de chaque groupe RFLP sont détaillés en Annexes 3.6 et 3.7.

Quarante deux espèces différentes ont été identifiées à partir de 6 laits de tank du troupeau de la Station du Pradel prélevés à différentes périodes de l'année. Parmi les bactéries Gram positif non lactiques, des séquences assignées à *Staphylococcus epidermidis* (10% des isolats et 2% des unités

taxonomiques opérationnelles (OTUs) regroupant les types bactériens ayant des profils de restriction identiques), *Kocuria rhizophila*- *Kocuria kristinae*- *Kocuria carniphila* (8% des isolats et 1% des OTUs), *Bacillus thuringiensis-cereus*, *Staphylococcus caprae*, *Micrococcus luteus* and *Brevibacterium stationis* ont été identifiées à la fois parmi les clones et les isolats. Neuf espèces – *Microbacterium oxydans* et *Exiguobacterium* (4% et 2% des isolats), *Staphylococcus simulans* (1,5%), et *Corynebacterium variabilis*, *Corynebacterium stationis*, *Brachybacterium paracoconglomerans*, *Arthrobacter*, *Salinicoccus*, *Jeotgalicoccus psychrophilus* (moins d'1%) - ont seulement été identifiées parmi les isolats. Huit séquences assignées à *Staphylococcus equorum*, *Macrococcus caseolyticus*, *Micrococccineae bacterium*, *Ornithinococcus*, *Dietzia maris*, *Rothia sp*, *Clostridium* and *Firmicutes sp* (moins d'1%) ont seulement été identifiées parmi les clones.

Le nombre d'espèces de bactéries lactiques identifiées a été plus important parmi les isolats que parmi les clones. Les séquences assignées à *Enterococcus faecalis* (33% des isolats et 16% des OTUs) ont été les plus couramment identifiées parmi les isolats et les clones, alors que les séquences assignées à *Lactococcus lactis* (1,5% des isolats et 14% des OTUs) ont été plus importantes parmi les clones. Les quatre espèces assignées à *Lactobacillus casei* (7%), *Leuconostoc mesenteroides* (1,5%), *Lactococcus garvieae* et *Streptococcus mitis* (moins d'1%) ont seulement été identifiées parmi les isolats. A l'inverse, la séquence assignée à *Enterococcus saccharominimus* (moins d'1%) a seulement été identifiée parmi les clones.

Parmi les bactéries Gram négatif, les séquences assignées à *Pantoea agglomerans* (1% des isolats et 40% des clones), *Pseudomonas putida* (6% des isolats et 15% des clones), *Acinetobacter baumannii* (9% des isolats et 3% des clones), *Citrobacter freundii* et *Pseudomonas aeruginosa* (moins d'1%) ont été trouvées parmi les isolats et les clones. Les trois espèces identifiées comme *Stenotrophomonas maltophilia* (6%), *Chryseobacterium indologenes* (3%) et *Delftia acidovorans* (moins d'1%) ont seulement été rencontrées parmi les isolats. Les séquences assignées à *Enterobacter absuria* et *Enterobacter sp*, *Hahella chejuensis*, *Klebsiella oxytoca-milletis* et *Pseudomonas fulgida* (moins d'1%) ont été identifiées parmi les clones.

1.2 Diversité des levures des laits de chèvre

La population des levures du lait de chèvre a été caractérisée par l'identification phénotypique et génotypique de 46 isolats collectés à partir de 6 laits différents. Les résultats des deux identifications sont présentés de manière détaillée en Annexe 3.8. Six principales espèces ont été distinguées : *Rhodotorula glutinis* (22%), *Trichosporon beigeli* (15%), *Debaryomyces hansenii* (15%), *Cryptococcus ater*, *Cryptococcus curvatus* (9%) and *Rhodotorula minuta* (9%). Les autres espèces minoritairement identifiées (moins de 5% des isolats) étaient *Kluyveromyces lactis*, *Candida inconspicua*, *Candida intermedia* et *Candida pararugosa*.

1.3 Teneurs en molécules à activité microbienne dans les laits de chèvre

1.3.1 Système lactopéroxydase

D'une manière générale, le lait de chèvre contient moins de lactopéroxydase (LP) que le lait de vache (3 à 4 fois moins).

Année 2004

En moyenne, les teneurs en LP ont été identiques dans les laits du matin et les laits de mélange (absence de d'information concernant la période de tarissement) : 7,8 mg/L. La quantité de LP la plus

élevée a été observée pendant les périodes « Pâturage de printemps » et « Pâturage sur légumineuses », et, la plus faible pendant la période « Chèvrerie été » (Tableau 6).

Les teneurs en thiocyanate dans les laits du matin et ceux de mélange ont été similaires (absence de d'information concernant la période de tarissement), 6,7 et 6,5 mg/l, respectivement. La quantité de thiocyanate la plus élevée a été observée pendant les périodes « Chèvrerie stabilisée » et « Mise à l'herbe ». Pendant les périodes qui ont suivi la mise à l'herbe, c'est-à-dire depuis la période « Pâturage de printemps » jusqu'au tarissement, les teneurs en thiocyanate ont été deux à trois plus faibles.

Tableau 6 : Résultats des dosages de lactopéroxydase (LP) et de thiocyanate dans les laits (moyenne des 3 prélèvements par période) – Année 2004

	Lactopéroxydase en mg/l		Thiocyanate en mg/l	
	Lait du matin	Lait de mélange	Lait du matin	Lait de mélange
Chèvrerie stabilisée (55-57)**	7,9 ± 0,3	7,9 ± 0,6	10,5 ± 0,5	10,1 ± 0,5
Mise à l'herbe (71-75)**	6,7 ± 1,0	6,7 ± 0,7	9,5 ± 0,5	8,6 ± 0,5
Pâturage de printemps (90-92)**	9,0 ± 0,5	8,5 ± 0,4	5,6 ± 0,4	5,5 ± 0,3
Pâturage sur légumineuses (173-175)**	9,6 ± 0,6	9,9 ± 0,6	4,9 ± 0,9	4,8 ± 1,4
Chèvrerie été (194-196)**	5,7 ± 0,9	6,4* ± 1,3	3,4 ± 0,2	3,3* ± 0,5
Pâturage d'automne (250-252)**	7,8 ± 0,3	7,1 ± 0,5	6,2 ± 0,1	5,5 ± 0,1
Tarissement (308-310)**	ND	5,1 ± 0,8	ND	4,9 ± 0,3

LP : lactopéroxydase ; * : deux prélèvements uniquement ; ** : jours dans l'année ; ND : non déterminé (pas de prélèvement de lait effectué).

Année 2005

Les quantités de LP les plus faibles ont été observées pendant les périodes « Pâturage sur légumineuses » et « Chèvrerie été » ; pour les autres périodes, la teneur en LP a été équivalente dans les laits prélevés, aux alentours de 6-7 mg/L (Tableau 7). La teneur en thiocyanate la plus élevée a été observée pendant les périodes « Pâturage de printemps » (sur graminées) et « Pâturage sur légumineuses ».

Globalement, les quantités de thiocyanate ont été plus élevées dans les laits de 2005 (9,0 mg/l en moyenne) que dans les laits de 2004 (6,1 mg/l en moyenne).

Tableau 7: Résultats des dosages de lactopéroxydase (LP) et de thiocyanate dans les laits (moyenne des 3 prélèvements par période) – Année 2005

	Lactopéroxydase (lait de mélange) en mg/l	Thiocyanate (lait de mélange) en mg/l
Chèvrerie stabilisée (64-72)**	7,1 ± 0,9	8,7 ± 0,7
Pâturage de printemps (103-137)**	7,4 ± 0,7	10,3 ± 1,9
Pâturage sur légumineuses (159-162)**	3,5 ± 0,4	9,7 ± 1,1
Chèvrerie été (198-230)**	4,1* ± 0,6	7,4* ± 1,2
Pâturage d'automne (277-281)**	7,7 ± 1,3	9,1 ± 0,3
Tarissement (289-302)**	5,9 ± 0,5	8,8 ± 0,8

LP : lactopéroxydase ; * : deux prélèvements uniquement ; ** : jours dans l'année.

1.3.2 Lactoferrine

L'évolution de la détermination de la concentration en lactoferrine au cours de la lactation (années 2004 et 2005) est présentée dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Résultats des dosages de lactoferrine (Lf) dans les laits de mélange (moyenne des 3 prélèvements par période) – Année 2004

	Lactoferrine (lait de mélange) en mg/L
Chèvrerie stabilisée (55-57)**	138 ± 1
Mise à l'herbe (71-75)**	143* ± 14
Pâturage de printemps (90-92)**	190 ± 8
Pâturage sur légumineuses (173-175)**	219 ± 12
Chèvrerie été (194-196)**	271* ± 32
Pâturage d'automne (250-252)**	300 ± 21
Tarissement (308-310)**	421 ± 72

* : deux prélèvements uniquement ; ** : jours dans l'année.

Tableau 9 : Résultats des dosages de lactoferrine (Lf) dans les laits de mélange (moyenne des 3 prélèvements par période) – Année 2005

	Lactoferrine (lait de mélange) en mg/L
Chèvrerie stabilisée (64-72)**	164 ± 17
Pâturage de printemps (103-137)**	249 ± 19
Pâturage sur légumineuses (159-162)**	263 ± 29
Chèvrerie été (198-230)**	260* ± 136
Pâturage d'automne (277-281)**	441 ± 14
Tarissement (289-302)**	405 ± 72

* : deux prélèvements uniquement ; ** : jours dans l'année.

Au cours de la lactation, la teneur en lactoferrine a augmenté graduellement, passant de 138 mg/L (chèvrerie stabilisée ; jours de l'année 55-57) à 421 mg/L (tarissement ; jours de l'année 308-310) pour l'année 2004 et de 164 mg/L (chèvrerie stabilisée ; jours de l'année 64-72) à 405 mg/L (tarissement ; jours de l'année 289-302).

2 Variabilité des flores microbiennes des laits et des fromages

La variabilité des flores microbiennes des laits de tank et des fromages selon le type de lait mis en fabrication et selon le type de technologie adoptée a été étudiée au cours de la première année de suivi (2004).

2.1 Exploration de la flore microbienne des laits de tank

2.1.1 Effet de la période

Compte tenu de la structuration des données, un effet « période » a été pris en compte et décrit. L'analyse qui en a été faite peut donc être considérée comme une évaluation préliminaire de l'incidence de la période sur l'évolution des flores microbiennes au cours du temps. Cet effet période est plus largement étudié §4.

La période de production (6 classes P1 à P6 en 2004) constitue la variable à expliquer et les résultats microbiologiques sur les différents milieux de culture les variables explicatives. La combinaison linéaire de ces variables a expliqué les différences entre les 6 périodes de l'essai à 83%. Un gradient est observé de la période 1 à la période 6. Il est caractérisé par l'opposition suivante :



Ainsi, au cours de la campagne, la flore sélectionnée sur les milieux VRGB, RPF et FH (coliformes, staphylocoques coagulase positive et lactobacilles mésophiles), s'est développée davantage dans les laits, et celle cultivée sur milieu CFC (Gram négatif) s'est réduite.

Le second axe déterminant (65%) est défini par les niveaux de dénombrements des flores sur milieux SB (bactéries lactiques), M17 (flore totale) et Turner (lactocoques), des coordonnées positives correspondant à des dénombrements plus élevés sur ces 3 milieux.

Les positions des différents laits analysés sur les 2 premiers axes discriminants sont indiquées sur la figure 3 :

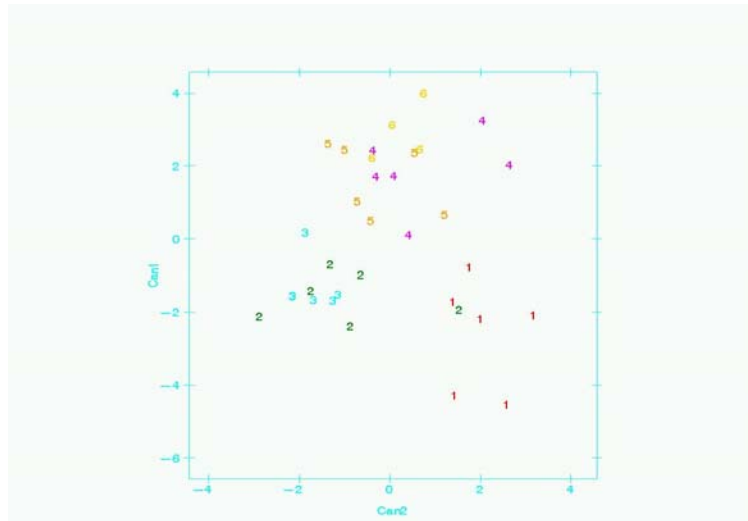


Figure 3 : Analyse discriminante de l'effet de la période sur la flore des laits

Sur la figure, l'appartenance des laits (laits du matin et laits de mélange, collectés à 3 reprises pour chaque période de l'essai, soit 6 laits par période) à une période donnée est indiquée par un numéro allant de 1 (période P1) à 6 (période P6).

Suite à cette analyse, les différentes périodes de l'essai ont pu être regroupées en deux grands ensembles : périodes P1, P2 et P3 d'une part, P4, P5 et P6 d'autre part. Les moyennes des dénombrements par milieu sur ces deux phases de la campagne sont indiquées de manière graphique sur la figure 4.

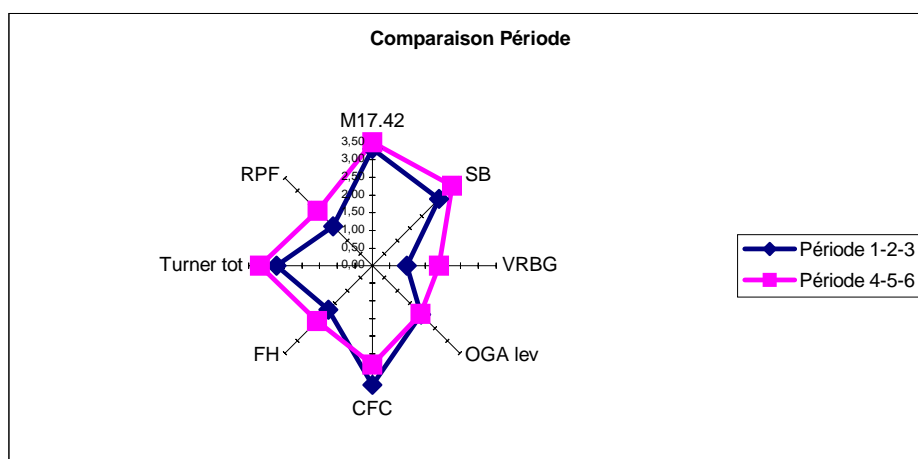


Figure 4 : Moyennes des dénombrements (\log_{10} ufc/ml) par milieu selon la période d'analyse au cours de la campagne laitière

2.1.2 Effet du type de lait

Une combinaison linéaire des variables microbiologiques explique les différences entre les 2 types de lait (de la traite du matin et de mélange) à 40%.

L'axe discriminant (Figure 5) est défini par les niveaux de dénombrements sur milieux M17_42 (flore totale thermophile), RPF (staphylocoques coagulase positive), OGA (levures), VRBG (coliformes), SB (bactéries lactiques), des coordonnées positives étant associés à des niveaux de dénombrements plus élevés sur ces milieux (Figure 6).

Les positions des laits sur l'axe discriminant sont indiquées sur la figure 5 :

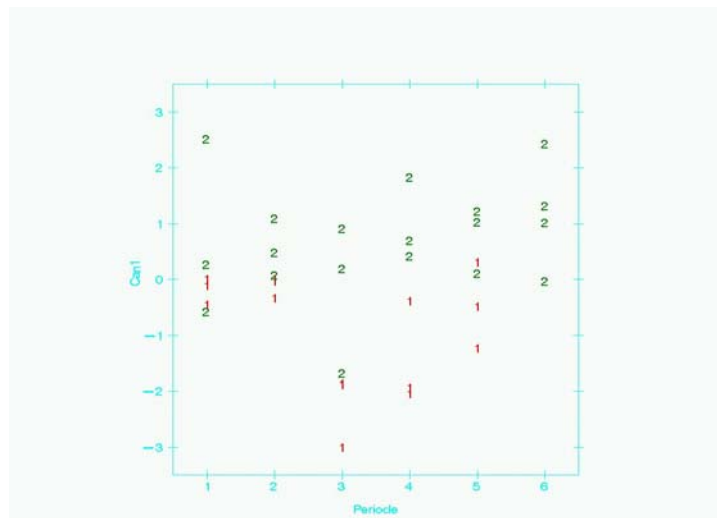


Figure 5 : Analyse discriminante du type de lait (matin ou mélange) sur la flore des laits
Sur la figure, les laits du matin sont identifiés par le chiffre 1 et les laits de mélange par le chiffre 2 : 3 analyses pour chaque type de lait à chaque période d'essai (6 périodes)

La figure 6 illustre les moyennes des dénombrements par milieu pour les 2 types de laits :

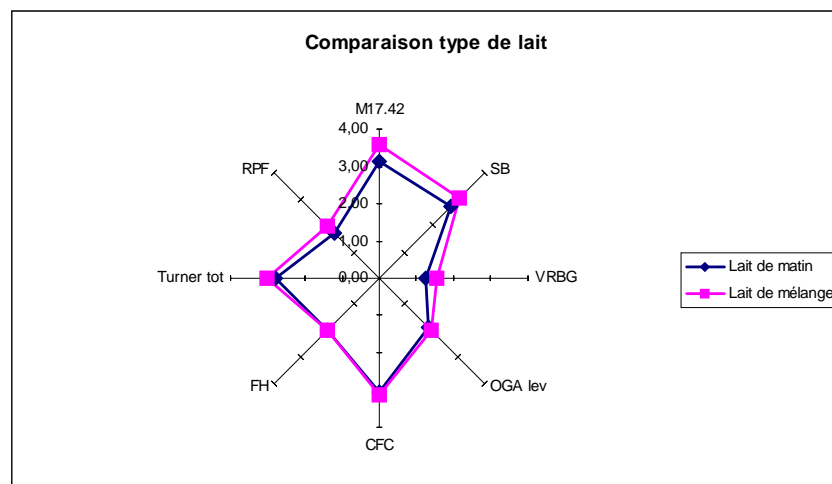


Figure 6 : Moyennes des dénombrements par milieu (log10 ufc/ml) selon le type de lait (matin ou mélange) analysé

2.2 Exploration de la flore microbienne des fromages

Ont été pris en compte dans l'analyse les résultats obtenus pour chaque type de fabrication (pâte lactique et caillé doux) à raison de 3 prises d'échantillons (réalisées sur 3 jours successifs) à trois stades d'affinage et au cours des 6 périodes de production.

Une combinaison linéaire des variables de microbiologie explique les différences observées sur les fromages au cours des 6 périodes d'essai à 69%. Le gradient obtenu de la période 1 à la période 6 est caractérisé par l'opposition :

M17_42 OGA_lev

OGA mois

Au cours de la campagne, la flore identifiée sur milieux M17_42 (flore totale thermophile) et OGA (levures) s'est développée davantage, et celle du milieu OGA (moisissures) moins. A noter, le second axe déterminant (42%) est défini par la croissance des bactéries sur milieux SB (bactéries lactiques) et OGA (levures).

Après regroupement des périodes 1 à 3 d'une part et 4 à 6 d'autre part, les moyennes des dénombrements par milieu pour les deux grandes phases de la campagne ainsi définies sont présentées graphiquement figures 7 et 8 :

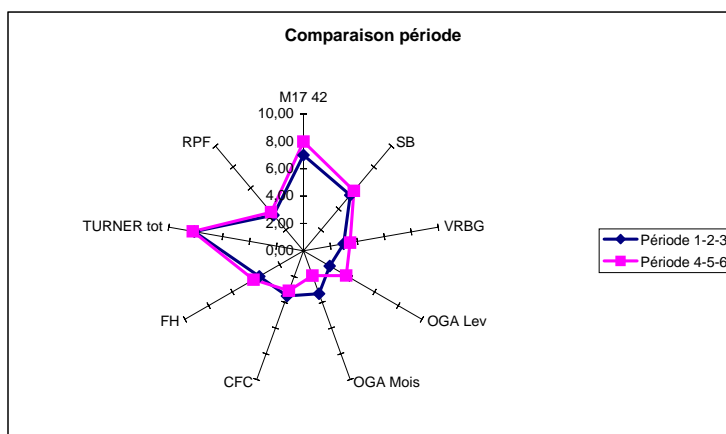


Figure 7 : Moyennes des dénombrements par milieu (log₁₀ ufc/ml) selon la période d'analyse des fromages au cours de la campagne laitière

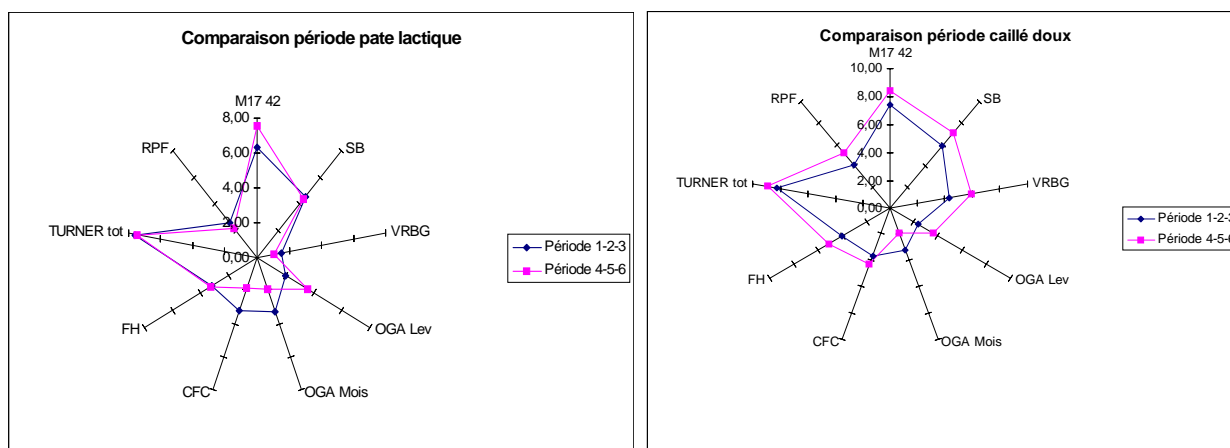


Figure 8 : Moyennes des dénombrements par milieu (log₁₀ ufc/ml) selon le type de fromage (pâte lactique ou caillé doux) analysé et selon la période d'analyse considérée au cours de la campagne laitière

2.3 Corrélation entre les flores des laits et des lactosérums

Le tableau 10 présente les corrélations entre les résultats de dénombrements obtenus sur les différents milieux à partir des laits de tank et des lactosérums

Tableau 10 : Corrélations entre les résultats de dénombrements obtenus sur les différents milieux à partir des laits et des lactosérums

	M17_42	SB	VRBG	OGA _ levures	CFC	FH	Turner _ tot
M17_42	0,06762	0,33523	-0,36169	-0,03563	-0,06765	-0,01524	0,13118
SB	0,21595	0,67112	-0,66142	0,03868	0,12893	0,16530	0,29622
VRBG	0,45729	0,11234	-0,42812	0,25734	-0,33805	0,11553	-0,47026
OGA _levures	0,10783	0,26218	0,03967	0,10526	0,42779	-0,07756	-0,16570
CFC	-0,06024	0,44352	0,02802	-0,45773	0,32100	-0,05903	0,16839
FH	0,44615	0,16502	-0,26842	0,17482	-0,14967	0,48678	-0,29086
Turner _ tot	0,33008	0,57993	-0,19878	-0,10685	-0,08287	0,08781	0,12621

3 Influence des facteurs zootechniques sur les flores microbiennes

3.1 Incidence de l'alimentation

Pour les milieux M17 (à 42°C) (Flore totale) et SB (à 42°C) (bactéries lactiques dont entérocoques), aucun effet de la conduite alimentaire n'a été mis en évidence en considérant un intervalle de temps de 5 jours.

Lorsque l'incidence de l'alimentation est perceptible, elle peut être observée :

- pendant les 5 jours précédant les analyses microbiologiques pour les milieux FH, CFC, RPF, Turner, PCA et OGA – levures ;
- uniquement pendant les 3 jours précédant la réalisation des dénombrements pour les milieux MSE et CRBM (effet significatif au seuil de 5 %).

En introduisant progressivement les facteurs de X^{t-5} à X^{t-1} dans l'analyse, on montre que l'on peut ne conserver que le facteur X^{t-5} (ou X^{t-3} pour MSE et CRBM) : après ajustement de ce facteur, l'introduction des autres facteurs ne permet pas d'améliorer le modèle (R^2 des modèles précisés dans les tableaux 11 à 18).

En début de lactation, lors de la première période d'alimentation en chèvrerie, les bactéries Gram négatif et notamment les Pseudomonas (milieu CFC), les lactocoques (milieu de Turner), les leuconostocs dextrane positifs et entérocoques (milieu MSE), les bactéries d'affinage (milieu CRBM) présentent des valeurs de dénombrement en moyenne plus élevées que pendant le reste de la campagne laitière.

Les dénombrements obtenus sur les milieux FH (lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatives) et PCA CV (bactéries à Gram négatif) sont en moyenne plus élevés lors du pâturage sur légumineuses et au cours de la seconde période d'alimentation en chèvrerie réalisée en saison estivale (Tableaux 11 et 15).

Les dénombrements réalisés sur le milieu OGA_levures sont en moyenne plus élevés lors du pâturage sur légumineuses. Enfin, les dénombrements en staphylocoques obtenus sur le milieu RPF neg 37°C sont en moyenne plus élevés lorsque les animaux sont en chèvrerie en saison estivale (Tableau 13).

Tableau 11 : Moyennes des dénombrements observés sur le milieu FH pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

FH	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
t-1 Nombre	23	36	15	49	<.0001	26%
Moyenne ± Ect	1,72 ± 0,43	1,54 ± 0,59	2,38 ± 0,83	2,28 ± 0,59		
t-2 Nombre	23	35	15	50	<.0001	26%
Moyenne ± Ect	1,72 ± 0,43	1,53 ± 0,60	2,39 ± 0,83	2,26 ± 0,59		
t-3 Nombre	24	34	16	49	<.0001	28%
Moyenne ± Ect	1,69 ± 0,44	1,52 ± 0,58	2,34 ± 0,85	2,30 ± 0,57		
t-4 Nombre	25	33	16	49	<.0001	28%
Moyenne ± Ect	1,66 ± 0,45	1,53 ± 0,58	2,33 ± 0,85	2,30 ± 0,57		
t-5 Nombre	26	33	16	48	<.0001	30%
Moyenne ± Ect	1,66 ± 0,44	1,51 ± 0,59	2,38 ± 0,79	2,31 ± 0,57		

Tableau 12 : Moyennes des dénombrements observés sur le milieu CFC pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

CFC	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
J-1 Nombre	23	36	15	49	<.0001	21%
Moyenne ± Ect	2,74 ± 1,33	1,99 ± 1,16	1,61 ± 1,35	1,05 ± 1,23		
J-2 Nombre	23	35	15	50	<.0001	22%
Moyenne ± Ect	2,74 ± 1,33	2,05 ± 1,12	1,61 ± 1,35	1,03 ± 1,22		
J-3 Nombre	24	34	16	49	<.0001	20%
Moyenne ± Ect	2,70 ± 1,32	2,00 ± 1,19	1,63 ± 1,31	1,05 ± 1,23		
J-4 Nombre	25	33	16	49	<.0001	19%
Moyenne ± Ect	2,65 ± 1,31	2,01 ± 1,21	1,56 ± 1,24	1,08 ± 1,26		
J-5 Nombre	26	33	16	48	<.0001	19%
Moyenne ± Ect	2,65 ± 1,29	1,93 ± 1,25	1,67 ± 1,17	1,06 ± 1,27		

Tableau 13 : Moyennes des dénombrements observés sur le milieu RPF pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

RPF_neg_37C	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
J-1 Nombre	23	36	15	49	0,0006	13,60%
Moyenne ± Ect	2,80 ± 0,53	2,95 ± 0,24	3,00 ± 0,21	3,13 ± 0,25		
J-2 Nombre	23	35	15	50	0,0011	12,60%
Moyenne ± Ect	2,80 ± 0,53	2,96 ± 0,24	3,00 ± 0,21	3,12 ± 0,26		
J-3 Nombre	24	34	16	49	0,0004	14,30%
Moyenne ± Ect	2,80 ± 0,52	2,94 ± 0,21	3,02 ± 0,22	3,14 ± 0,27		
J-4 Nombre	25	33	16	49	0,0002	15,50%
Moyenne ± Ect	2,79 ± 0,51	2,96 ± 0,19	3,01 ± 0,22	3,14 ± 0,27		
J-5 Nombre	26	33	16	48	0,0002	15,50%
Moyenne ± Ect	2,79 ± 0,50	2,94 ± 0,21	3,05 ± 0,18	3,14 ± 0,27		

Tableau 14. Moyennes des dénombrements observés sur le milieu de Turner pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

Turner_pos_an	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
J-1 Nombre	23	36	15	49	0,0135	9%
Moyenne ± Ect	4,27 ±0,77	3,66 ±1,17	4,06 ±1,13	3,40 ±1,19		
J-2 Nombre	23	35	15	50	0,0083	9%
Moyenne ± Ect	4,27 ±0,77	3,73 ±1,13	4,07 ±1,13	3,36 ±1,21		
J-3 Nombre	24	34	16	49	0,0090	9%
Moyenne ± Ect	4,19 ±0,85	3,83 ±1,19	4,02 ±1,12	3,32 ±1,15		
J-4 Nombre	25	33	16	49	0,0065	10%
Moyenne ± Ect	4,13 ±0,88	3,86 ±1,19	4,09 ±1,11	3,30 ±1,14		
J-5 Nombre	26	33	16	48	0,0100	9%
Moyenne ± Ect	4,11 ±0,87	3,86 ±1,19	4,05 ± 1,13	3,31 ±1,15		

Tableau 15. Moyennes des dénombrements observés sur le milieu PCA CV pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

PCA_CV	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
J-1 Nombre	23	36	15	49	0,0051	10%
Moyenne ± Ect	2,86 ±0,76	2,92 ±0,77	3,42 ±0,47	3,32 ±0,63		
J-2 Nombre	23	35	15	50	0,0094	9%
Moyenne ± Ect	2,86 ±0,76	2,93 ±0,78	3,36 ±0,52	3,32 ±0,62		
J-3 Nombre	24	34	16	49	0,0022	11%
Moyenne ± Ect	2,85 ±0,74	2,89 ±0,72	3,31 ±0,53	3,37 ±0,65		
J-4 Nombre	25	33	16	49	0,0018	12%
Moyenne ± Ect	2,81 ±0,76	2,93 ±0,71	3,29 ±0,52	3,37 ±0,65		
J-5 Nombre	26	33	16	48	0,0017	12%
Moyenne ± Ect	2,81 ±0,74	2,94 ±0,71	3,28 ±0,52	3,38 ±0,66		

Tableau 16. Moyennes des dénombrements observés sur le milieu MSE pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

MSE DNEG	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
J-1 Nombre	23	36	15	49	0,0104	9%
Moyenne ± Ect	3,59 ±0,52	3,07 ±0,76	3,20 ±0,40	3,23 ±0,50		
J-2 Nombre	23	35	15	50	0,0118	9%
Moyenne ± Ect	3,59 ±0,52	3,08 ±0,77	3,17 ±0,39	3,22 ±0,50		
J-3 Nombre	24	34	16	49	0,0278	7%
Moyenne ± Ect	3,55 ±0,56	3,08 ±0,78	3,24 ±0,34	3,22 ±0,50		

Tableau 17. Moyennes des dénombrements observés sur le milieu OGA - Levures pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

OGA_LEVURES	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
J-1 Nombre	23	36	15	49	0,0216	8%
Moyenne ± Ect	1,39 ± 0,97	1,55 ± 0,84	2,02 ± 0,80	1,93 ± 0,80		
J-2 Nombre	23	35	15	50	0,0207	8%
Moyenne ± Ect	1,39 ± 0,97	1,54 ± 0,85	2,01 ± 0,81	1,93 ± 0,79		
J-3 Nombre	24	34	16	49	0,0152	8%
Moyenne ± Ect	1,42 ± 0,96	1,51 ± 0,85	2,11 ± 0,92	1,90 ± 0,75		
J-4 Nombre	25	33	16	49	0,0117	9%
Moyenne ± Ect	1,36 ± 0,99	1,56 ± 0,82	2,10 ± 0,92	1,91 ± 0,75		
J-5 Nombre	26	33	16	48	0,0054	10%
Moyenne ± Ect	1,36 ± 0,97	1,55 ± 0,82	2,18 ± 0,87	1,90 ± 0,75		

Tableau 18. Moyennes des dénombrements observés sur le milieu CRBM pour les facteurs explicatifs significatifs en fonction de la conduite alimentaire adoptée

CRBM 5 jours	Chèvrerie jusqu'à mise à l'herbe	Pâturage sur graminées	Pâturage sur légumineuses	Chèvrerie en période estivale	Pr > F	R ² du modèle
J-1 Nombre	23	36	15	49	0,0084	9%
Moyenne ± Ect	3,66 ± 0,20	3,31 ± 0,43	3,36 ± 0,26	3,41 ± 0,44		
J-2 Nombre	23	35	15	50	0,009	9%
Moyenne ± Ect	3,66 ± 0,20	3,32 ± 0,43	3,33 ± 0,28	3,41 ± 0,44		
J-3 Nombre	24	34	16	49	0,0239	8%
Moyenne ± Ect	3,63 ± 0,24	3,34 ± 0,43	3,33 ± 0,27	3,41 ± 0,44		

3.2 Incidence des modalités de lavage de l'installation de traite adoptées après la traite du soir

Dans l'ensemble, les modalités de lavage de la machine à traire adoptées après la traite du soir ne semblent pas avoir d'incidence majeure sur les niveaux de dénombrements obtenus sur les différents milieux de culture. On peut toutefois noter un effet significatif à 10% du lavage à J-1 pour les milieux Turner (lactocoques), RPF (staphylocoques) et CRBM (bactéries Gram positive, catalase positive).

Tableau 19. Moyennes des dénombrements observés le jour J sur les milieux Turner, RPF et CRBM en fonction du mode de lavage adopté à J-1

Milieux	Acide			Rinçage seul			Pr > F
	Nombre	Moyenne	Écart-type	Nombre	Moyenne	Écart-type	
Turner	70	3,55	1,12	45	3,93	1,24	0,09
RPF	70	3,08	0,31	45	2,97	0,32	0,08
CRBM	70	3,38	0,33	45	3,51	0,48	0,07

4 Dynamique des écosystèmes microbiens au cours du temps

4.1 Effet de la période de prélèvement sur les niveaux de flore des laits (2005)

L'analyse par AFD des niveaux de flores sur divers milieux (Figure 9) montre la séparation des laits en fonction des périodes.

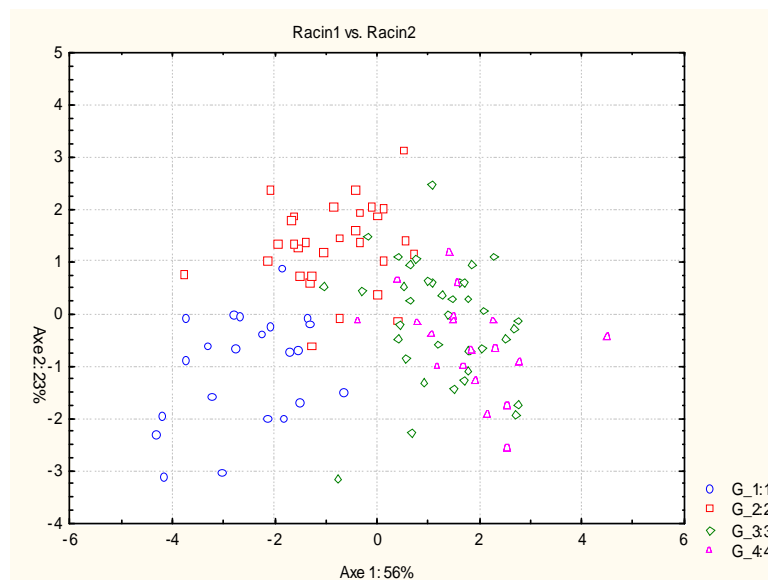


Figure 9 : AFD sur les résultats de dénombrements microbiologiques obtenus au cours des différentes périodes de suivi (P1 à P4)

Les périodes 1 et 2 sont bien séparées alors que les périodes 3 et 4 sont très proches. Les quatre tests statistiques d'analyse multivariée employés (test lambda de Wilks, trace de Pillai, test du maximum de vraisemblance de Hotelling-Lawley et Roy) montrent un effet significatif de la période sur les profils de flore microbienne des laits ($p < 0,001$).

Des tests univariés ont été effectués en vue de compléter la description des populations bactériennes les plus impliquées dans cet effet global. Les valeurs moyennes (Log ufc/ml) et les écarts types pour les 4 périodes sont décrits dans le tableau 20. Il n'y a pas d'effet période pour les niveaux de flores sur les milieux M17 à 30°C et 42°C et SB. Les niveaux de flores qui discriminent les périodes sont ceux des milieux FH, CFC, RPF, PCAI, VRBG et MSE ($P < 0,001$), suivis de ceux sur CRBM, OGA et TA ($P < 0,05$).

Tableau 20. Dénombrements microbiens (\log_{10} ufc/ml) des laits sur les différents milieux selon la période de collecte

Milieux	significance	Période 1 (16 laits)		Période 2 (33 laits)		Période 3 (44 laits)		Période 4 (23 laits)	
		Moy ¹	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
FH	***	1,73 b	0,43	1,31 a	0,43	2,40 c	0,74	2,26 c	0,56
CFC	***	2,71 c	1,35	2,30 bc	0,93	1,77 b	1,41	0,86 a	1,10
RPF	***	2,76 a	0,51	2,92 ab	0,22	3,03 bc	0,23	3,15 c	0,27
PCAI	***	2,83 ab	0,77	2,74 a	0,60	3,30 bc	0,70	3,40 bc	0,60
VRBG	***	0,84 a	0,94	1,11 a	0,90	2,01 b	1,13	1,80 b	1,03
MSE	***	3,67 b	0,38	2,98 a	0,86	3,26 ab	0,64	3,21 a	0,33
CRBM	**	3,67 b	0,20	3,28 a	0,45	3,51 ab	0,50	3,35 a	0,31
OGA	**	1,37 a	0,99	1,40 a	0,88	1,92 ab	0,86	2,00 b	0,69
TA	*	4,22 b	0,75	3,93 ab	1,15	3,76 ab	1,07	3,35 a	1,23

En tenant compte de la sélectivité des milieux, les niveaux de dénombrements des *Enterococcus* peuvent être considérés comme stables tout au long de l'année de lactation. Ceux des lactobacilles mésophiles, des bactéries Gram négatif, des *staphylocoques* et des bactéries corynéformes augmentent tout au long de l'année pour atteindre leur valeur maximale dans les laits collectés lors des périodes P3 et P4. Les niveaux des *Pseudomonas* et *Lactococcus* se sont avérés plus élevés dans les laits de la période P1, diminuant régulièrement tout au long de l'année pour atteindre leur minimum dans les laits collectés en fin de campagne (période P4).

4.2 Effet de la période sur les profils SSCP V3 des ADNr 16S des laits

Les profils SSCP de la région V3 des ADNr 16S des laits varient selon les périodes de production (Figure 10).

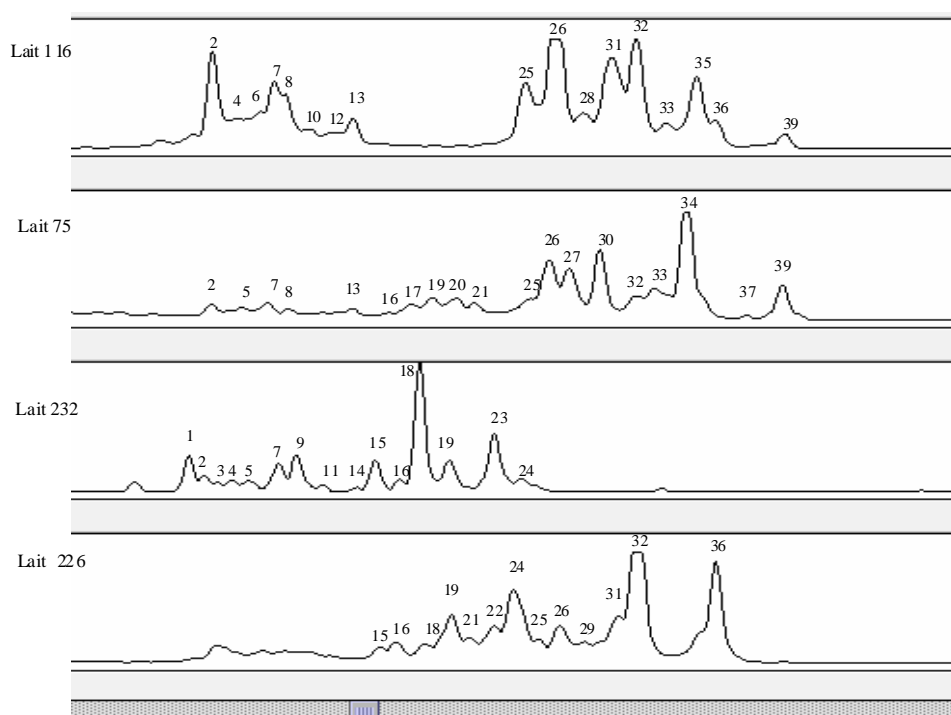


Figure 10. Exemples de profils SSCP V3 de 4 laits collectés à des périodes différentes

Les différences entre les périodes ont été évaluées par une analyse discriminante (AFD) des ratios des différents pics des profils SSCP V3.

L'analyse canonique (Figure 11) de ces résultats a montré que les deux axes 1 et 2 expliquent 80% de la variance (51% pour l'axe 1, 29% pour l'axe 2). Deux laits de la période P1, 4 laits de la période P2, 5 de la période P3 et 4 de la période P4 n'ont pas été classés dans la bonne période. Ces 15 laits n'ont pas été intégrés dans les traitements de données ultérieurs.

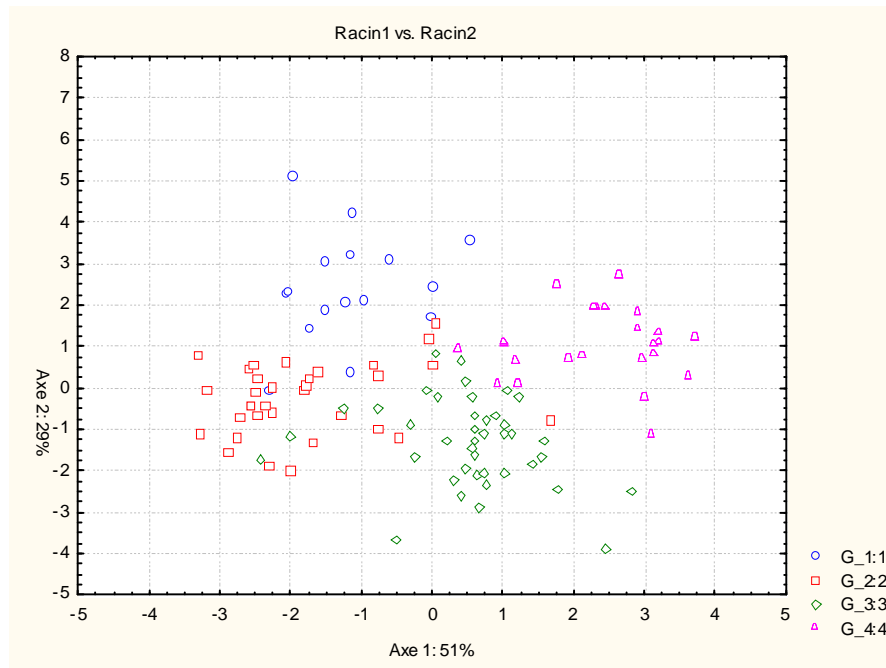


Figure 11. Analyse factorielle discriminante sur les profils SSCP V3 des laits

Les ratios des 39 pics issus des profils V3 SSCP de 103 laits ont ensuite été analysés par MANOVA, la période étant considérée comme facteur explicatif. La période a une incidence significative sur les profils SSCP ($P < 0,01$). Des tests univariés complémentaires montrent que dix-huit pics participent plus particulièrement à la différenciation des laits en fonction des périodes, comme indiqué dans le tableau 21. Les pics les plus discriminants ($P < 0,001$) étaient les pics 19, 32, 13, 7, 20, 9, 35, 3 et 22 suivis des pics 36, 8, 37, 39, 2, 12, 21, 27 et 17. Comme indiqué en Annexe 3.5, ces pics ont été assignés à une ou plusieurs espèces bactériennes.

Tableau 21. Ratios des 18 pics SSCP V3 ayant un effet « période » significatif

Pics SSCP V3 ¹		Période 1 (14 laits)		Période 2 (29 laits)		Période 3 (39 laits)		Période 4 (20 laits)					
		Moy. ²	Ect	Moy.	Ect	Moy.	Ect	Moy.	Ect				
2	$P < 0,01$	1,40	a	1,52	3,81	b	3,38	3,39	ab	2,92	1,81	ab	1,57
3	$P < 0,001$	1,5	b	1,9	0,005	a	0,02	0,31	a	0,82	0,35	a	1,08
7	$P < 0,001$	1,05	ab	0,79	209	b	2,28	0,46	a	1,24	0,29	a	0,44
8	$P < 0,01$	0,37	a	0,58	1,62	b	2,09	0,89	ab	1,00	0,16	ab	0,50
9	$P < 0,001$	0,22	a	0,44	0,37	a	0,85	1,77	b	2,45	2,50	b	1,80
12	$P < 0,01$	0,32	a	0,50	1,21	b	1,39	0,59	ab	0,65	0,59	ab	0,65
13	$P < 0,001$	0,36	ab	0,62	1,25	b	2,19	0,04	a	0,17	0,00	a	0,00
17	$P < 0,05$	0,29	a	0,76	1,19	ab	1,55	3,36	b	6,02	1,27	ab	4,19
19	$P < 0,001$	0,55	a	1,03	1,50	a	2,85	1,37	a	2,63	11,73	b	4,65
20	$P < 0,001$	0,48	a	0,79	0,77	a	1,04	5,68	b	5,91	0,30	a	1,12
21	$P < 0,05$	0,61	a	0,97	0,63	a	1,54	1,75	ab	3,09	2,44	b	1,43
22	$P < 0,001$	1,90	a	2,66	2,21	b	3,34	4,49	c	2,48	4,38	bc	2,27
27	$P < 0,05$	2,32	b	3,93	0,17	a	0,69	1,87	ab	3,66	1,20	ab	1,24
32	$P < 0,001$	10,42	a	10,22	9,66	a	9,65	14,58	a	8,03	27,70	b	9,17
35	$P < 0,001$	13,09	bc	11,12	14,28	c	12,68	3,65	a	5,61	6,09	ab	7,52
36	$P < 0,01$	8,26	b	7,48	2,92	a	5,20	8,01	b	5,95	8,83	b	3,52
37	$P < 0,01$	0,37	a	0,49	2,04	b	3,33	0,35	a	0,69	0,39	a	0,97
39	$P < 0,01$	1,46	a	2,40	5,47	b	6,72	1,44	a	3,28	0,98	a	1,94

¹ Tous les pics sont présentés sur la figure 10 ; ² Moy. : Valeurs moyennes des ratios des pics SSCP V3 des laits de la période ; Ect : écart-type ; a, b, c Les lettres indiquent les groupes statistiques homogènes différents selon le test de Tukey ($P < 0,05$), avec $a < b < c$.

Les ratios les plus élevés dans les profils V3 SSCP des laits de la période 1 sont ceux correspondant à la séquence de *Lactococcus garvieae*, (évolution du pic 35). L'importance relative de ce pic a diminué de manière sensible dans les profils SSCP des laits de la période P2 et au cours des périodes P3 et P4, les ratios correspondant sont faibles.

Tous les pics des profils SSCP V3 des laits de la période 2 étaient globalement très faibles, sans prédominance marquée d'un pic. Cependant, le pic 2 correspondant à la séquence de *Micrococcus luteus* et le pic 39 présentent les ratios les plus élevés, le pic 36 (non assigné) étant au contraire associé aux ratios les plus bas.

Dans les profils SSCP V3 des laits de la période 3, les pics 20 correspondant à la séquence de *Klebsiella* et 17 assigné à *Pantoea agglomerans* présentent les ratios les plus élevés.

Enfin, dans les profils SSCP V3 des laits de la période 4, les ratios les plus élevés sont ceux des pics 19 (assigné à *Chryseobacterium indologenes*), 32 (correspondant à la séquence de *Acinetobacter baumannii*), 9 (*Corynebacterium casei*) et 21 (*Microbacterium*, *Exiguobacterium*).

4.3 Effet de la période sur les profils SSCP V4 des ADNr 18S des laits

Les régions V4 de l'ADNr 18S de 49 laits ont été analysées en SSCP. Des exemples de profils SSCP V4 de laits de différentes périodes sont illustrés figure 11.

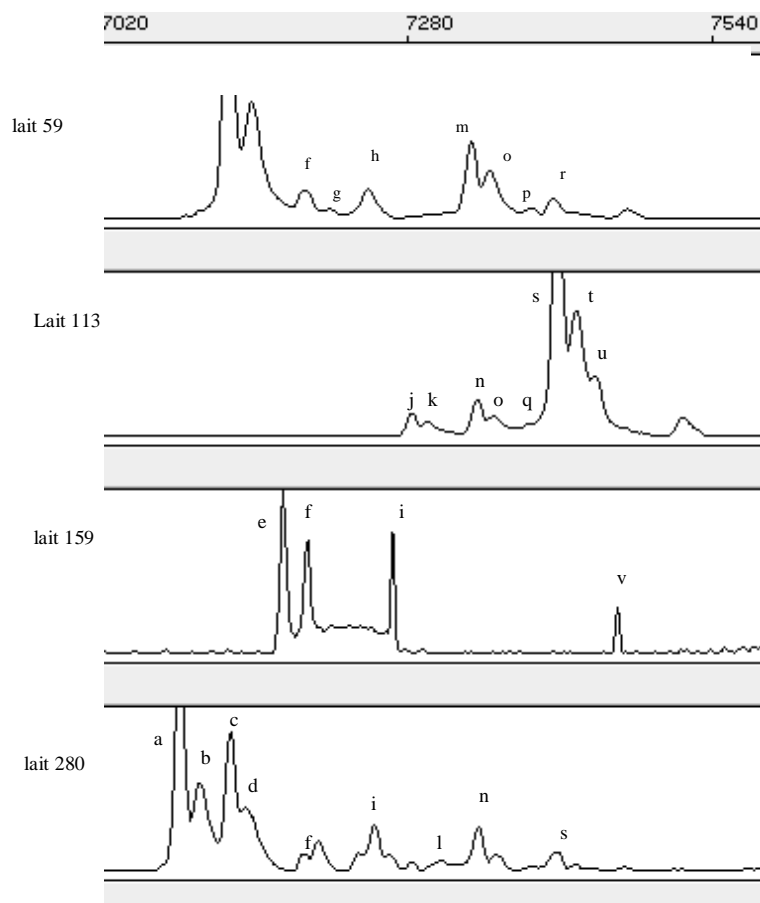


Figure 11 Exemples de profils SSCP V4 de 4 laits collectés à différentes périodes (Chaque lettre correspond à une ou plusieurs espèces.)

Vingt six pics différents ont été trouvés sur l'ensemble des profils de laits répertoriés. Six pics permettent de discriminer les périodes de production. Les résultats de l'analyse canonique sont illustrés figure 12 :

92% de la variance est expliquée soit 61% pour l'axe 1 et 31% pour l'axe 2. De la sorte, 4 laits de la période P1, 2 laits de la période P2, 1 laits de la période P3 et 1 lait de la période P4 s'avèrent incorrectement classés. Ces 8 laits ont été exclus dans la suite du traitement de données.

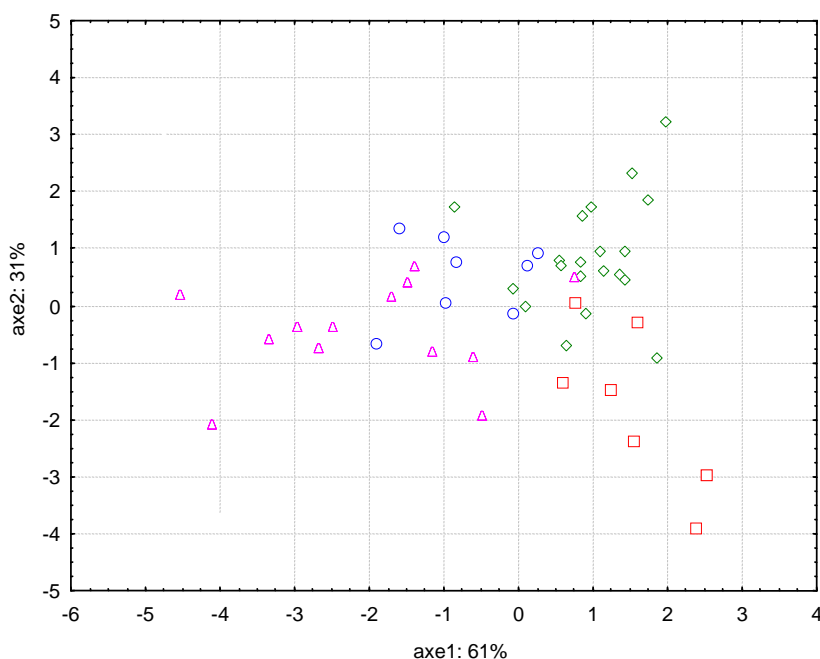


Figure 12. Analyse factorielle discriminante sur les profils SSCP V4 des laits

Les ratios des pics des profils SSCP V4 des 41 laits restants ont été analysés pour déterminer l'existence d'un éventuel effet « période ». Les tests multivariés mettent là encore en évidence un effet significatif de la période de production sur les profils des laits ($p < 0,01$). Six pics contribuent particulièrement à cet effet global (résultats détaillés dans le tableau 22). Les pics ont été assignés à une espèce par comparaison avec l'élution des ADNr 18S des isolats des laits (Annexe3.5).

Tableau 22. Ratios des 6 pics SSCP V4 ayant un effet « période » significatif

Pics SSCP V4 ¹		Période 1 (8 laits)		Période 2 (8 laits)		Période 3 (20 laits)			Période 4 (13 laits)					
		Moy ²	Ect	Moy	Ect	Moy	Ect		Moy	Ect				
c	$P < 0.001$	4.01	a	4.72	0.37	a	0.98	3.08	a	a	0.8	27.3	b	13.28
f	$P < 0.001$	0.00	a	0.7	0	a	0	0	a	a	0	4.01	b	2.56
d	$P < 0.001$	1.36	a	2.73	0	a	0	1.87	a	a	2.5	17.4	b	10.14
k	$P < 0.05$	2.88	ab	3.96	4.29	ab	6.64	11.1	c	c	10.41	1.71	a	3.82
m	$P < 0.05$	36.1	ab	17.17	44.68	c	38.28	18.7	ab	ab	16.16	16.17	a	16.19
s	$P < 0.05$	23.65	b	16.43	2.44	a	5.99	7.99	a	a	7.66	3.7	a	7.84

¹ Tous les pics sont présentés sur la figure 10.

² Moy. Valeurs moyennes des ratios des pics SSCP V4 des laits de la période ; Ect : écart-type ; a, b, c Les lettres indiquent les groupes statistiques homogènes différents selon le test de Tukey ($P < 0.05$), avec $a < b < c$.

Le pic s, correspondant aux séquences de *Rhodotorula glutinis* et *Debaryomyces hanseni* a présenté les ratios les plus élevés dans les profils SSCP V4 des laits de la période 1. Les ratios de ces pics ont diminué fortement dans les profils des laits de la période P2 et augmenté légèrement dans ceux des laits de la période P3.

Dans les profils SSCP V4 des laits de la période P2, les deux pics f (assigné à *Rhodotorula minuta*) et d (non assigné) sont absents et les pics c (assigné à *Candida inconspicua*) et s sont associés aux ratios

les plus bas. A l'inverse, le pic *m* (assigné à *Cryptococcus ater* ou *Cryptococcus curvatus*) a présenté les ratios les plus élevés.

Dans les profils SSCP V4 des laits de la période 3, le pic correspondant à *Rhodotorula minuta* est également absent et les ratios du pic *k* correspondant à *Kluyveromyces lactis* sont les plus élevés.

Enfin, les pics *c* (*Candida inconspicua*), *f* (*Rhodotorula minuta*) et *d* ont les ratios les plus importants dans les profils SSCP V4 des laits de la période 4.

C. Discussion

Description des écosystèmes et diversité de la flore microbienne

La combinaison des deux approches culture dépendante et indépendante sur des laits d'un même troupeau mais collectés à des périodes différentes a permis d'identifier 42 espèces de bactéries et 10 espèces de levures différentes, reflétant la diversité de composition de la communauté microbienne du lait cru de chèvre dans l'exploitation étudiée. Ces travaux n'ont toutefois été conduits que dans une ferme et il est possible que les flores identifiées ne soient pas présentes ou soient présentes dans des proportions différentes dans des laits qui seraient issus d'exploitations différentes.

La diversité des bactéries lactiques n'est pas très importante. Les espèces *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* et *Leuconostoc mesenteroides* ont été détectées avec une prédominance de *Enterococcus faecalis*. La dominance d'*Enterococcus faecalis* a souvent été reportée dans la littérature (Fontecha *et al.*, 1990 ; Tornadijo *et al.*, 1995; Zarate *et al.*, 1997). Elle pourrait s'expliquer, notamment, par l'absence de mesures d'hygiène de la mamelle avant la traite. La présence de *Lactococcus garvieae* dans le lait de chèvre a été mentionnée par Morea *et al.* (1999). De même, *Streptococcus mitis* a été isolé de lait de demi-mamelle de chèvres (B. Poutrel, *Communication personnelle*). *Enterococcus saccharominimus*, non décrit à ce jour dans le lait de chèvre, a également été identifié.

Cette étude a montré une plus grande diversité des bactéries Gram positif non lactiques que celle décrite jusqu'ici dans la littérature. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont confirmé la présence de différentes espèces de *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. caprae* and *S. equorum*) et *Micrococcus luteus* déjà mentionnée dans le lait de chèvre (Sablé *et al.*, 1997; Muehlherr *et al.*, 2003; Kyozaire *et al.*, 2005). Les espèces *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus caprae* et *Staphylococcus simulans* sont des bactéries classiquement impliquées dans les infections mammaires chez la chèvre (Moroni *et al.*, 2005; Leitner *et al.*, 2004; Foshino *et al.*, 2002). *Staphylococcus epidermidis* est ainsi connu comme ayant une persistance élevée dans les infections mammaires (Moroni *et al.*, 2005). D'autres espèces de staphylocoques coagulase négative peuvent occasionner des infections de moindre durée et l'on peut parfois observer une succession de guérisons et de nouvelles infections au cours de la lactation chez le même animal. La dynamique des infections d'une part et en cas d'atteinte de la mamelle, la variabilité des niveaux d'excrétion au cours du temps d'autre part sont susceptibles d'expliquer que certaines espèces aient pu être mises en évidence à un moment donné et pas à un autre.

D'autres espèces comme *Kocuria rhizophila* et *Kocuria carniphila*, *Microbacterium oxydans*, *Exiguobacterium*, *Bacillus thuringiensis* ont déjà été décrites dans des laits crus de vache, alors que *Corynebacterium variabilis* et *Corynebacterium stationis*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Brachybacterium paraconglomerans*, *Clostridium*, *Rothia* ont seulement été mentionnées dans le fromage (Duthoit *et al.*, 2003 ; Irlinger *et al.*, 2005).

Les nombreuses corynébactéries isolées des laits pourraient provenir, de même que les *Staphylococcaceae*, de la peau des mamelles comme l'ont montré Contreras *et al.* (1997).

l'identification des isolats a révélé la présence de 2 espèces *Salinicoccus* spp et *Jeotgalicoccus psychrophilus* qui n'ont jamais été décrites dans du lait. *Jeotgalicoccus psychrophilus* est une bactérie halophile qui a seulement été isolée à partir de produits fermentés Koréens à base de poisson : jeotgal (Yoon *et al.*, 2003). Ces espèces ont été décrites en association avec *Arthrobacter* et *Dietzia maris* dans l'industrie du cuir et provenaient des eaux de process (Oppong *et al.*, 2006). Le genre *Salinicoccus* a quant à lui été isolé de divers environnements hyper salins (Sanchez-porro *et al.*, 2002). Un autre genre atypique parmi les bactéries des produits laitiers est le genre *Ornithinococcus* qui a seulement été décrit comme un actinomycete dans la terre (Groth *et al.*, 1999).

Ces travaux mettent également en évidence la présence d'un grand nombre de bactéries Gram négatif dans les laits crus de chèvre. *Pantoea agglomerans* est l'espèce prédominante isolée du lait, confirmant les résultats obtenus par Pisano *et al.* (2006) dans du lait cru de brebis. L'association de *Pantoea* avec l'espèce halophile *Exiguobacterium* mentionnée ci-après a été observée dans des biofilms de canalisations d'eaux marines par Lopez *et al.* (2006). Le genre *Pseudomonas* est l'autre flore Gram négatif prédominante dans les laits analysés. Sa présence est parfois considérée comme fréquente sur la peau des mamelles des chèvres (Contreras *et al.*, 1999). Elle est souvent mise en relation avec une contamination par l'eau (Leriche *et al.*, 2004 ; Michel *et al.*, 2005). Les *Pseudomonas* pourraient, de plus, être sélectionnés par la conservation du lait à 4°C. La présence de *Pseudomonas* en de telles proportions figure parmi les caractéristiques des laits collectés à la station du Pradel et a pu aller jusqu'à induire des défauts de flaveur dans les fromages. Ce résultat illustre l'incidence sur la flore des laits d'un microbisme propre à l'exploitation et par la même non représentatif des situations rencontrées dans l'ensemble des élevages caprins.

La présence de *Chryseobacterium* dans les produits laitiers a déjà été rapportée par Jooste *et al.* (1999). Cependant, la présence de l'espèce *Hahella chejuensis* est atypique dans le lait; cette espèce étant essentiellement décrite dans la littérature comme une bactérie halophile des environnements marins (Lee *et al.*, 2001).

La diversité de la communauté des levures a également été évaluée et confirme la présence des espèces *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon beigeli* et *Rhodotorula glutinis* déjà décrites dans le lait de chèvre (Tornadijo *et al.*, 1998; Corbo *et al.*, 2001). Les espèces *Candida pararugosa* et *Candida intermedia* n'ont été isolées que de laits de vache (Callon *et al.*, 2006). Nahabieh et Schmidt (1990) ont cependant fait apparaître la place dominante des levures du genre *Candida* (y compris les formes anascopogènes) dans les fromages de chèvre, certaines espèces comme *C. intermedia* et *C. lipolytica* paraissant relativement spécifiques de ces produits. Enfin, les espèces *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus ater* and *Rhodotorula minuta* n'ont été que très rarement décrites dans le lait ou le fromage.

En ce qui concerne les molécules à activité microbienne dans les laits de chèvre, il semble que les teneurs en lactopéroxydase ne soient pas limitantes (>5mg/L) excepté pour les périodes «Pâturage sur légumineuses» et « Chèvreerie en période estivale» en 2005. Ainsi, d'après les résultats obtenus, le potentiel antimicrobien le plus important lié au système lactopéroxydase se situerait aux périodes « Chèvreerie stabilisée » et « Mise à l'herbe », périodes où la concentration en thiocyanate est la plus élevée pour l'année 2004 et à la période « Pâturage graminée » en 2005 (quantité de thiocyanate la plus élevée et concentration en enzyme lactopéroxydase non limitante). A noter toutefois que les constituants du système lactoperoxydase peuvent évoluer dans le temps (Althaus *et al.*, 2001), ce qui peut rendre difficile les comparaisons entre périodes et d'une campagne à l'autre si, par exemple le système a été activé et/ou si les laits n'ont pas été tous congelés dans le même temps suivant la traite.

Des différences significatives de teneur en lactoferrine ont été observées au cours de la lactation. Sur le plan quantitatif et comme indiqué lors l'étude préliminaire, les résultats obtenus sont en accord avec ceux observés par Chen et Mao (2004) et Chen *et al.* (2004) dans des laits de chèvre. Rainard *et al.*,

(1982) avaient observé des résultats similaires, mais sur lait de vache. Différents facteurs agissant sur la concentration en lactoferrine dans le lait sont rapportés dans la littérature. La teneur en lactoferrine augmente en particulier lorsque les animaux sont atteints de mammites. Chen *et al* (2004) ont trouvé que la concentration en lactoferrine dans des laits de chèvres atteintes de mammites était en moyenne de 587 mg/L. Par ailleurs, Turner *et al* (2003) ont noté que la concentration en lactoferrine dans le lait de vaches nourries avec une ration mixte constituée d'ensilage de maïs, d'ensilage d'herbe, de foin, et de concentrés était plus élevée que celle de lait de vaches nourries uniquement à l'herbe ; mais cet effet n'était pas toujours vérifié au cours d'une année et demandait par conséquent des investigations supplémentaires. Enfin, Wang *et al* (2005) ont signalé que la teneur en fer susceptible d'être contenu dans les aliments, pourrait jouer un rôle dans la régulation du taux de lactoferrine en favorisant son expression dans la glande mammaire.

Au delà, la question reste posée de savoir si les différences de teneurs en lactoferrine observées sont de nature à influencer sur la capacité du lait à inhiber *S. aureus* sachant que sa sensibilité à la lactoferrine (bovine) est souche dépendante (Lee *et al*, 2004). Le travail conduit à la station du Pradel ne permet pas de le déterminer.

Dynamique des écosystèmes

Complémentaires pour évaluer la diversité microbienne, les méthodes d'investigation directe et culture dépendante ont également toutes deux montré la stabilité de la composition microbienne au sein d'une période de production donnée et son instabilité à l'échelle d'une année de lactation.

Des changements dans les équilibres microbiens ont été observés dans des laits collectés à différentes périodes. Ces changements pourraient être liés à plusieurs facteurs. Les résultats témoignent d'un effet saison résultant lui-même de la combinaison de plusieurs effets : régime alimentaire, état physiologique et conditions météorologiques, sur les communautés microbiennes du lait.

L'incidence des conditions d'élevage est délicate à mettre en évidence en raison d'une part, de la concomitance des changements zootechniques (changements alimentaires, mouvements d'animaux, ...) et physiologiques (saisonnalité de la production) et d'autre part, de la survenue d'évènements sporadiques pour lesquels il n'a pas toujours été possible de disposer conjointement d'informations sur les écosystèmes en nombre suffisant.

L'incidence des modalités de lavage de l'installation de traite sur la flore microbienne n'a été étudiée que de manière très partielle. Les différences de pratiques de nettoyage n'ont concerné que le lavage de la machine à traire à la traite du soir. Par ailleurs, ces pratiques sont souvent définies sur un pas de temps d'une semaine. La fréquence de l'alternance entre la lessive acide et la lessive alcalin chlorée est ainsi classiquement gérée en fonction de la dureté de l'eau et peut être, selon les exploitations, de quotidienne à hebdomadaire. Ainsi appréhendées, les pratiques de nettoyage de l'installation de traite sont pratiquement restées inchangées sur la période étudiée. Cela explique vraisemblablement que l'évolution de la flore microbienne en fonction des pratiques de nettoyage, telles qu'elles ont pu être prises en compte dans cette étude, soit restée très modérée. Différents travaux menés en conditions de terrain dans des exploitations bovines ont permis d'identifier des pratiques de nettoyage qui tendent à influencer sur l'ensemencement des laits en flores d'intérêts technologiques. Des températures de nettoyage très élevées (70 – 75°C et plus) diminuent significativement la flore totale des laits (Chatelin et Richard, 1981 ; Chatelin *et al.*, 1983). L'alternance quotidienne de produits alcalins et acides semble conduire à une plus grande irrégularité du pouvoir contaminant de la machine à traire et pourrait favoriser l'obtention de laits plus riches en flores d'altération (Chatelin *et al.*, 1983 ; Tormo *et al.*, 2006). En élevages caprins, des essais ont été conduits afin d'étudier différentes procédures de nettoyage et de désinfection des installations de traite en vue de leur décontamination sélective (Laithier *et al.*, 2005). Laithier *et al.* (2005) rapportent que des solutions alcalines de nettoyage non chlorées et

additionnées de sel (0,05 % Na₂SO₄) induisent des changements sensibles dans les proportions des flores présentes dans les biofilms des installations de traite ainsi que dans les laits de mélange. Les flores d'affinage sont favorisées mais les risques de présence de *Pseudomonas* accrus.

L'alimentation en revanche semble jouer un rôle plus marqué sur l'évolution des flores microbiennes. Etroitement liés à un effet « période » ou « saison », les changements d'alimentation correspondent à la fois à des modifications de la composition de la ration et des modalités de distribution (modification des conditions environnementales). Ainsi, en hiver et en partie en été, les chèvres restent à l'intérieur et sont alimentées avec de la luzerne déshydratée alors qu'en automne par exemple, elles sont à l'herbe et alimentées avec des graminées. Parallèlement, les volumes de lait collectés varient au cours de la campagne laitière avec des volumes plus bas en été et en automne. La composition de la communauté microbienne est cependant restée assez stable au sein de chaque période même si quelques laits ont pu se démarquer au sein d'une période donnée (classement erroné dans les périodes de production, d'après les résultats des différentes analyses).

Sur le plan qualitatif, les laits d'hiver (période P1) ont présenté les niveaux de *Lactococcus* sur le milieu TA et *Pseudomonas* sur milieu CFC les plus importants. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse SSCP V3 de ces laits, pour lesquels les ratios des pics correspondant aux séquences de *Lactococcus garvieae* et *Lactococcus lactis lactis* étaient les plus élevés. Les laits d'été et d'automne (périodes P3 et P4) ont été caractérisés par des niveaux en bactéries Gram négatif sur milieux PCAI et VRBG et des staphylocoques et corynébactéries sur milieu RPF plus élevés que ceux des autres périodes. L'analyse SSCP V3 a confirmé ces résultats. Les ratios des pics correspondant aux séquences de *Klebsiella* et *Pantoea agglomerans* ont été les plus élevés dans les profils des laits de la période P3, alors que les ratios des pics assignés aux séquences de *Chryseobacterium indologenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* et *Exiguobacterium* ont été plus importants dans les profils de ceux de la période P4.

L'augmentation progressive de la prévalence des infections mammaires au cours de la campagne laitière est susceptible d'expliquer une gradation de l'importance des staphylocoques au sein des écosystèmes microbiens des laits. Plus généralement, la santé des animaux pourrait être un facteur responsable de changement dans les profils en raison de mammites ou diarrhées observées quelques jours avant le prélèvement de lait. Des événements particuliers tels que les conditions climatiques (pluviosité plus particulièrement), peuvent vraisemblablement induire des changements ponctuels des écosystèmes microbiens. Ainsi, le classement de laits de la période P2 ou P3 en période P4 du fait d'une augmentation de ratio du pic assigné à *Chryseobacterium indologenes* pourrait être lié à des jours de pluie

En conclusion, l'écologie microbienne des laits crus qu'elle concerne la recherche des sources de contamination ou encore les facteurs affectant sa composition, doit être abordée par une double approche culture dépendante et indépendante qui s'avère complémentaire.

Chapitre 4

Recherche et efficacité des écosystèmes des laits de chèvre inhibiteurs de la croissance de *S. aureus*

Les interactions microbiennes sont au cœur de la notion de bio-protection des aliments qui s'est développée au cours de ces vingt dernières années. Il est en effet apparu que les flores naturelles du lait cru (Hechard et al., 1990 ; Pitt et al., 2000 ; Tatini et al., 1971 ; Arslan et Uraz, 2005) ou l'utilisation de ferments lactiques (Gaya et al., 1988 ; Gomez Lucia et al., 1992 ; Gonzales et al., 2003 ; Ibrahim et al., 1981 ; Le Mens et al., 1999 ; Olarte et al., 2000) pouvaient influencer le développement de *S. aureus* et sa production de toxines. Au cours de la transformation et de l'affinage, les caractéristiques biochimiques des produits sont modifiées, l'activité et l'équilibre des flores évoluent, interférant ainsi avec le développement des germes pathogènes (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001 ; David et al., 2001 ; Freitas et Malcata, 1999 ; Tornadijo et al., 1996). Ces interactions se définissent classiquement en termes de coopération, compétition, antagonisme ou encore amensalisme (Dacosta, 2000 ; Noleto et Bergdoll, 1980).

Parmi ces phénomènes, la compétition et l'inhibition ont été particulièrement étudiées en raison de leurs applications prévisibles sur la qualité, notamment sanitaire, des produits (Arihara et al., 1998 ; Gupta et Goel, 1993 ; Meisel et al., 1989 ; Schaack et Marth, 1988) : synthèse de bactériocines par des souches de bactéries lactiques ou des corynébactéries (Capellas et al., 2000 ; Cintas et al., 1998 ; Laukova et al., 1999 ; Lewus et al., 1991 ; Montville et al., 1995 ; Mortvedt et Nes, 1990 ; Rodriguez et al., 2000, Vaughan et al., 1994 ; Zottola et al., 1994) ; recours à des biofilms particuliers (Leriche et Carpentier, 2000 ; Sung et al., 1999). Les recherches engagées par ces différentes voies ont montré leurs limites (Abee et al., 1995 ; Benkerroum et al., 2002, Dykes et Hasting 1998 ; Montville et al., 1995). En effet, les résultats, souvent obtenus par culture (Noleto et al., 1987), en conditions contrôlées, des micro-organismes sur des milieux dont la composition est souvent éloignée de l'habitat d'origine sont difficilement transposables à des écosystèmes complexes tels que le lait ou les fromages.

Une démarche plus globale a donc été récemment adoptée par les microbiologistes. Elle consiste à partir plus directement des observations enregistrées sur le terrain pour mettre en évidence les situations recherchées (inhibition de bactéries pathogènes et / ou recherche de typicité), les décrire et les analyser. Les souches bactériennes ne sont alors plus considérées isolément mais appréhendées sous la forme d'écosystèmes microbiens complexes. Dans cette logique et avec un objectif de maîtrise de la contamination des fromages par *S. aureus*, il s'agit donc dans cette partie de l'étude d'identifier des laits de troupeau ayant un effet inhibiteur vis à vis de *S. aureus*.

Ce volet est divisé en deux phases visant successivement à mettre en évidence puis à caractériser le comportement inhibiteur des écosystèmes des laits sur la croissance de *S. aureus* :

- Première phase : recherche des écosystèmes microbiens laitiers inhibiteurs
- Deuxième phase : évaluation de l'efficacité de ces écosystèmes dans des conditions variées, selon la technologie fromagère appliquée et selon les conditions de contamination et/ou d'inoculation des laits par *S. aureus* (type de souches, niveaux de contamination ou d'inoculation).

1 Recherche d'écosystèmes laitiers inhibiteurs de *S. aureus*

La recherche d'écosystèmes microbiens laitiers inhibiteurs a reposé sur deux dispositifs correspondant à deux approches complémentaires.

La première approche a consisté à étudier et comparer les niveaux de contamination relatifs des laits et des fromages obtenus en exploitations fermières. Lorsqu'à partir de laits crus contaminés par *S. aureus* et après application d'une technologie fromagère sensible (type mixte présure), des fromages de bonne qualité microbiologique sont néanmoins obtenus, on peut présager du caractère inhibiteur des laits de mélange issus de l'exploitation (dispositif d'observation).

La seconde approche a reposé sur le repérage et le test de laits régulièrement peu contaminés par *S. aureus*. La régularité de la faiblesse des niveaux de contamination rencontrés peut être la conséquence de la maîtrise du statut sanitaire du troupeau (absence ou faible nombre d'individus excréteurs) ou témoigner de la capacité du lait cru à limiter très précocement le développement de *S. aureus*. L'évaluation de ces laits est alors envisagée en laboratoire (dispositif expérimental) en recourant à des inoculations de *S. aureus* lors de tests de lactofermentations.

1.1 Sélection des exploitations

La première étape a donc consisté à recueillir des données du terrain ou issues des fichiers de laboratoires d'analyses, ce qui a également permis de dresser un bilan de la situation concernant les niveaux de contamination des laits et des fromages de chèvre (Chapitre 1).

L'analyse des fichiers de données transmis par les laboratoires d'analyses (LILCO) ou les entreprises laitières (Eurial-Poitouraine, Sèvres et Belle, Fromagerie de Banon) a permis de sélectionner une cinquantaine d'exploitations caractérisées par la régularité de leurs bons résultats de dénombrement en *S. aureus* sur les laits ou les fromages (élevages présents dans le dispositif d'observation). Le choix des exploitations a été réalisé à partir de l'historique des données de contamination de *S. aureus* obtenues en 2002, 2003 et au cours des premiers mois de la campagne 2004. Les résultats de dénombrement de *S. aureus* relativement médiocres début 2004 n'ont pas été sans constituer un handicap dans la sélection des élevages. En pratique, ont été retenues les exploitations pour lesquelles ont été observés moins de 3 dépassements du seuil de 200 ufc/ml (aucun dépassement de 500 ufc/ml) sur l'ensemble de la période considérée.

Sur le terrain, le dispositif d'observation mis en place dans les élevages fermiers du secteur AOC Banon (réalisation de fabrications de type présure) a permis de comparer les niveaux de contamination relatifs des fromages et des laits mis en fabrication. Devaient être retenus prioritairement les laits ayant eu des niveaux élevés en *S. aureus* mais ayant permis l'obtention de fromages faiblement contaminés. Un seul élevage a répondu à ce critère mais a arrêté sa production en septembre 2004. Par défaut, ont donc été sélectionnés les producteurs fermiers dont les laits ont répondu aux critères de sélection établis pour les producteurs laitiers inclus dans le dispositif expérimental.

1.2 Evaluation du potentiel inhibiteur des laits de troupeau

La recherche de laits inhibiteurs vis-à-vis de *S. aureus* a été fondée sur la sélection d'une cinquantaine de laits évalués expérimentalement lors de tests de lactofermentation.

1.2.1 Protocoles des tests de lactofermentations (Figure 1)

Modalités de prélèvement et de stockage

Des laits d'une, voire deux traites maximum, ont été collectés en conditions aseptiques (emploi de matériel stérilisé) puis transportés sous couvert du froid (glacière et plaques eutectiques) jusqu'aux laboratoires d'analyse (Carmejane ou ITPLC). Les échantillons (2 litres de lait prélevés par exploitation) étaient maintenus à 4°C dans l'attente de leur mise en lactofermentation le jour même. Six flacons de 50 ml de lait ont été placés à -80°C à titre conservatoire.

Choix de la température de lactofermentation

La dénomination de lactofermentation est classiquement employée pour des tests simples de fermentation de petits volumes de lait incubés le plus généralement à 37°C. Après 24 h, le pH est noté et l'aspect visuel des gels apprécié : gélifié, floconneux, liquide, gonflé ou encore digéré (Michel et al., 2001). Dans le cadre de nos essais, l'objectif était de permettre l'expression au plus juste du potentiel inhibiteur de chaque type de flore, en se rapprochant des conditions réelles de fabrication. Le choix de la température devait par conséquent constituer un compromis entre température de début et de fin de fabrication en technologie présure : emprésurage à 30 voire 34°C mais températures comprises entre 20 (produit de type Camembert) et 25°C (caillé doux de type Banon) après 24 heures d'égouttage. La température de 37°C a d'emblée été écartée car trop élevée. Une température de 30°C risquait de favoriser la flore lactique acidifiante au détriment des flores aromatiques qui croissent à des températures plus basses que les acidifiantes (Desmazeaud et de Roissard, 1994). Or, les flores aromatiques (hétérofermentaires) telles que les *Leuconostocs* peuvent notamment synthétiser des bactériocines susceptibles de participer à l'inhibition de la croissance de *S. aureus*. La température de lactofermentation a par conséquent été fixée à 27°C.

Définition de la taille de l'inoculum

La taille de l'inoculum a été fixée à 100 ufc/ml, soit un niveau de contamination considéré comme proche des conditions effectives de terrain. Dans l'espèce caprine, la prévalence des infections occasionnées par *S. aureus* est en effet de l'ordre de 1 à 2 % (de Cremoux, 1995). On peut en outre considérer qu'un animal, infecté unilatéralement (cas le plus fréquent), présent dans un troupeau de 100 chèvres, contribue au niveau de contamination du tank dans des limites comprises entre 25 et 50 ufc/ml (sous l'hypothèse d'un niveau d'excrétion équivalant à 5000 à 10000 ufc/ml). Le test réalisé revient dans ce cas à étudier le comportement de l'écosystème du lait face à l'apparition de nouvelles infections (généralement en nombre limité) et un apport transitoire de *S. aureus* dans le lait de tank suite à l'excrétion mammaire des bactéries par les chèvres infectées.

Choix des souches de référence

La souche inoculée devait pouvoir être différenciée des souches de *S. aureus* présentes naturellement dans les laits. Dans cette optique, l'INRA de Nouzilly a sélectionné en laboratoire des souches de *S. aureus* comportant un marqueur de résistance à un antibiotique, la Rifamycine. La souche retenue dans les premières séries de tests est d'origine caprine (lait de mammite) et présente un potentiel entérotoxigène de type C. Ce type de souche est le plus répandu dans les élevages caprins en France mais aussi à l'étranger (de Buyser et al., 1987 ; Orden et al., 1992 ; Rossec 1999 ; Jorgensen et al., 2005ab) ce qui justifie son choix. Les essais conduits avec cette souche sont vraisemblablement plus représentatifs de la situation sanitaire et épidémiologique des élevages caprins que ceux effectués avec des souches de biotype différent (Meyrand et al., 1998 ; Vernozy-Rozand et al., 1998 ; Morgan et al., 2000). Lors de l'évaluation de l'efficacité du potentiel inhibiteur selon les conditions d'inoculation

(effets « seuil » et « souche » ; §5.), on a néanmoins eu recours à une seconde souche également marquée mais cette fois de biotype inconnu et entérotoxigène de type A. Cette souche a été choisie en raison de l'incrimination fréquente des entérotoxines de type SEA dans les toxi-infections alimentaires.

Préparation de l'inoculum

Les différentes souches étudiées ont été placées dès réception dans des tubes comportant 5ml de BHI (Brain Heart Infusion : bouillon cœur cerveau) additionnés de 1ml de glycérol et conservées à -80°C. Deux jours avant inoculation, le contenu d'un tube est décongelé rapidement (40°C pendant 1min). Un millilitre de cette suspension est ensuite utilisé pour ensemercer 5ml de BHI (adapté de Gomez-Lucia et al., 1992, Lamprell, 2003). Cette nouvelle suspension est dénombrée après ensemencement dans la masse en gélose Baird Parker + RPF et incubation pendant 24h à 37°C. La lecture du dénombrement est donc réalisée le jour de l'inoculation. La suspension mère est alors diluée avec du Tryptone-Sel de manière à obtenir dans 1ml le nombre de germes correspondant au niveau d'inoculum souhaité. Cette dilution est ensuite centrifugée (20min / 4°C / 3800g) dans le but de séparer les bactéries des toxines éventuellement produites lors de la culture. Ce protocole de centrifugation est particulièrement important pour la mise en oeuvre de la dernière phase du programme qui prévoit le dosage des entérotoxines durant les fabrications fromagères (§ 5.2). Le surnageant est remplacé par une quantité identique de Tryptone-Sel ; le tout est ensuite agité au vortex de façon à remettre les bactéries en suspension. Un millilitre est introduit dans un litre de lait (cas des lactofermentations) ou dans environ 30 ml de lait chauffé en vue d'inoculer 30 litres de lait (cas des fabrications).

Nature des témoins

Pour chaque lait testé, un échantillon non inoculé servant de témoin a été suivi afin d'observer la croissance des souches natives de *S. aureus* en l'absence d'ajout d'inoculum.

Pour chaque série de laits, un lait G (Standa Industry) stérile a également été ensemercé de façon à contrôler la répétabilité de la croissance de la souche INRA et à évaluer la croissance de *S. aureus* en l'absence d'acidification et de flore endogène.

1.2.2 Analyses réalisées

Suivi de la croissance des souches de S. aureus au cours du temps (Tableau 1)

Le dénombrement des souches de *S. aureus* dans leur ensemble (souches natives du lait et souche exogène inoculée) a été réalisée sur un milieu Baird Parker + RPF (Norme NF V 08-057-2). La souche marquée a été dénombrée spécifiquement après adjonction de Rifamycine (128µg/ml) dans le milieu de culture. Ce dispositif a permis de mesurer les croissances relatives des souches natives et de la souche inoculée dans les laits testés, d'évaluer le comportement des laits en dehors de tout apport de souche exogène, de mettre en évidence, le cas échéant, une compétition entre les souches de *S. aureus* en présence.

Les analyses de dénombrement ont été réalisées en début et fin de lactofermentation et, pour les laits inoculés, à un temps intermédiaire.

Pour définir la fin de la lactofermentation, un pH de 5 a été retenu de préférence au choix d'un temps arbitraire de fermentation. En effet, en cas de cinétique d'acidification rapide des laits, l'exposition prolongée des *S. aureus* à un milieu acide (maintien prolongé à des pH de l'ordre de 4,6) est susceptible d'induire une diminution de leur population et peut fausser les interprétations ultérieures

quant à leur potentiel inhibiteur. Dans le cas où certains laits ne parviendraient pas à atteindre ce pH, un prélèvement a été prévu après 24 h d'essai.

Le temps intermédiaire a été défini comme le temps nécessaire à l'obtention d'une variation de pH égale à 0,08 unités pH. Le dénombrement correspondant doit permettre d'apprécier la croissance relative des souches de *S. aureus* en absence d'acidification des laits (caractère inhibiteur des composants du lait et/ou de la flore autre qu'acidifiante).

Dans le lait G (stérile), en raison de l'absence d'acidification, les temps intermédiaire et final ont été pris arbitrairement égaux à 15 h (temps moyen d'obtention d'un pH de 5 dans les laits crus) et 24 h.

Suivi des cinétiques d'acidification au cours des tests

Les cinétiques d'acidification des laits ont pu être suivies par enregistrement simple ou grâce au logiciel CINAC. Des mesures ont été établies à intervalle de 5 mn (ITPLC) ou de 30 mn (CarmeJane). Le centre de CarmeJane a interrompu ses relevés en fin de lactofermentation (soit au bout de 24 heures), alors que l'ITPLC a pu, le plus souvent, poursuivre ses mesures jusqu'à l'obtention d'un plateau.

Les paramètres obtenus sont les suivants :

- temps de latence, temps d'obtention d'un delta pH de 0,08 et le cas échéant d'un pH de 5 (fin de fermentation) ;
- à défaut d'obtenir un pH de 5, notation du pH obtenu à 24h.

Caractérisation des laits prélevés

Différentes analyses ont été réalisées en vue de caractériser les laits prélevés (Tableau 1) :

- analyses concernant la composition du lait et appréciation de sa qualité sur le plan technologique : matière grasse (TB), matière protéique (TP), teneurs en immunoglobulines G
- recherche des inhibiteurs, dénombrements des cellules somatiques, dénombrements de la flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR) sur milieu PCA en vue de l'appréciation de la qualité sanitaire du lait,
- mesure de la lipolyse (appréciation de la qualité sensorielle du lait).

Tableau 1 : Analyses et observations réalisées sur les laits testés et témoins avec et sans inoculation expérimentale

Nature des laits	Temps	Dénombrements			Mesures		Aspect du gel
		FMAR*	<i>S. aureus</i> **		pH	Horaires	
			Milieu sans antibiotique	Milieu avec antibiotique			
Lait non inoculé	initial	X	X	X	X		
	final	X	X	X	X	X	X
Lait inoculé	initial			X	X	X	
	intermédiaire	X	X	X	X	X	
	final	X	X	X	X	X	X
Lait G	initial			X	X	X	
	intermédiaire			X	X	X (T0 + 15h)	
	final			X	X	X (T0 + 24h)	

* FMAR : flore mésophile aérobie revivifiable

**dénombrement des souches de staphylocoques coagulase positive sur milieu spécifique BP-RPF avec ou sans adjonction d'antibiotique dans le milieu

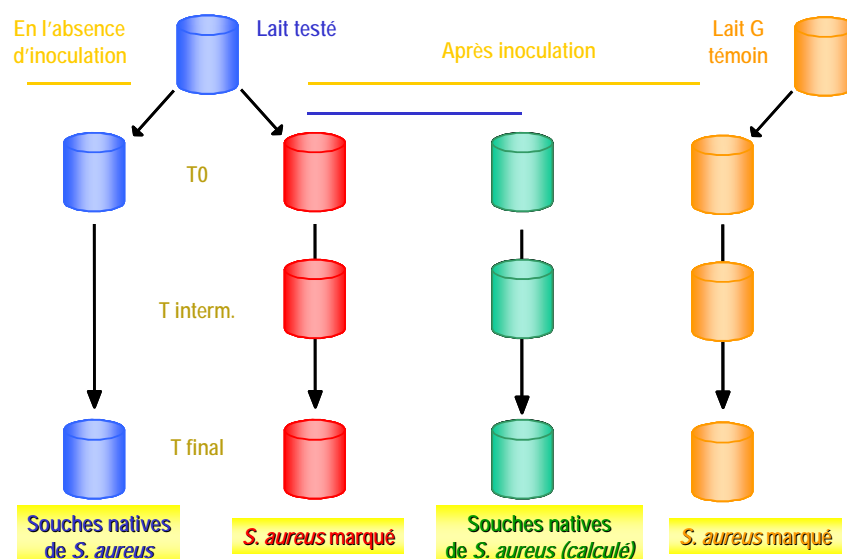


Figure 1 : Protocole de test des laits de tank en vue de l'évaluation de leur potentiel inhibiteur vis à vis de *S. aureus* ; informations obtenues sur la croissance des souches natives ou marquée

1.3 Définition du potentiel inhibiteur des laits testés

La recherche de laits potentiellement inhibiteurs repose sur l'étude de la croissance entre temps initial, temps intermédiaire et temps final :

- de la souche de *S. aureus* marquée (Sar), inoculée dans les laits testés ;
- des souches natives de *S. aureus* ;
- de l'ensemble des souches de *S. aureus* (Sa).

Dans la définition du potentiel inhibiteur des laits entrent par conséquent en ligne de compte des notions de souches, de temps et de mécanismes d'inhibition.

Derrière le terme très général « d'inhibition » employé ici, il faut en pratique comprendre « faible croissance voire stagnation ou diminution du nombre de *S. aureus* pendant la lactofermentation ».

Ce caractère inhibiteur pourra se manifester soit vis-à-vis des souches natives (ceci soit dans un contexte de compétition avec une autre souche de *S. aureus* en cas d'inoculation, soit au sein de l'écosystème « naturel » du lait testé), soit vis-à-vis de la souche « marquée », soit encore vis-à-vis de l'ensemble des souches de *S. aureus*.

L'« inhibition » des souches natives est particulièrement intéressante en exploitation fermière. Des laits potentiellement inhibiteurs vis à vis des souches natives et marquée seront considérés comme plus « polyvalents » et, à ce titre, davantage susceptibles d'intéresser les transformateurs aussi bien industriels que fermiers.

La notion d'inhibition ou de limitation de la croissance de *S. aureus* fait également intervenir le temps puisqu'elle peut être mise en évidence à temps intermédiaire (en moyenne 11 heures), à temps final (et dans ce cas, elle se produit le plus souvent après acidification des laits : en moyenne pH de 5,29) ou aux deux temps.

L'évaluation du potentiel inhibiteur des laits est fondée sur le calcul des pentes de croissance à temps intermédiaire et à temps final pour chaque type de souches et chaque lait :

- Croissance des souches natives en delta log10 : calculée à partir des évolutions constatées dans les laits non inoculés ($\log(Sa) - \log(Sa_0)$) ;
- Croissance de la souche inoculée en delta log10 : calculée à partir évolutions constatées dans les laits inoculés ($\log(Sar) - \log(Sar_0)$) ;

- Croissance totale en delta log10 : calculée à partir à partir évolutions constatées dans les laits inoculés ($\log(Sa) - \log(Sa_0)$).

Une classification des laits a ensuite été réalisée par Analyse en Composantes Principales (ACP).

Le traitement de données a porté sur 55 laits en 2004 puis, à l'issue de la phase de prospection initiale, sur :

- les laits jugés les plus prometteurs au regard de leurs précédents résultats soit, 11 laits en 2005 et 10 laits en 2006 ;
- des laits témoins considérés comme non inhibiteurs à l'issue des précédents essais : soit 6 laits en 2005 et en 2006 ;
- 3 laits de petit mélange (mélange de deux laits modérément non inhibiteurs en 2004) en 2005, considérés comme témoins et permettant *a priori* de limiter un possible effet « troupeau ».

2 Evaluation de la stabilité du potentiel inhibiteur des laits au cours du temps

A la suite de la première étape de screening des laits, de nouvelles séries de lactofermentation (quatre) ont été conduites préalablement à chaque étape de l'étude qu'il s'agisse de l'évaluation du potentiel inhibiteur en fabrication, de l'appréciation de sa robustesse en technologie sensible ou encore selon le type de souche de *S. aureus* et le niveau d'inoculation (Figure 2). Des tests complémentaires, simplifiés par rapport aux précédents (évaluation non différenciée de la croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus*), ont en outre été réalisés en parallèle des fabrications fromagères.

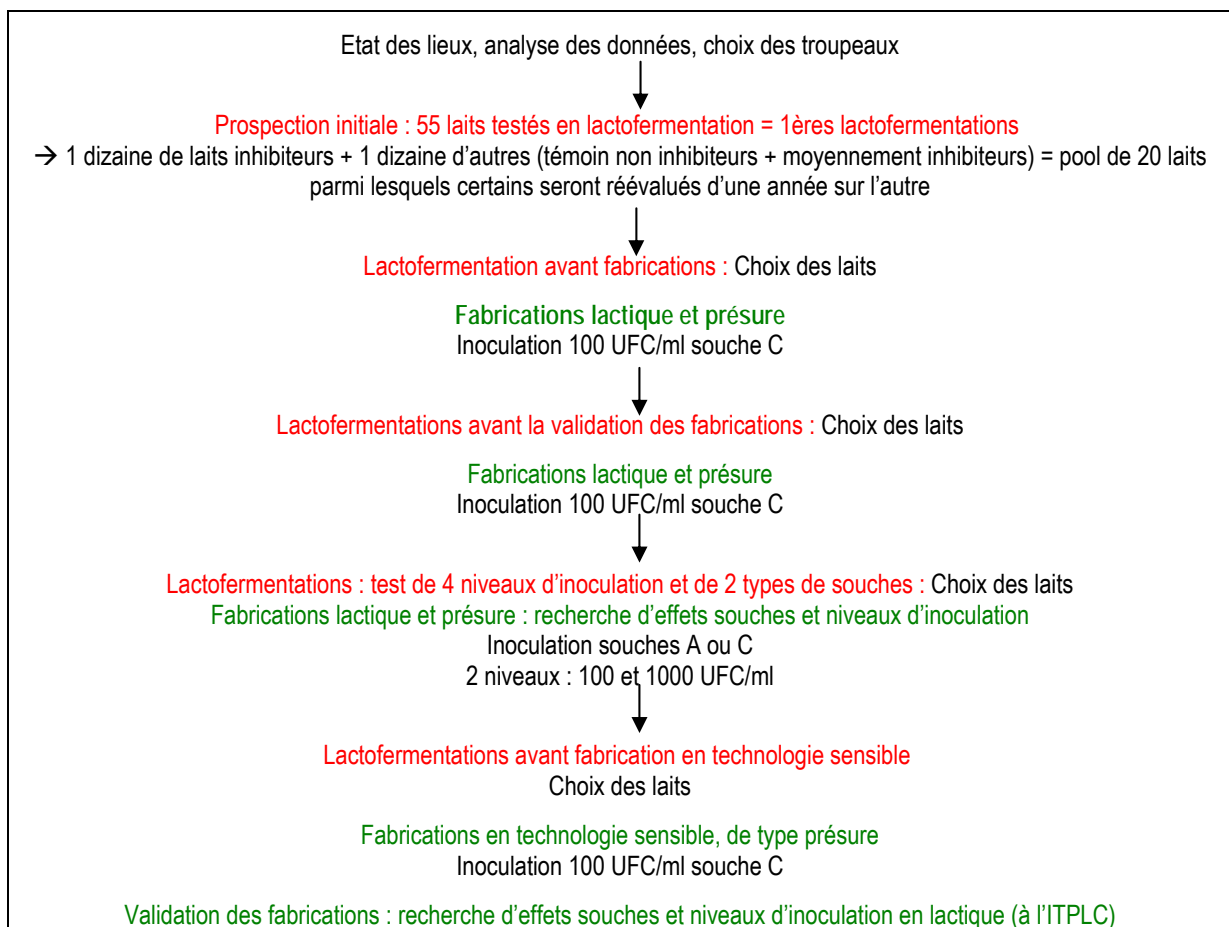


Figure 2 : Schéma global et chronologie des expérimentations

Ont de la sorte été pris en compte les risques d'instabilité du comportement inhibiteur des laits au cours du temps, une évolution de leur potentiel étant susceptible d'être induite par les changements survenant au sein des troupeaux caprins parmi lesquels le renouvellement annuel d'environ 30% des effectifs. Ce faisant, ces tests ont permis de retenir systématiquement les laits les plus pertinents (laits inhibiteurs ou au contraire laits témoins non inhibiteurs) au regard des objectifs visés. Les résultats issus de l'ensemble de ces essais ont fait par la suite l'objet de synthèses et d'analyses conjointes.

La stabilité du potentiel inhibiteur des laits au cours du temps a ainsi pu être évaluée et le caractère prédictif du statut défini en 2004 étudié.

Pour ce faire, une ACP suivie d'une classification ont d'abord été réalisées à partir des variables « croissance de la souche inoculée entre T_0 et T_{final} » et « croissance des souches natives entre T_0 et T_{final} », en prenant en compte les laits testés au cours des différentes séries de lactofermentations. Une analyse globale a été conduite en intégrant l'ensemble des données acquises sur les trois années de suivi. Ce faisant, il s'est avéré que la prédominance des laits non inhibiteurs (déséquilibre des effectifs en faveur de ces laits, majoritaires en 2004), était de nature à masquer certains types de comportements des laits inhibiteurs. Une analyse similaire a donc été réalisée sur les données acquises en 2005 et 2006 uniquement afin de favoriser la discrimination entre les populations de laits inhibiteurs. Seuls les résultats issus de ce second traitement de données sont rapportés par la suite.

Une analyse de variance a permis :

- sur les données acquises en 2004 : de déterminer si le statut des laits attribué initialement pouvait décrire les évolutions de croissances des souches de *S. aureus* enregistrées simultanément ;
- sur les données acquises en 2005 et 2006 : de mesurer le caractère prédictif de ce statut.

Le modèle posé a été le suivant :

$$Y_k = \mu + \alpha_k$$

avec Y_k : croissance de la souche inoculée à temps final (1)
 croissance des souches natives à temps final (2)
 μ : effet moyen
 α_k : effet principal du statut k

3 Relation entre les caractéristiques et l'aptitude à l'acidification des laits et leur potentiel inhibiteur

3.1 Relation entre capacité acidifiante des laits et potentiel inhibiteur

L'évaluation de l'aptitude à l'acidification des laits a reposé sur l'étude des courbes d'acidification enregistrées lors des tests de lactofermentation de 2004 à 2006.

L'analyse des relations entre aptitude à l'acidification et croissance de *S. aureus* a porté sur les données obtenues par l'ITPLC, les courbes d'acidification obtenues étant plus complètes et plus nombreuses (§ 1.2).

Les courbes d'acidification ont été modélisées par une fonction de Weibull à 3 paramètres (Tomassone et al., 1993) :

$$\Delta ph_i = a \left[1 - e^{-\ln(2) \left(\frac{t_i}{M} \right)^c} \right] \text{ avec :}$$

Δph_i la variation de pH à t_i

a la valeur maximale de Δph

M le temps écoulé quand $\Delta ph = a/2$

c un paramètre caractéristique de la pente de la courbe à l'origine

La première heure n'a pas été prise en compte, le pHmètre n'étant pas forcément stabilisé, et aucune limite de temps n'a été fixée (toutes les données disponibles ont été utilisées). Certaines courbes ont donc été modélisées sur plus ou moins de temps en fonction des relevés disponibles.

Les modélisations ont été réalisées à l'aide de la procédure nlin de SAS Institute (Version 8).

Toutes les courbes n'ont pas pu être ajustées. Différentes raisons peuvent en être responsables : sonde phmétrique non stabilisée, accident dans la courbe, plateau non atteint. Au total, 100 courbes ont pu être utilisées : 52 sur des laits inoculés et 48 sur des laits non inoculés.

A partir des paramètres estimés, une analyse typologique a été effectuée : Analyse en composantes principales suivie d'une classification sur facteurs. Une analyse de variance a ensuite été réalisée pour étudier si la croissance à t_{final} pouvait être expliquée par le profil d'acidification. Trois classes de niveau de contamination initiale en souches natives ont été définies : moins de 1 log, entre 1 et 2 log, au-delà de 2 log. La variable correspondante a été introduite dans le modèle sous forme de covariable.

Le modèle ainsi défini s'exprime comme suit : $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \theta_j + e_{ijk}$

y_{ijk} croissance de la souche inoculée à t_{24H} pour le lait k / croissance des souches inoculée et natives à t_{24H} pour le lait k

μ moyenne générale

α_i effet de la classe i de profil d'acidification (3 classes : suppression de la classe 2 en raison de la faiblesse des effectifs concernés)

θ_j effet de la classe d'appartenance j pour les souches natives (3 classes)

3.2 Relation entre indicateurs de la qualité des laits et potentiel inhibiteur

Ont été prises en compte les analyses biochimiques établies sur les laits ainsi que l'évolution de l'historique des résultats de contamination des laits par *S. aureus*.

Une ACP intégrant les caractères physico-chimiques et microbiologiques des laits (IgG, numérations cellulaires, FMAR, MP, MG, lipolyse) a été réalisée. L'historique des résultats de contamination des laits par *S. aureus* n'a été étudié qu'à titre descriptif.

4 Evaluation du potentiel inhibiteur des laits en transformation fromagère

4.1 Protocole expérimental

Choix des laits mis en fabrication

Les laits mis en fabrication ont systématiquement faits l'objet de tests en lactofermentation préalables de manière à apprécier leur capacité à limiter la croissance des souches de *S. aureus* et à disposer à la fois de laits potentiellement inhibiteurs et de laits témoins non inhibiteurs (§2).

Préparation de l'inoculum

Une inoculation à 100 ufc/ml a été réalisée pour l'ensemble des fabrications. La préparation de l'inoculum a été réalisée selon les procédures décrites dans le cadre des tests de lactofermentations (§1.2.1).

Souches de référence

Les souches utilisées sont les mêmes que celles employées en lactofermentation mais sans présenter de marqueur d'antibiorésistance. En effet, les fabrications étant réalisées en hall technologique, le recours à des souches présentant un marqueur d'antibiorésistance était de fait exclu. Elles sont également entérotoxigènes.

Pour l'ensemble des fabrications, l'inoculation des laits a été réalisée avec la souche entérotoxigène de type C. Pour l'évaluation de l'effet « souche » (§ 5), la souche de type A a également été testée.

Schémas technologiques

Des schémas technologiques «fromage à pâte lactique» et «fromages de type présure» (Annexes 4.1 et 4.2) identiques ont été appliqués à l'ITPLC et à Carmejane. Les volumes de lait traités ont été de 20 à 30 litres par modalité testée.

4.2 Analyses réalisées

Analyses microbiologiques et biochimiques

Des prélèvements en vue d'analyses microbiologiques (en particulier dénombrement des staphylocoques coagulase positive) et biochimiques (Tableau 2) ont été réalisés pour chaque fabrication.

Tableau 2 : Définition des stades d'affinage en vue de la réalisation des analyses microbiologiques et biochimiques

	Technologie lactique	Technologie présure (Banon)
Lait avant inoculation	X	X
Lait après inoculation (J)	X	X
J+1	X	X
J+2	X	X
J+3	X	X
J+9		X
J+13	X	
J+15		X(CFC)
J+21	X	

A chaque prélèvement, les analyses ont été réalisées sur un mélange de deux ou trois fromages selon leur taille. Cet échantillon de mélange a été bloqué à 4°C. Cependant, des pré-essais réalisés par l'ITPLC ayant permis de constater une diminution de la population de *S. aureus* de l'ordre de 0,5 log après 2 jours de conservation à 4°C dans des fromages de type présure à pH 4,8, il a été jugé préférable de procéder au traitement des prélèvements le jour même de la prise d'échantillon.

Suivi pH des laits mis en fabrication

Un suivi pH sur les laits de fabrication (ensemencés en ferments lactiques) a été réalisé en bain-marie (ITPLC) à la température de fabrication, soit 22 ou 34°C selon le type de technologie appliquée afin d'évaluer l'aptitude à l'acidification des laits pendant les 24 premières heures.

Tests de lactofermentations parallèles aux fabrications fromagères

Une série de lactofermentations a été conduite en parallèle des fabrications. Dans l'hypothèse d'une évolution du comportement des laits entre la phase de fabrication et la série de lactofermentation précédente, elle devait permettre de faire la part entre l'impact de la technologie en elle-même et la possible évolution du potentiel inhibiteur. Dans ce contexte et compte tenu de l'objectif visé, les essais de lactofermentations ont été conduits, à l'instar de ce qui avait été réalisé lors des précédentes lactofermentations, sur des laits non ensemencés en ferments lactiques. Les conditions des essais sont restées inchangées (§1.2.1) : inoculation des laits à l'aide de la souche de type C (100 ufc/ml), température fixée à 27°C, suivi pendant 24 heures (ce qui correspond à J+1 en fabrication). Les dénombrements en *S. aureus* totaux correspondants ont été réalisés à T_0 (avant et après inoculation) et au bout de 24h.

4.3 Traitement des données

Le nombre limité de laits mis en fabrication autorise essentiellement une analyse descriptive des données. Il est cependant apparu intéressant d'étudier le caractère prédictif des tests de lactofermentations réalisés en parallèle des fabrications, pour estimer l'évolution de la croissance de *S. aureus* dans les fromages.

La comparaison des données issues des tests de lactofermentations et des essais de fabrication a reposé sur l'analyse des dénombrements de l'ensemble des souches de *S. aureus* (souches natives et souche inoculée) recueillis à T_0 (avant et après inoculation) puis à 24 heures (soit J+1 pour les fromages).

Une analyse de variance a été réalisée en posant le modèle suivant :

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \theta_j + \beta_j (x_{ijk} - \bar{x}) + e_{ijk} \text{ avec en indice } i \text{ le centre, } j \text{ la souche native en classe, } k \text{ le lait}$$

y_{ijk}	croissance dans le fromage k
μ	moyenne générale
α_i	effet du centre i (Carmejane et ITPLC)
θ_j	effet du process technologique (lactique et présure)
β_j	coefficient de y en x à l'intérieur d'un process technologique ($\beta_j = \beta + \delta\beta_j$)
x_{ijk}	croissance de <i>S. aureus</i> lors des tests de lactofermentation pour le lait k
\bar{x}	moyenne des x_{ijk}
e_{ijk}	erreurs résiduelles

5 Evaluation de la robustesse du potentiel inhibiteur des laits selon les conditions d'inoculation

Deux types d'effets ont été évalués pour apprécier la robustesse du potentiel inhibiteur des laits selon les conditions d'inoculation. Ont été pris en compte à la fois le type de souche de *S. aureus* et la taille de l'inoculum.

Pour ce faire, une première série d'essais a été effectuée en laboratoire (tests de lactofermentations) ce qui a permis d'étudier un nombre accru de situations et d'augmenter le nombre de points expérimentaux comparativement à des essais qui auraient été directement conduits en fabrication fromagère. Des fabrications ont été réalisées dans une seconde étape.

5.1 Protocole expérimental

Deux souches de *S. aureus* ont été utilisées :

- la souche entérotoxigène de type C, employée lors des précédents essais;
- une souche entérotoxigène de type A, fournie par l'INRA de Poligny.

Les tests de lactofermentations ont été conduits dans des conditions similaires à celles décrites au §1.2.1 et ont fait appel à des souches marquées (§1.2.1). Le plan d'expérience adopté a été le suivant :

- 3 laits inhibiteurs et 2 laits non inhibiteurs ;
- 2 types de souches de *S. aureus* ;
- 4 niveaux d'inoculation : 100, 500, 1000 et 5000 ufc/ ml.

Lors de l'évaluation en transformation fromagère, seuls deux niveaux d'inoculum ont été conservés : 100 et 1000 ufc/ml. La croissance de *S. aureus* a été suivie jusqu'à 1/2 DLUO (21 jours).

5.2 Recherche des entérotoxines

Selon la bibliographie, les entérotoxines sont produites essentiellement pendant la phase exponentielle de croissance lorsque la population bactérienne atteint ou dépasse un seuil de 10^5 ufc/g. Zecconi et al. (2006) rapportent en outre l'importance des conditions de température (comprises entre 10 et 45°C) et de pH (entre 5,15 et 9). Dans cette étude, la recherche d'entérotoxines a par conséquent été effectuée dans les fabrications fromagères lorsque les populations de staphylocoques à coagulase positive (SCP) ont dépassé 10^5 ufc/g à J+1 ou J+3 (10^4 ufc/g dans certains cas). Les analyses ont été réalisées à l'aide du VIDAS (Chapitre 3). En cas de résultat positif, les entérotoxines ont été typées à l'aide du kit Oxoid.

5.3 Traitement des données

Compte tenu du nombre restreint de laits testés, le traitement statistique des données n'a pu être conduit que sur les données issues des tests de lactofermentations, les résultats obtenus en fabrication n'étant alors analysés que de manière descriptive.

Sur les données de lactofermentations, une première analyse a été réalisée afin d'évaluer l'incidence de la taille de l'inoculum sur l'expression du potentiel inhibiteur. Dans un premier temps, n'ont été considérées que les données acquises avec la souche de type C de manière à pouvoir inclure l'ensemble des tests conduits entre 2004 et 2006.

5.3.1 Etude de la relation dose – réponse en lactofermentations

La dose inoculée est un facteur contrôlé (contrairement aux niveaux de dénombrements des souches natives de *S. aureus*). Lors des essais de 2004, 2005 et tout début 2006, la taille de l'inoculum a été fixée à 100 ufc/ml. Néanmoins, malgré un protocole strict, établi et commun pour les deux centres d'expérimentation, des différences d'inoculations ont été observées et ont pu varier de 0,75 à 2,28 log. Les données acquises ultérieurement dans le cadre des essais concernant l'incidence des conditions d'inoculation ont été obtenues avec des inoculum théoriques allant de 100 à 5000 ufc/ml, ce qui a permis d'aboutir *in fine* à une plage de variation de 0,75 à 4 log pour la taille de l'inoculum (Figure 3).

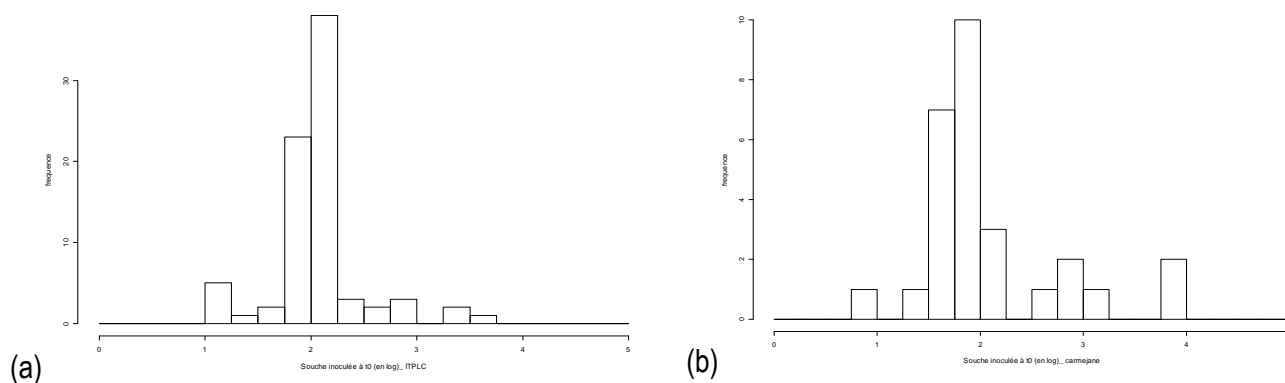


Figure 3 : Distribution de la taille de l'inoculum au cours des différents essais de lactofermentation à l'ITPLC (a) et à Carmejane (b)

Le niveau de contamination initial des laits (avant adjonction de la souche inoculée) a été mis en classes. Trois classes ont été établies en tenant compte de la distribution des niveaux de dénombrement (Figure 4) : niveau inférieur ou égal à 1log , compris entre 1 et 2 log, supérieur 2 log (Tableau 3).

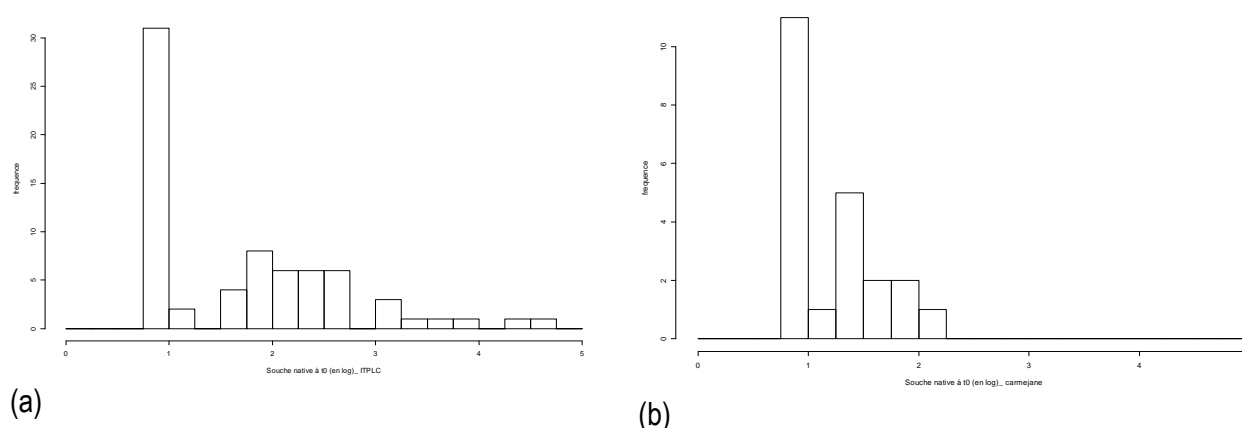


Figure 4 : Distribution du niveau de contamination initiale des laits par *S. aureus* au cours des différents essais de lactofermentation conduits à l'ITPLC (a) et à Carmejane (b)

Tableau 3 : Distribution du niveau de contamination initiale des laits par *S. aureus* (en log) au cours des différents essais de lactofermentation conduits dans les deux centres d'essais

Centre	$\leq 1 \log$	$1 < \leq 2 \log$	$> 2 \log$
ITPLC	37	14	29
Carmejane	17	10	1

La croissance des souches de *S. aureus* (souche inoculée seule ou ensemble des souches natives et inoculée) a été étudiée en adoptant le modèle suivant :
$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \theta_j + \beta_j (x_{ijk} - \bar{x}) + e_{ijk}$$
 avec en indice i le centre, j les souches natives (en classes), k le lait

y_{ijk}	croissance de la souche inoculée à t_{24H} pour le lait k / croissance des souches inoculée et natives à t_{24H} pour le lait k
μ	moyenne générale
α_i	effet du centre i (Carmejane et ITPLC)
θ_j	effet le classe d'appartenance pour les souches natives (3 classes)
β_j	coefficient de y en x à l'intérieur d'une classe d'appartenance pour les souches natives ($\beta_j = \beta + \delta\beta_j$)
x_{ijk}	dose inoculée pour le lait k
\bar{x}	moyenne des x_{ijk}
e_{ijk}	erreurs résiduelles

Les résidus ne suivent pas les hypothèses de normalité et présentent de l'hétéroscédasticité (dispersion des résidus non homogène), tendant ainsi à indiquer que ce modèle ne s'ajuste pas très bien sur les données. Cependant celles-ci sont assez nombreuses et équilibrées pour que le modèle posé puisse être valide. En outre, les observations dont les résidus étaient supérieurs à |2| ont été supprimées (4 observations pour la croissance de la souche inoculée ; 3 observations pour la croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus*) pour en améliorer la validité.

5.3.2 Etude des effets « dose » et « souche » en lactofermentations

Dans cette analyse, seuls ont été considérés les essais de lactofermentations faisant appel aux souches de type A et C conduits en 2006. Les effets « souche » et « niveau d'inoculation » sur la croissance de la souche inoculée ou de l'ensemble des souches de *S. aureus* ont été évalués en recourrant au modèle suivant :
$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_s + \theta_j + \beta_s (x_{ijk} - \bar{x}) + e_{ijk}$$
 avec en indice i le centre, s le type de souche, j les souches natives en classes, k le lait

y_{ijk}	croissance de la souche inoculée à t_{24H} pour le lait k / croissance des souches inoculées et natives à t_{24H} pour le lait k
μ	moyenne générale
α_i	effet du centre i (Carmejane et ITPLC)
θ_j	effet de la classe d'appartenance pour les souches natives (2 classes : souches natives absentes ou présentes)
γ_s	effet du type de souche (A et C)
β_s	coefficient de y en x à l'intérieur d'une classe d'appartenance pour le type de souche ($\beta_s = \beta + \delta\beta_j$)
x_{ijk}	dose inoculée pour le lait k
\bar{x}	moyenne des x_{ijk}
e_{ijk}	erreurs résiduelles

La concentration en souches natives de *S. aureus* au temps initial a été prise en compte comme covariable (définition de deux classes). Le modèle posé est fondé sur l'existence d'une structure de variance – covariance des laits intra centre – souche.

6 Evaluation de la robustesse du potentiel inhibiteur des laits en technologie sensible

L'expression du potentiel inhibiteur des laits a été évaluée et comparée à des laits témoins non inhibiteurs dans des conditions de fabrication favorables à la croissance de *S. aureus* : températures « élevées » et doses de ferments faibles. Les essais réalisés début 2007 ont été conduits sur des fabrications de type présure (Banon) en se plaçant à 36°C et en recourant à des doses de ferment (CHN14 Chr. Hansen, Arpajon, France) de :

- 1% équivalent lactosérum (= 10 g/100L de lait : dose utilisée dans les expérimentations précédentes),
- 0,1 % (1g /100L)
- ou 0 % (pour Carmejeane uniquement, cette modalité correspondant aux pratiques effectives d'une partie des transformateurs fermiers de la zone AOC Banon).

Les laits choisis à la suite des tests de lactofermentations préalables étaient :

- ITPLC : laits inhibiteurs : 9, 28 et 45 ; lait témoin non inhibiteur : 32
- Carmejeane : lait inhibiteur : 49 ; lait témoin non inhibiteur : 46

7 Comparaison des écosystèmes des laits en fonction de leur caractère inhibiteur

L'objectif était de comparer les flores microbiennes et les teneurs en inhibiteurs naturels de laits inhibiteurs et non inhibiteurs de *S. aureus* provenant des deux centres.

7.1 Comparaison des flores microbiennes des laits

L'étude des flores microbiennes des laits inhibiteurs et non inhibiteurs a été réalisée par une double approche culture dépendante et culture-indépendante.

7.1.1 Description des flores des laits

Des analyses microbiologiques ont été réalisées par l'INRA d'Aurillac sur 21 laits inhibiteurs et 21 laits non inhibiteurs provenant de l'ITPLC (N=30) ou de Carmejeane (N=12) (liste des laits en Annexe 4.11). Ils ont été analysés, après décongélation à 25°C, grâce à l'utilisation de 8 milieux de culture différents. Les milieux utilisés ainsi que les références, les conditions d'incubation et les flores dénombrées sont décrits en Annexe 3.2.

Des profils microbiens ont été établis à l'aide de la méthode SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) selon le protocole défini Chapitre 3 § 6 et Annexe 3.4. Certains pics des profils V3 SSCP des laits ont été assignés à différentes espèces en fonction de leur co-élution avec les pics des profils V3 SSCP de souches de référence identifiées par séquençage.

Pour chaque profil SSCP, les aires A_i des différents pics P_i ont été mesurées, et les ratios $R_i=A_i/\Sigma A_i$ ont été calculés. Des Analyses en Composantes Principales ont été réalisées avec les données de dénombrement (Log ufc/ml) et les ratios des pics des profils V3 SSCP des laits.

Toutes les colonies isolées sur les boîtes de dénombrement du milieu de Turner à 30°C de 3 échantillons de laits ont été directement amplifiées, sans extraction de l'ADN, avec des amorces

spécifiques d'espèces permettant de différencier *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris* et *Lactococcus garvieae*. Les différentes amorces utilisées sont décrites en Annexe 3.3. Les PCR spécifiques ont été réalisées selon les protocoles décrits par Callon *et al.* (2004).

7.1.2 Quantification des espèces de lactocoques (*Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris* et *Lactococcus garvieae*) par PCR en temps réel

7.1.2.1 Mise au point des amorces et de la méthode

Conception des amorces spécifiques

Des couples d'amorces spécifiques ont été dessinés à l'aide du logiciel Clustawl pour les trois espèces *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris* et *Lactococcus garvieae* par alignement de plusieurs séquences d'ADNr 16S récupérées dans la database Genbank du NCBI. Pour ce faire, il a fallu tenir compte des impératifs en PCR quantitative : taille des amorces inférieure à 25 pb, composition en bases caractérisée par un pourcentage de dinucléotides GC compris entre 20 et 80%, absence de mésappariements (mismatch), différence de TM (Température de fusion) entre les deux amorces inférieure à 2°C, taille de l'amplicon inférieure à 200 pb, moins de 2 Guanine ou Cytosine dans les 5 derniers nucléotides en 3'. Les amorces ainsi dessinées ont ensuite été validées par le logiciel Primer Design.

Test de spécificité des amorces

La spécificité des 3 couples d'amorce a été testée vis-à-vis d'ADN de 20 souches de référence provenant de différentes bactéries lactiques isolées de produits laitiers (lactocoques, entérocoques, lactobacilles, leuconostocs et pédiocoques).

Seuil de détection et optimisation de la méthode

Des essais ont été réalisés pour les 3 espèces de lactocoques à partir de laits microfiltrés (10 ml) ensemencés avec l'espèce ciblée à des concentrations variant de 10^8 à 10^1 cellules/ml:

Les ADN des 10 ml de laits ensemencés ont été extraits par la méthode phénol/chloroforme puis ont été analysés en PCR quantitative (essais avec des ADN non dilués, dilués au 1/10 et au 1/100). La quantification a été réalisée en référence à une courbe standard obtenue par l'analyse d'une série de dilutions au 1/10^{ème} d'un ADN standard extrait d'une culture pure de concentration connue en lactocoques. L'efficacité de l'amplification a été optimisée en s'appuyant sur des essais conduits avec plusieurs niveaux de concentrations des amorces et de $MgCl_2$ et plusieurs niveaux de températures d'amplification pour la PCR.

Evaluation de la spécificité de la méthode

L'efficacité de la méthode pour détecter spécifiquement et quantitativement l'ADN de *Lactococcus garvieae* a été testée. A cette fin, l'ADNr 16S de *Lactococcus garvieae* (G) a été mis en présence de proportions variables d'ADNr 16S provenant de différentes espèces bactériennes (*Enterococcus amnigenus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus equorum*, *Arthrobacter nicotianae* et *Chryseobacterium*). Les mélanges d'ADNr 16S ont ensuite été quantifiés en PCR quantitative avec les amorces de *Lactococcus garvieae*.

7.1.2.2 Analyse des laits et gels de lactofermentation par PCR quantitative

Les analyses ont porté à la fois sur les laits de mélange et les gels de lactofermentation issus de ces laits. Elles ont concerné 21 laits inhibiteurs et 18 laits non inhibiteurs (liste des laits en Annexe 4.11 hors laits I28, I15 et C6 non étudiés).

L'ADN total des laits et des gels a été extrait sur un volume de 10 ml de lait ou de gel par la méthode phénol/chloroforme décrite par Callon *et al.* (2007). Les ADN extraits ont ensuite été purifiés sur colonne par l'utilisation d'un kit de purification (QI AMP DNA mini kit) selon les instructions du fabricant. Ils ont été analysés en PCR quantitative avec les 3 couples d'amorces pour la quantification de *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris* et *Lactococcus garvieae*. L'amplification de l'ADN a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant 5 µl d'ADN, 2mM de MgCl₂, 0.2 µM de chaque amorce, 0.2 µM du mix dNTP, tampon Sybr Green 1X et 5U/µl de polymérase Ampli Taq Gold. Le programme d'amplification comportait une dénaturation initiale 10' à 95°C suivie de 45 cycles avec 15s de dénaturation à 95°C, 1' d'hybridation à 61°C. Chaque échantillon a été analysé en double au sein d'une analyse et les analyses ont été répétées 2 fois pour chaque couple d'amorces.

7.2 Teneurs en composés antimicrobiens naturels

La détermination des teneurs en composés antimicrobiens naturels du lait a été effectuée :

- dans des laits jugés inhibiteurs ou non inhibiteurs de la croissance de *Staphylococcus aureus* après test de lactofermentation ;
- dans les laits mis en fabrication en vue d'une transformation de type lactique ou présure, en 2006.

Les méthodes d'analyse employées sont décrites Chapitre 3 § 7.

Le dosage du système lactopéroxydase a été réalisé dans les laits de 2004, 2005 et 2006. Celui de la lactoferrine a été effectué dans les échantillons collectés en 2004 jugés les plus inhibiteurs ainsi que dans les laits ayant servi aux fabrications en 2006.

B. Résultats

1 Identification des laits de troupeaux présentant un potentiel inhibiteur vis-à-vis de *S. aureus*.

1.1 Première série de lactofermentations : étape de prospection initiale

Cinquante cinq laits sélectionnés dans 4 entreprises d'après leurs bons résultats au cours des années précédentes ont été testés en lactofermentations (10 à Carmejane et 45 à l'ITPLC),

1.1.1 Evaluation des conditions expérimentales

La taille de l'inoculum peut varier sensiblement selon le centre (ITPLC ou Carmejane) et la série de tests réalisée (ensemble des laits prélevés et analysés un jour donné) (Tableau 4). En revanche, il n'a pas été mis en évidence d'effet significatif du centre ou de la zone de collecte sur le niveau de contamination initial des laits.

Tableau 4 : Taille de l'inoculum employé (dénombrement en ufc/ml) selon le centre expérimental

Taille de l'inoculum (UFC/ml)	ITPLC	Carmejane
Effectif	45	10
Moyenne	1,16.10 ²	6.10 ¹
Minimum	4,85.10 ¹	1.10 ¹
Maximum	1,90.10 ²	1,04.10 ²

Les conditions expérimentales ont été évaluées au travers de la croissance de la souche marquée inoculée dans les laits G (1 lait G par série de laits testés) (Figure 5). En l'absence d'acidification et de flore naturellement présente, la concentration en *S. aureus* peut atteindre des niveaux supérieurs à 10^8 UFC/ml à 24h. Dans l'ensemble, les courbes de croissance sont très proches (malgré une légère variabilité des profils de courbes établis en 24 heures). Elles traduisent la reproductibilité des conditions expérimentales. Seule une courbe de croissance a été considérée comme atypique. La série associée, correspondant qui plus est à des laits très contaminés en souches natives, a été écartée pour le choix des laits potentiellement inhibiteurs.

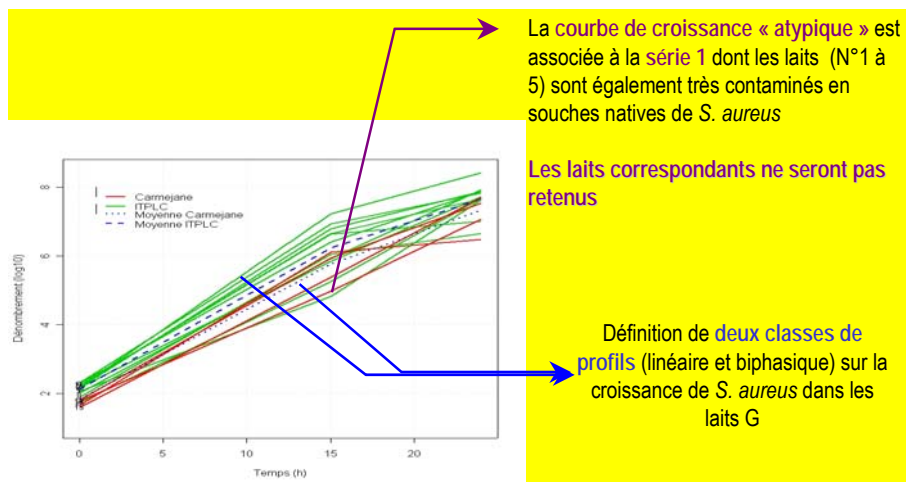


Figure 5 : Courbes de croissance de la souche de *S. aureus* marquée dans les laits G

1.1.2 Evaluation du potentiel inhibiteur vis-à-vis des souches natives de *S. aureus*

En l'absence d'inoculation

La distribution des niveaux de contamination des laits en souches natives à T0 et les pentes de croissance (T final – T0) obtenues en l'absence d'inoculation sont présentées figure 6.

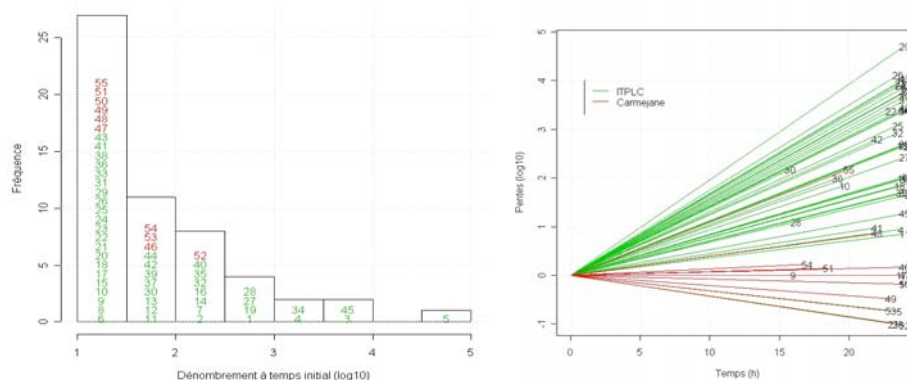


Figure 6 : Croissance des souches natives de *S. aureus* dans les laits non inoculés

On observe déjà à ce stade un potentiel inhibiteur de certains laits vis à vis des souches natives de *S. aureus*.

Tableau 5 : Dénombrement des souches natives (log10) de *S. aureus* dans les laits non inoculés en début et en fin de lactofermentation

Dénombrement (log10)	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Temps initial	55	1,72	0,85	1,0	4,63
Temps final	55	3,74	1,67	0,0	6,57

Lors d'inoculation par une souche marquée

Dans la majeure partie des cas, les souches natives ne sont pratiquement plus présentes à T final (Tableau 6, Figure 7). Seul un petit nombre de laits (5) présente une croissance de ces souches.

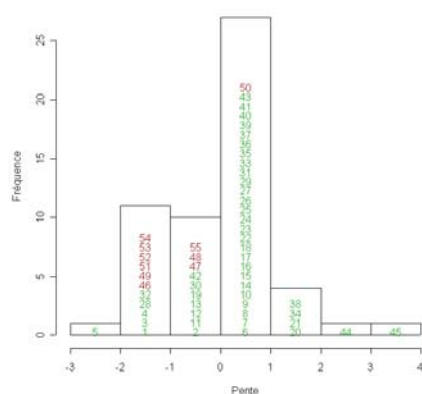


Tableau 6 : Dénombrement des souches natives (log10) de *S. aureus* dans les laits inoculés

Dénombrement (log10)	N	Moy.	Ect.	Min.	Max
Temps initial	55	1,72	0,86	1,0	4,63
Temps intermédiaire	46	0,18	0,56	-0,98	2,54
Temps final	55	0,25	0,52	-0,83	2,67

Figure 7 : Distribution des laits selon la croissance des souches natives de *S. aureus* dans les laits inoculés

N : Effectif ; Moy : moyenne ; Ect. : Ecart-type ; Min. : minimum ; Max. : maximum

Non discriminante, la croissance relative des souches natives en cas d'inoculation n'a pas pu être retenue pour apprécier le potentiel inhibiteur des laits testés.

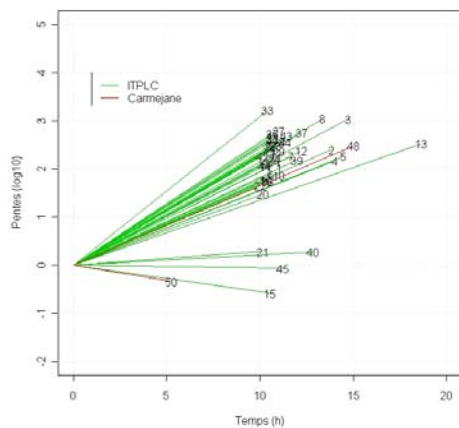
1.1.3 Evaluation du potentiel inhibiteur vis-à-vis de la souche marquée de *S. aureus*

Au temps initial, le dénombrement moyen (log10) de la souche marquée est de 1,97 ce qui est proche de l'objectif souhaité de 100 ufc/ml pour le niveau d'inoculation (Tableau 7).

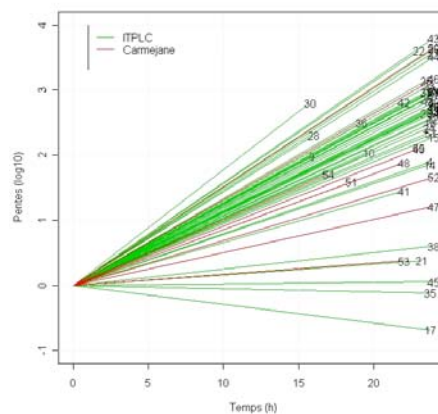
Tableau 7 : Dénombrement de la souche marquée (log10) de *S. aureus* dans les laits inoculés

Dénombrement (log10)	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Temps initial	55	1,97	0,21	1,00	2,28
Temps intermédiaire	46	4,14	0,83	1,15	5,34
Temps final	55	4,32	1,08	1,00	5,92

La croissance de la souche marquée a été évaluée en mesurant les pentes (delta log (SAR) / delta T) entre T intermédiaire et T initial, entre T final et T intermédiaire et enfin entre T final et T0 (Figure 8).



(a)



(b)

Figure 8 : Evolution de la croissance de la souche inoculée dans les laits inoculés à temps intermédiaire (a) et à temps final (b)

1.1.4 Evaluation du potentiel inhibiteur vis-à-vis de l'ensemble des souches de *S. aureus*

Des Analyses en Composantes Principales ont été réalisées afin de déterminer le comportement relatif des laits vis à vis des souches natives et marquée aux différents temps de la lactofermentation.

Parmi les laits potentiellement inhibiteurs, plusieurs cas de figures correspondant à des cinétiques de croissance différentes des souches de *S. aureus* sont mis en évidence (Figures 6 et 8) :

- une augmentation de la concentration en *S aureus* à temps intermédiaire puis une diminution pour atteindre à T final une concentration inférieure ou égale à celle observée au temps initial (exemple du lait 17) ;
- une légère croissance observée au temps final (exemple du lait 15) ;
- une quasi absence de croissance (exemple du lait 21).

Les laits ont été classés selon les croissances relatives des souches natives ou marquée (Figure 9) de manière à sélectionner ceux susceptibles d'être les plus intéressants (Tableau 8).

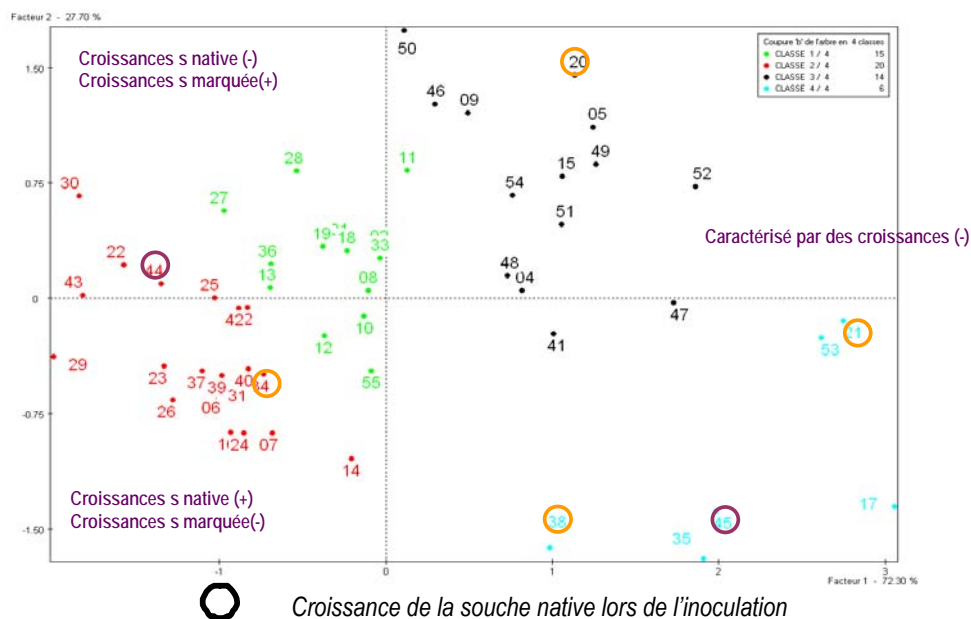


Figure 9 : Classification des croissances de *S. aureus* obtenues à Temps final (souches natives sans inoculation et souche marquée après inoculation)

Tableau 8 : Classement des laits (mentionnés par leurs numéros de code) en fonction de la croissance des souches de *S. aureus* et de l'expression de leur potentiel inhibiteur

Laits jugés inhibiteurs vis à vis de :	Expression à :	ITPLC			Carnejane	
Souches natives (laits non inoculés)		20	21	5	52	53
		9	15	17	49	
Souche marquée	Entre T0 et T intermédiaire		15			
		45	21	40	50	
	Entre T0 et T final	17		35	53	
		21	45	38	47	52
	Entre T intermédiaire et T final	17	35	38	48	
		8	28	41		

Ainsi, parmi les 55 laits testés, six *a minima* peuvent être considérés comme présentant un potentiel inhibiteur du développement de *S. aureus*, polyvalent de surcroît pour 4 d'entre eux (action sur les souches natives et sur la souche inoculée). Il s'agissait d'une étape clé de l'étude qui atteste, pour la première fois formellement, de l'existence de laits ayant naturellement une capacité d'inhibition vis-à-vis de *S. aureus*.

Les laits considérés comme inhibiteurs (par comparaison aux autres laits testés dans les mêmes conditions) autorisent généralement une croissance de *S. aureus* inférieure ou égale à 2 log sur une durée de 24 h à 27°C. Cette valeur a par la suite été considérée comme indicatrice pour qualifier le potentiel inhibiteur des laits.

1.2 Résultats des essais de lactofermentations conduits en 2005 et 2006

Au cours des essais conduits en 2005 et 2006, les laits de troupeaux d'une partie des exploitations précédemment ciblées ont fait l'objet d'une réévaluation de leur potentiel inhibiteur.

Ont été considérés :

- pour l'ITPLC :
 - laits inhibiteurs : 15, 17, 21 (testé en 2005 uniquement), 45 mais aussi 9, 20, 35 et 38 ;
 - laits non inhibiteurs : 27, 28, 32, 33 et mélanges des laits 27 et 28, 32 et 33 (2005 uniquement) ;
- pour Carnejane :
 - laits inhibiteurs : 49, 52, 53 ;
 - laits non inhibiteurs : 46, 48 et mélange des laits 46 et 48 (2005 uniquement).

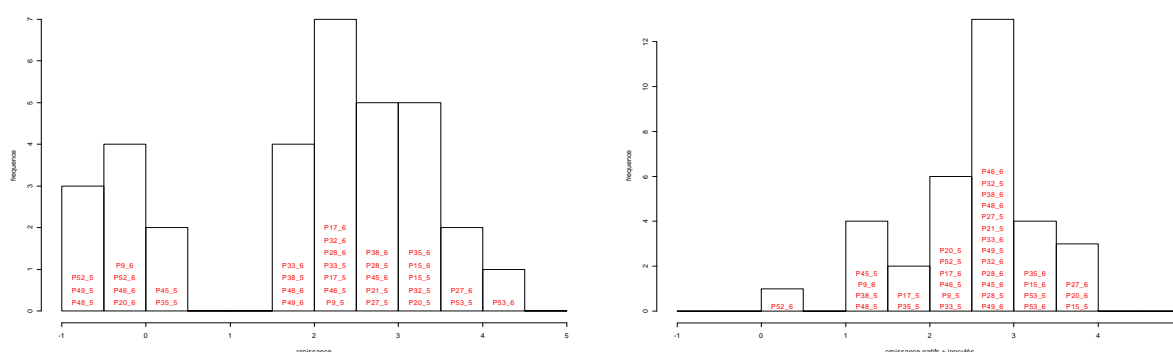
En rappelant les spécificités d'inhibition des laits inhibiteurs telles que définies en 2004 :

- 17, 21, 52 et 53 : inhibiteurs des souches natives et de la souche marquée (inoculée) ;
- 15 : inhibiteur des souches natives et de la souche marquée entre T0 et temps intermédiaire ;
- 9, 20 et 49 : inhibiteurs des souches natives ;
- 35, 38, 45 : inhibiteurs de la souche marquée ;
- 48 : non inhibiteur mais inhibiteur de la souche marquée uniquement entre temps intermédiaire (environ 15h) et temps final (environ 24h de lactofermentation).

En l'absence de contamination initiale par *S. aureus*, le potentiel inhibiteur vis-à-vis des souches natives n'a pas systématiquement pu être évalué. Cela a concerné les laits 48, 49 et 52 en 2005 et les laits 9, 20, 46 et 52 en 2006.

Le mélange de laits non inhibiteurs n'a pas présenté d'intérêt particulier par rapport à l'utilisation de laits de troupeaux individuels comme témoins. Selon les cas, les laits de petits mélanges présentent un comportement inhibiteur moyen par rapport à celui des deux laits le constituant (mélange des laits 32 et 33), permettent une croissance accrue de *S. aureus* comparativement aux deux laits pris séparément (mélange des laits 27 et 28) ou, au contraire, deviennent inhibiteurs (dans le mélange des laits 46 et 48, phénomène induit vraisemblablement par le lait 48 devenu inhibiteur à temps intermédiaire).

Le comportement des laits en terme d'inhibition s'est avéré variable au cours du temps. Les croissances relatives des souches natives et de l'ensemble des souches de *S. aureus* entre T initial et T final obtenues au cours des différents essais de 2005 et 2006 sont présentées graphiquement Figure 10.



(Pxx_5 indique le lait xx en 2005 et Pxx_6 indique le lait xx en 2006)

Figure 10 : Croissance des souches natives (a) et de l'ensemble des souches de *S. aureus* (b) entre T0 et T final ($\Delta\log_{10}$) au cours des lactofermentations réalisées en 2005 et 2006

Plusieurs laits considérés comme inhibiteurs (croissance des souches de *S. aureus* inférieure à 2 log) ne le sont plus : exemples des laits 15, 20 ou 53 (Tableau 9). Inversement, d'autres laits sont devenus inhibiteurs soit en 2005 soit en 2006 alors qu'ils ne l'étaient pas auparavant (Tableau 9) : exemples des laits 28 ou 33. Y compris lorsque les laits sont restés inhibiteurs, il est probable que les mécanismes en jeu aient différé selon les années comme le suggèrent les cinétiques de croissance des souches de *S. aureus* (Figures 11 à 13). A titre d'illustration, parmi les changements survenus entre 2004 et 2005, on observe :

- entre T0 et T intermédiaire : un changement notable de comportement des laits 15 et 21, inhibiteurs sur cette phase en 2004 (stagnation voire une décroissance de la population de *S. aureus* marquée) et présentant en 2005 parmi les plus fortes croissances de *S. aureus* (Figure 11) ;
- entre T intermédiaire et T final : la perte du potentiel inhibiteur du lait 17 pourtant important en 2004 pendant cette phase d'acidification (Figure 12) ;
- Entre T0 et T final : la perte du potentiel inhibiteur pour le lait 53 et dans une moindre mesure pour les laits 17 et 21 ; inversement, la mise en évidence d'un comportement inhibiteur pour le lait 33 (Figure 13).

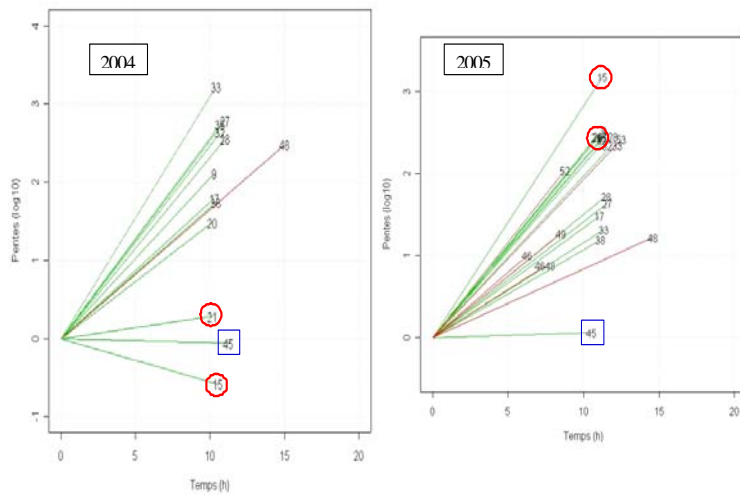


Figure 11 : Croissance de la souche inoculée de type C entre T_0 et T intermédiaire

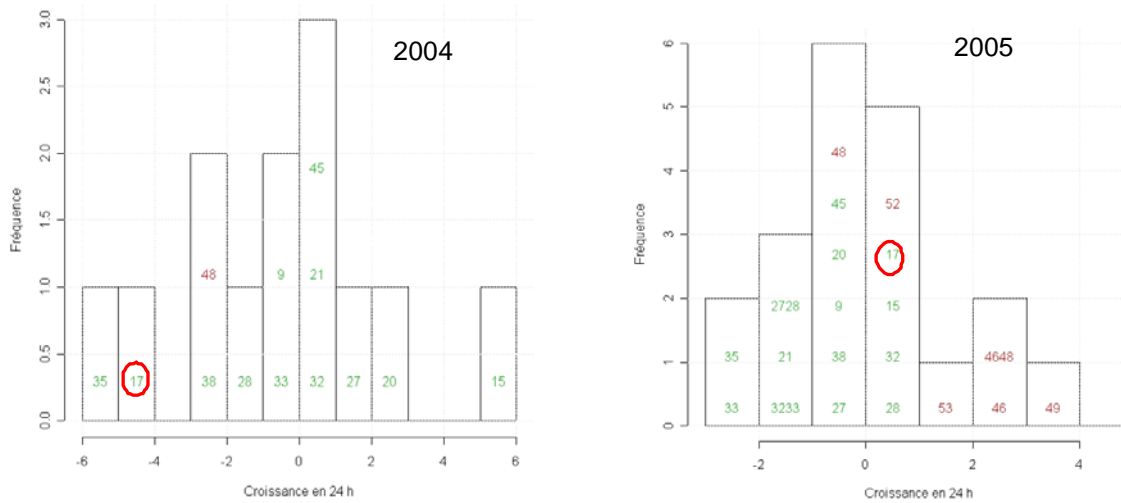


Figure 12 : Croissance de la souche inoculée de type C entre T intermédiaire et T final

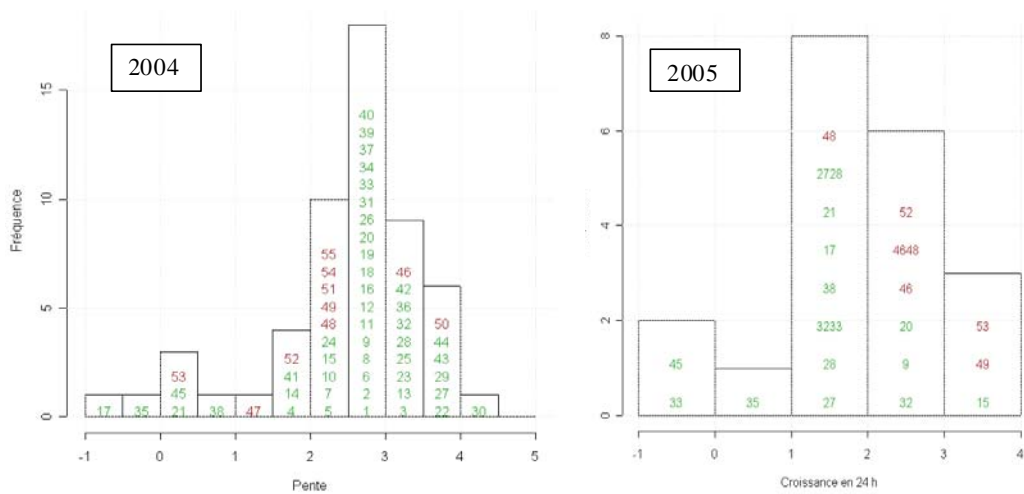


Figure 13 : Croissance de la souche inoculée de type C entre T_0 et T final

L'évolution entre 2004 et 2006 du comportement des laits en terme d'inhibition est synthétisée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Evolution entre 2004 et 2006 du comportement inhibiteur des laits testés vis-à-vis des souches de *S. aureus* natives et inoculée aux différents temps des lactofermentation

Lait N°	Laits inhibiteurs des souches natives			Laits inhibiteurs de la souche marquée inoculée									Laits non inhibiteurs		
	Entre T0 et T final			Entre T0 et T final			Entre T0 et T intermédiaire			Entre T intermédiaire et T final					
	2004	2005	2006	2004	2005	2006	2004	2005	2006	2004	2005	2006	2004	2005	2006
9	X				(X)	x					(X)	X			
20	X		?											X	X
49	X	X	X	X					X						
15	X						X							X	X
35		X		X	X	X				X	X				
38		(X)		X	(X)	X		(X)		X		X			
45	(X)	X		X	X	X	X	X	X		X				
17	X			X	(X)	X			X	X					
21	X			X	(X)		X				X				
52	X	X	?	(X)		(X)			X			X			
53	X			X		X								X	
27													X	X	X
28						(X)						X	X	X	
32													X	X	X
33			X		X			(X)			X	X	X	X	
46			?										X	X	X
48		X	X		(X)			(X)	X	X			X		

Sur cette base, le choix des laits évalués par la suite en fabrication a pris en compte prioritairement les évolutions de croissance entre T0 et T final de la souche marquée et dans un second temps celles des souches natives. Parmi les laits jugés prometteurs, le lait 48 a néanmoins été écarté en raison des modifications majeures survenues conjointement dans l'exploitation dont il provenait : augmentation du cheptel, changement des conditions de logement et de traite.

Les laits retenus en vue de la réalisation des essais en transformation fromagère sont indiqués dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Choix des laits mis en fabrication en fonction des résultats issus des tests de lactofermentations de 2005 et 2006

Potentiel inhibiteur	Centre	2005	2006
Inhibiteurs	ITPLC	35 38 45 33	9, 28, 33
	Carmejane	49, 52	49, 52
Témoins non inhibiteurs	ITPLC	32	15
	Carmejane	46	46

2 Evaluation de la stabilité du potentiel inhibiteur des laits au cours du temps

2.1 Typologie des modalités de croissance des souches de *S. aureus*.

Le premier plan factoriel de l'ACP conduite à partir des variables « croissance de la souche inoculée entre T₀ et T_{final} » et « croissance des souches natives entre T₀ et T_{final} » est décrit Figure 14. L'axe 1

discrimine les croissances élevées des croissances faibles. L'axe 2 discrimine la croissance des souches natives de celle de la souche inoculée.

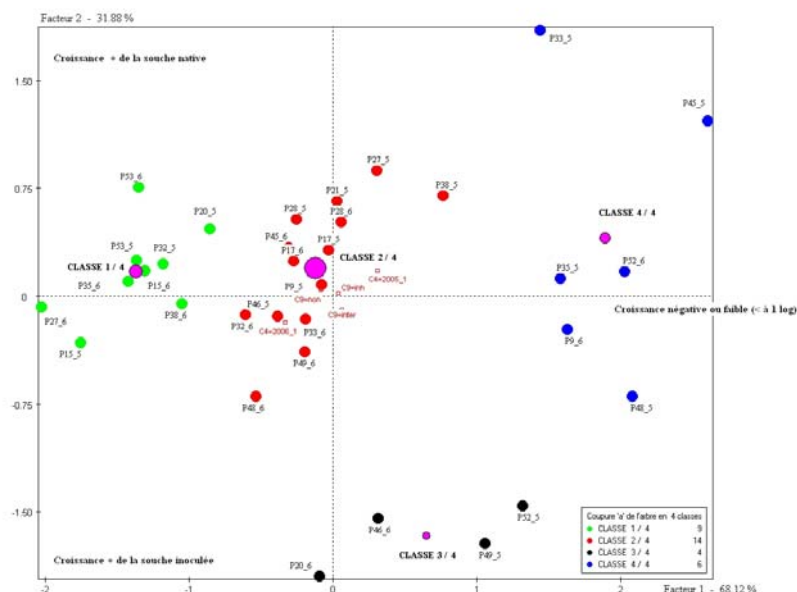


Figure 14 : Individus actifs et positions relatives des modalités illustratives et des classes dans le premier plan factoriel de l'ACP.

Quatre catégories de laits peuvent être distinguées :

- ceux ayant présenté des croissances élevées des souches natives comme de la souche inoculée (classe 1) ;
- ceux ayant présenté des croissances « intermédiaires » des souches natives et de la souche inoculée (classe 2) ;
- ceux ayant présenté des croissances faibles des souches natives mais élevées en ce qui concerne la souche inoculée (classe 3) ;
- ceux ayant présenté des croissances faibles des souches natives comme de la souche inoculée (classe 4).

Les caractéristiques des classes sont précisées Tableau 11 et illustrées Figures 15 et 16.

Tableau 11 : Croissances moyennes (en \log_{10}) des souches natives et inoculée entre T_0 et T_{final} selon les classes

	Classe	Effectif	Moyenne	Maximum	Médiane	Minimum
Souche inoculée	1	9	2,98	3,60	2,92	2,42
	2	14	2,10	3,00	2,14	1,14
	3	4	2,86	3,56	2,81	2,25
	4	6	0,57	1,20	0,81	-0,48
	Total	33	2,15	3,60	2,39	-0,48
Souches natives	1	9	3,50	4,09	3,45	2,95
	2	14	2,24	2,73	2,33	1,72
	3	4	-0,48	0,00	-0,48	-0,95
	4	6	0,38	2,34	0,21	-0,95
	Total	33	1,92	4,09	2,34	-0,95

2.2 Evaluation de l'adéquation entre statut inhibiteur des laits et croissance de *S. aureus* en 2004

Une analyse de variance conduite sur les données de 2004 a permis d'évaluer dans quelle mesure le statut inhibiteur des laits pouvait ou non décrire les croissances des souches natives et inoculée au cours des tests de lactofermentation (entre T initial et T final).

Le statut pris en compte comporte quatre modalités et permet de répartir les laits étudiés de la manière suivante :

- Laits inhibiteurs des souches natives et inoculée : 15, 17, 21, 52, 53 ;
- Laits inhibiteurs de la souche inoculée : 35, 38, 45 ;
- Laits inhibiteurs des souches natives : 9, 20, 49 ;
- Laits non inhibiteurs : 27, 28, 32, 33, 46, 48.

Les croissances des souches de *S. aureus* pour chacune des catégories de laits sont présentées Figures 15 et 16.

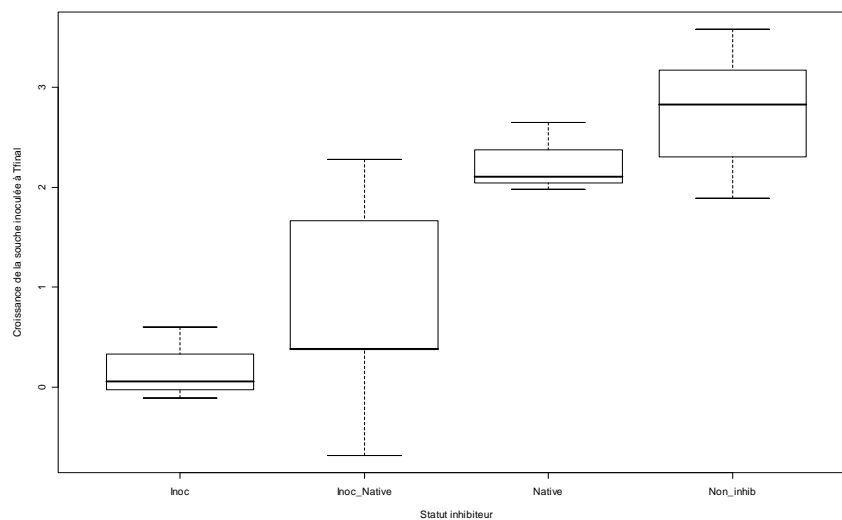


Figure 15 : Croissance de la souche inoculée en 2004 selon le statut des laits

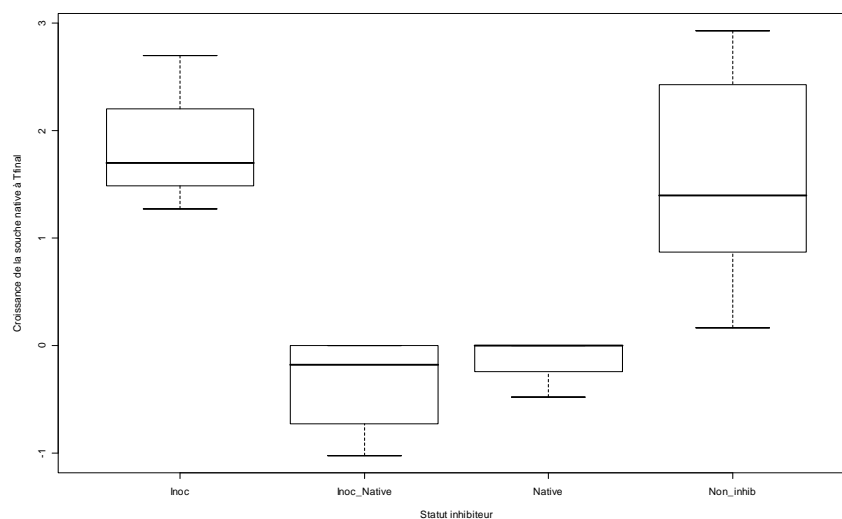


Figure 16 : Croissance des souches natives en 2004 selon le statut des laits

La part de variance expliquée par le modèle est de 70 % pour la croissance de la souche inoculée et de 69 % pour celle des souches natives. Dans ce contexte, il paraît licite d'appliquer le même modèle d'analyse aux données obtenues ultérieurement en 2005 et 2006.

2.3 Evaluation du caractère prédictif du statut inhibiteur des laits défini en 2004 sur les croissances de *S. aureus* observées ultérieurement

En appliquant le modèle d'analyse précédent aux résultats de 2005 et 2006, on constate que la part de variance expliquée n'est plus que de 7 % pour la croissance de la souche inoculée et de 9 % pour celle des souches natives.

L'analyse confirme les variations importantes du potentiel inhibiteur au cours du temps. Il n'est de fait pas possible d'ajuster les croissances des souches de *S. aureus* natives et inoculée à partir du statut des laits défini en 2004. Ce statut ne présente pas de caractère prédictif et ne permet pas de présager des croissances de *S. aureus* ultérieures.

3 Relation entre les caractéristiques et l'aptitude à l'acidification des laits et leur potentiel inhibiteur

3.1 Incidence des caractéristiques des laits sur leur potentiel inhibiteur

3.1.1 Incidence des caractéristiques physico-chimiques des laits sur l'expression de leur potentiel inhibiteur

Les caractères physico-chimiques et microbiologiques classiquement étudiés sur les laits (IgG, cellules, FMAR, MP, MG, lipolyse) n'ont pas permis la discrimination des laits inhibiteurs en conditions de lactofermentation.

3.1.2 Historique de contamination des laits et potentiel inhibiteur

Dans le contexte d'évolution du potentiel inhibiteur au cours du temps et dans la mesure où l'historique de la contamination en *S. aureus* des laits de tank avait constitué un critère d'élection des laits testés, il est apparu intéressant de vérifier si les laits jugés intéressants en 2004 et, à ce titre, réévalués en 2005 et/ ou 2006, répondaient toujours aux critères de choix initiaux.

Un même niveau de contamination en *S. aureus* a été observé d'une année à l'autre pour les laits 9, 20 et 38 (Annexe 4.3). Le lait 38, et dans une moindre mesure le 9, ont gardé leur potentiel (moyennement) inhibiteur contrairement au 20. Le lait 21 présente quant à lui des niveaux de contamination très élevés en 2005 ; or il a perdu son potentiel inhibiteur. On peut en dire de même pour le lait 53. La qualité du lait 35 s'est en revanche améliorée et le potentiel inhibiteur s'est parallèlement renforcé. Pour le lait 33, les niveaux de contamination par *S. aureus* sont faibles depuis 2003 (aucun dépassement du seuil de 200 ufc/ml).

Ainsi, sur les critères de sélection définis pour le choix des laits inhibiteurs testés en 2004, au moins deux laits n'auraient par exemple plus été retenus en 2005 : 21, 45 (au moins 3 dépassements du seuil de 200 ufc/ml et au moins un dépassement de 500 ufc/ml). Dans le cas du lait 45, il semble qu'une contamination importante en début de campagne (mammites cliniques) n'ait pu être contrôlée par la suite.

Dans l'ensemble, il semblerait que les potentiels inhibiteurs évalués en lactofermentation (24h à 27°C) soient associés à des niveaux faibles de contamination des laits (9 à 30 ufc/ml). De même, les laits fortement non inhibiteurs (27, 28 et 32) semblent présenter des niveaux de contamination plus élevés (dépassant souvent le seuil de 200 ufc/ml) non attribuables à des incidents ponctuels : présence régulière des *S. aureus* (moyenne géométrique de 60 à 120 ufc/ml). Suite à ces observations, il est difficile de savoir si les niveaux de contamination des laits sont la résultante d'une évolution de leur potentiel inhibiteur ou si, en cas de contamination élevée (généralement liée à la présence de quelques individus excréteurs) et au delà d'un certain seuil, le potentiel inhibiteur ne peut plus être mis en évidence.

3.2 Incidence de l'aptitude à l'acidification des laits sur leur l'expression de leur potentiel inhibiteur

Des profils d'acidification très différents (Figure 17) peuvent être observés pour des laits considérés, au vu des tests de lactofermentation, comme inhibiteurs.

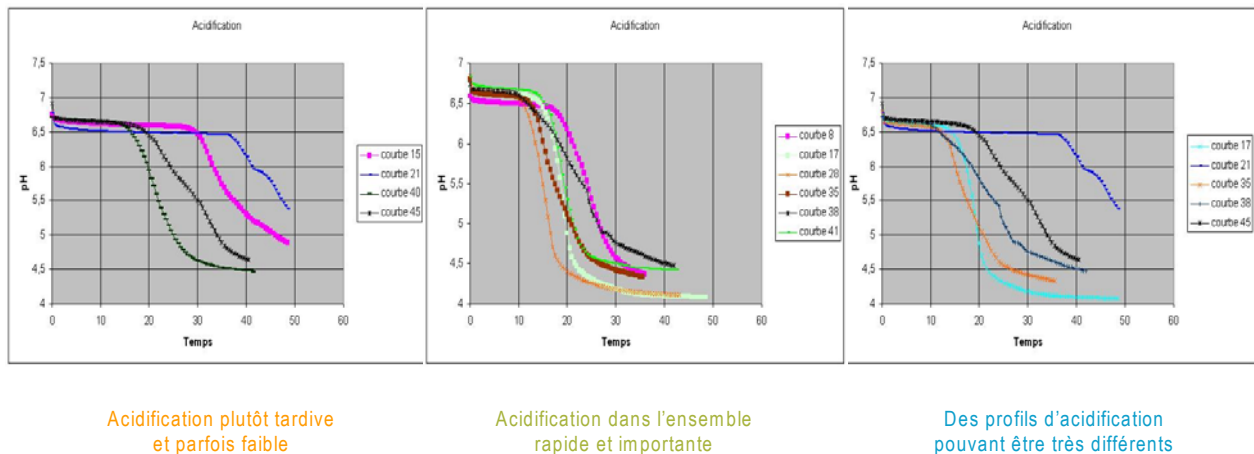


Figure 17 : Courbes d'acidification de laits jugés comme potentiellement inhibiteurs :

Entre T intermédiaire et T initial

Entre T final et T intermédiaire

Entre T final et T initial

Il est donc probable que le potentiel inhibiteur exprimé corresponde à des mécanismes d'inhibition très différents selon les laits.

L'étude du rôle de l'aptitude à l'acidification dans l'expression de ce potentiel inhibiteur a été réalisée à partir des données acquises lors des tests de lactofermentation de 2004 à 2006. Elle a reposé sur la modélisation préalable des courbes d'acidification et la définition de classes de profils.

3.2.1 Modélisation des courbes d'acidification

L'analyse en composantes principales a concerné l'ensemble des courbes d'acidification pour lesquelles une modélisation a été possible.

Le premier plan factoriel (Figure 18) restitue 75 % de l'information contenue dans les données. Le premier axe oppose principalement les courbes ayant des valeurs élevées pour le paramètre M (temps écoulé lorsque la variation de pH atteint la moitié de la valeur maximale) à celles ayant des valeurs élevées pour le paramètre c (appréciation de la pente de la courbe à l'origine). L'axe 2 forme un gradient de valeurs pour le paramètre a (variation de pH maximale).

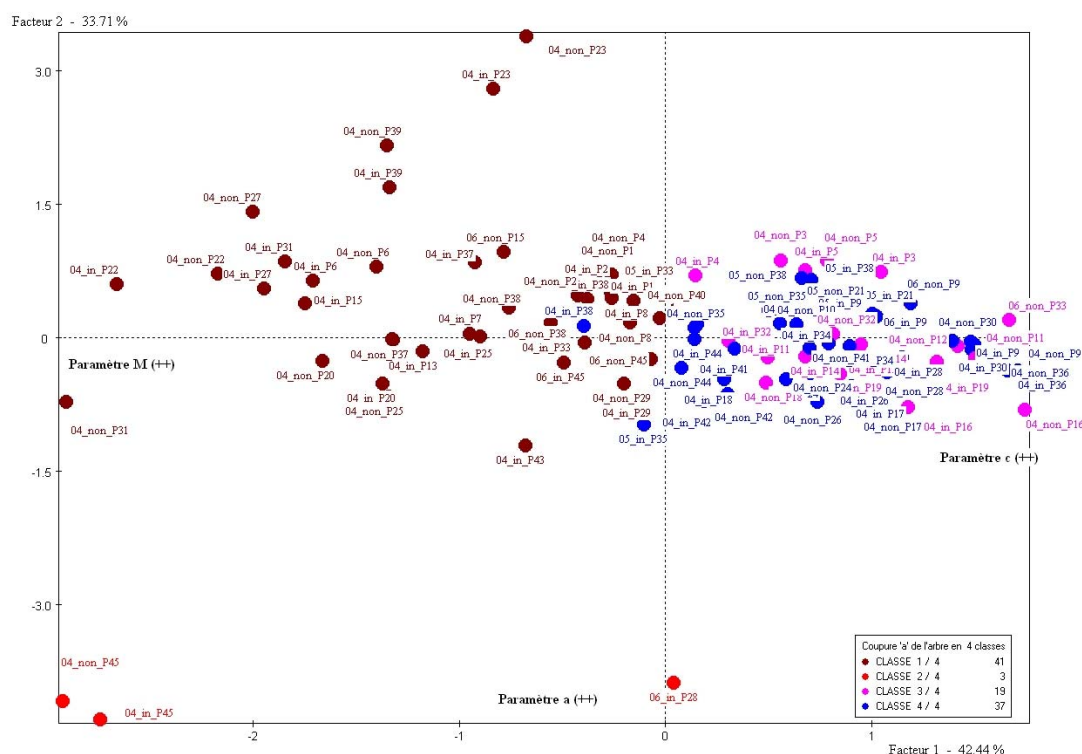


Figure 18 : Individus actifs et positions relatives des classes dans le premier plan factoriel de l'ACP conduite sur les cinétiques d'acidification des laits

La classification sur facteurs a permis de définir 4 groupes, dont un composé uniquement de trois individus. La classe 1 présente une valeur de paramètre M significativement plus élevée que la moyenne générale et des valeurs a et c significativement plus faibles. La classe 2 a des valeurs de M et a significativement plus élevées. La classe 3 a une valeur de c plus élevée et la classe 4 a une valeur de M plus faible (tableau 17, Figure 19).

Seuls 3 laits ont présenté des différences de classement entre l'acidification du lait inoculé et celle du lait non inoculé (laits 4, 18 et 38 en 2004).

Tableau 12. Pour chaque classe issue de la partition des courbes d'acidification, moyennes des variables continues contribuant à leur caractérisation

	Moyennes des paramètres de modélisation		
	a	M	c
Classe 1	2,10	24,55	4,21
Classe 2	3,91	30,51	-
Classe 3	-	-	8,33
Classe 4	2,46	17,79	-
Moyenne générale	2,31	21,84	5,48

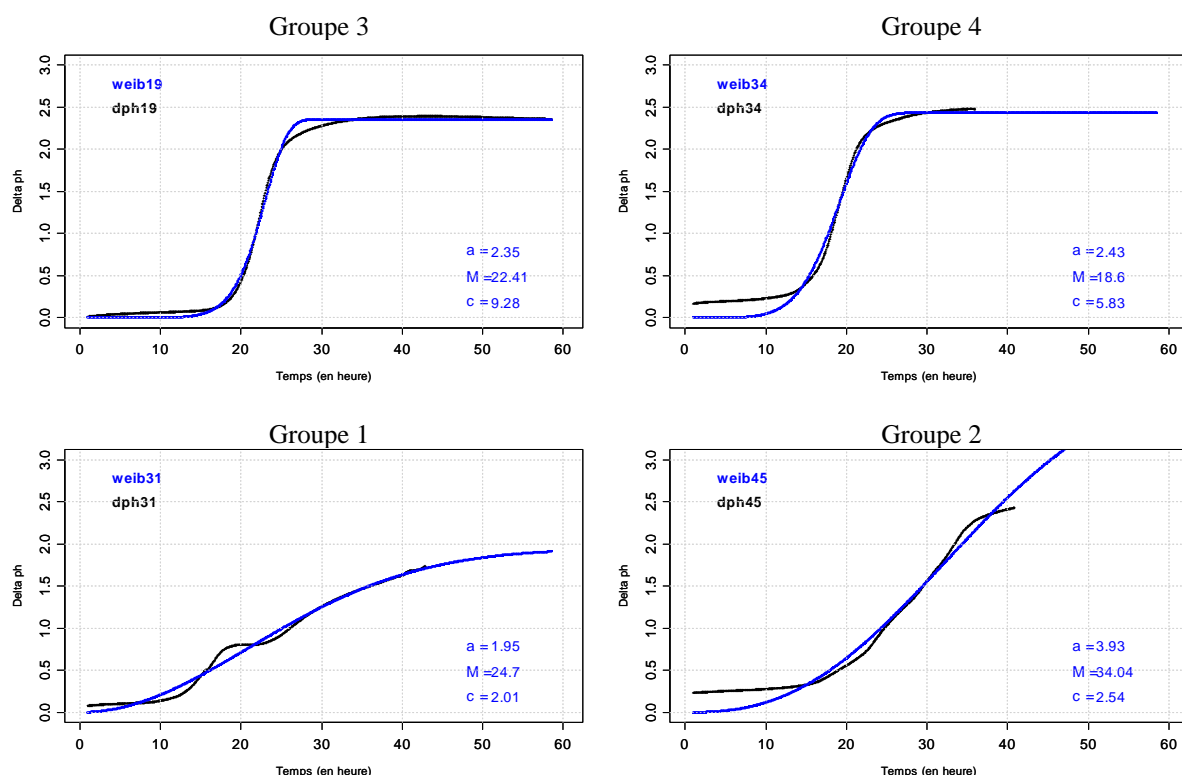


Figure 19 : Exemple de profil d'acidification pour chacun des groupes de la typologie (dph19= groupe 3 ; dph34= groupe 4 ; dph41= groupe 1 ; dph45= groupe 2 (4 laits inoculés de 2004))

Le tableau 13 montre la répartition des différentes classes de courbes d'acidification selon l'année d'étude. Il rend compte de la prédominance des classes 1 et 4.

Tableau 13. Répartition des profils d'acidification des laits inoculés (par classes) selon l'année (laits inoculés uniquement)

Année	Classes de profil d'acidification				Total
	1	2	3	4	
2004	18	1	9	15	43
2005	1			4	5
2006	2	1		1	4
Total	21	2	9	20	52

3.2.2 Incidence du profil d'acidification sur la croissance de la souche de *S. aureus* inoculée

La variabilité expliquée par le modèle est de 20%. Le profil d'acidification apparaît significatif pour expliquer la croissance de la souche inoculée à t_{final} ($p= 0,0059$). La croissance de la souche inoculée est moins importante pour la classe 4 de profils d'acidification (classe pour laquelle la variation de pH est la plus importante et où le temps pour obtenir $\Delta\text{pH}/2$ est le plus petit). La croissance la plus importante concerne la classe 1 où le ΔpH , contrairement aux autres classes, est inférieur à 2 (Tableaux 14 et 15).

Tableau 14 : Moyennes ajustées de la croissance de la souche de *S. aureus* inoculée selon le profil d'acidification des laits

	Profils d'acidification		
	Classe 1	Classe 3	Classe 4
Moyenne ajustée (log10)	2,75	2,64	1,83

Tableau 15 : Moyennes ajustées de la croissance de la souche de *S. aureus* inoculée selon le niveau de contamination initial en souches natives des laits

	Niveau de contamination initial des laits en souches natives		
	≤ 1 log	1 log < ≤ 2 log	> 2 log
Moyenne ajustée (log10)	2,49	2,43	2,30

3.2.3 Incidence du profil d'acidification sur la croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus*

La variabilité expliquée par le modèle est de 22%. Le profil d'acidification apparaît légèrement significatif pour expliquer la croissance des souches de *S. aureus* à t_{final} . ($p= 0,007$) (Tableau 16). La croissance totale des staphylocoques coagulase positive est beaucoup plus importante pour la classe 1 ($\Delta\text{pH}<2$ et temps d'obtention de $\Delta\text{pH}/2 >24\text{H}$) comparativement aux autres classes de profils d'acidification.

Tableau 16. Moyennes ajustées de la croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus* selon le profil d'acidification des laits

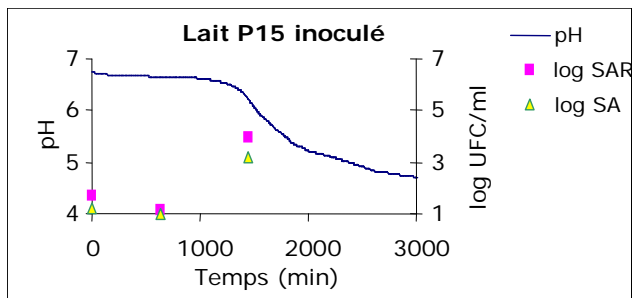
	Profils d'acidification		
	Classe 1	Classe 3	Classe 4
Moyenne ajustée (log10)	2,91	2,01	2,03

Tableau 17. Moyennes ajustées de la croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus* selon le niveau de contamination initial en souches natives des laits

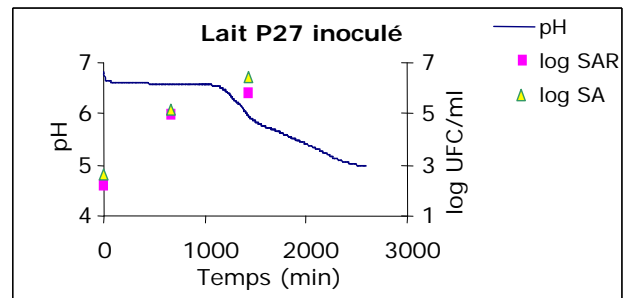
	Niveau de contamination initial des laits en souches natives		
	≤ 1 log	1 log < ≤ 2 log	> 2 log
Moyenne ajustée (log10)	2,22	2,55	2,18

L'analyse des données fait apparaître un effet faible mais significatif de l'acidification sur la croissance des souches de *S. aureus*. Globalement, les croissances de staphylocoques risquent d'être plus importantes en moyenne pour la classe 1 (laits s'acidifiant lentement et faiblement) et au contraire d'être minorées pour la classe 4 (laits s'acidifiant le plus).

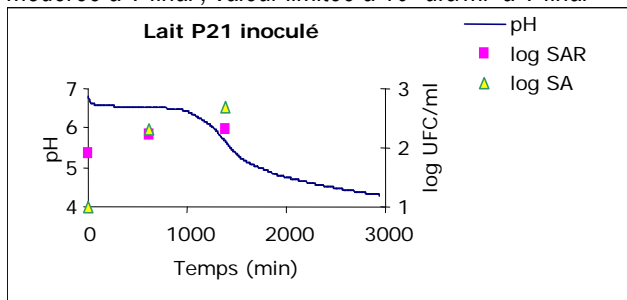
Pour autant, seuls 20% de la variabilité sont expliqués par le modèle. Aucun profil type d'acidification ne peut donc être associé spécifiquement au caractère inhibiteur des laits (Figures 20 et 21).



Lait 15 : retard de croissance de *S. aureus* puis croissance modérée à T final ; valeur limitée à 10^4 ufc/ml à T final



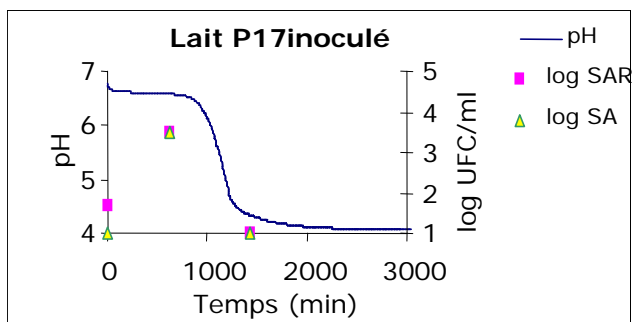
Lait 27 : Croissance marquée de *S. aureus* : 10^6 ufc/ml au bout de 24 heures



Lait P21 : croissance modérée de *S. aureus* pendant l'ensemble de la lactofermentation

Log SAR : dénombrement (\log_{10}) de la souche de *S aureus* marquée
Log SA : dénombrement (\log_{10}) de l'ensemble des souches de *S aureus* (natives et marquée)

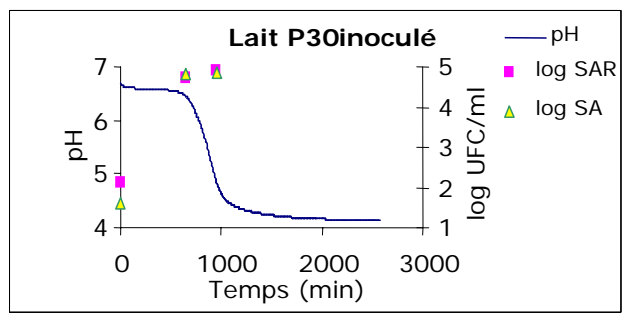
Figure 20 : Exemples de laits à acidification lente, présentant des comportements différents en terme de croissance des souches de *S. aureus*



Lait 17 : croissance limitée de *S. aureus* à T intermédiaire ($<10^4$ ufc/ml) suivie d'une forte décroissance

Log SAR : dénombrement (\log_{10}) de la souche de *S aureus* marquée

Log SA : dénombrement (\log_{10}) de l'ensemble des souches de *S aureus* (natives et marquée)



Lait 30 : croissance continue de *S. aureus*, un niveau de 10^5 ufc / ml étant obtenu à T final

Figure 21 : Exemples de laits à acidification rapide, présentant des comportements différents en terme de croissance des souches de *S. aureus*

Des laits intéressants en terme de comportement vis à vis de *S. aureus* ont été repérés au sein de chacune des classes de courbes d'acidification (Figure 17). Il est ainsi délicat de se fier uniquement aux profils d'acidification des laits pour repérer ceux qui seraient potentiellement inhibiteurs de *S. aureus*.

Chez certains laits, relativement rares, l'expression du potentiel inhibiteur s'oppose à leur pouvoir acidifiant : laits s'acidifiant sans montrer d'inhibition et inversement. Une analyse au cas par cas s'impose alors.

Par ailleurs, on a pu observer au cours du temps des évolutions tant du potentiel inhibiteur des laits que de leur capacité acidifiante. La figure 22 montre des exemples types de comportements des laits testés entre 2004 et 2005 :

- propriétés inchangées pour le lait 9 tant du point de vue de l'acidification que de l'expression du potentiel inhibiteur ;
- cinétique d'acidification inchangée pour le lait 53 devenu néanmoins non inhibiteur en 2005 ;

- potentiel inhibiteur inchangé pour le lait 49 mais cinétique d'acidification modifiée ;
- modification conjointe des deux critères pour le lait 21.

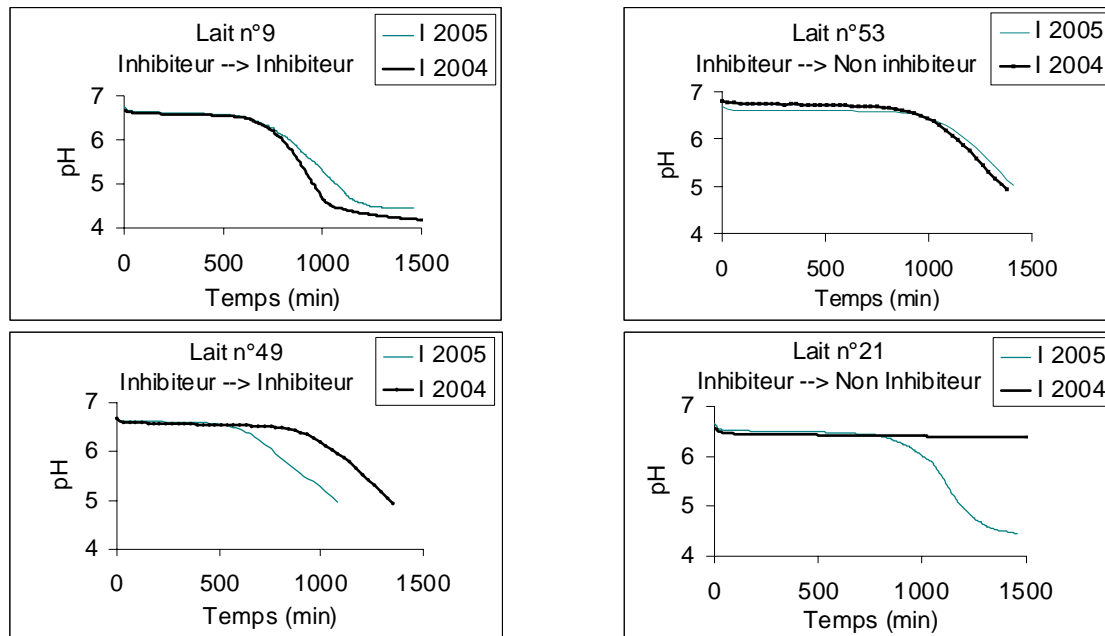


Figure 22 : Exemples d'évolution du potentiel inhibiteur et de l'activité acidifiante

Le tableau 18 synthétise les évolutions relatives de l'aptitude acidifiante et du potentiel inhibiteur des laits testés à la fois en 2004 et 2005.

Tableau 18 : Synthèse des résultats 2004-2005 relatifs aux cinétiques d'acidification et aux modifications de potentiel inhibiteur des laits vis à vis de *S. aureus*

Laits	Capacité acidifiante		Potentiel inhibiteur	
	Modifiée	Nature du changement dans la courbe d'acidification 2005	Modifié	Nature en 2005
9	Non		Non	Inhibiteur (moyen)
35	Non		Non	Inhibiteur
27	Non		Non	Non inhibiteur
48	Non		Oui	Inhibiteur (moyen)
20	Non		Oui	Non inhibiteur
53	Non		Oui	Non inhibiteur
38	Oui	Acidification plus précoce	Non	Inhibiteur
45	Oui	Acidification plus précoce	Non	Inhibiteur
49	Oui	Acidification plus précoce	Non	Inhibiteur
52	Oui	Acidification plus précoce	Non	Inhibiteur
28	Oui	Acidification plus tardive	Non	Non inhibiteur
32	Oui	Acidification plus tardive	Non	Non inhibiteur
46	Oui	Acidification plus précoce	Non	Non inhibiteur
33	Oui	Acidification plus précoce	Oui	Non inhibiteur
15	Oui	Acidification plus marquée	Oui	Non inhibiteur
21	Oui	Acidification plus marquée	Oui	Non inhibiteur
17	Oui	Acidification très tardive	Oui	Non inhibiteur

Au regard de ces observations, l'évolution des caractéristiques fonctionnelles des laits et en l'occurrence l'évolution des profils d'acidification ne semble pas constituer un indicateur des changements d'expression du potentiel inhibiteur.

4 Evaluation du potentiel inhibiteur des laits en transformation fromagère

4.1 Comportement inhibiteur des laits au cours des fabrications réalisées en 2005

Pour mémoire, ont été retenus :

- pour l'ITPLC :
 - les laits 35, 38 et 45 : inhibiteurs en 2005 et 2004 ;
 - le lait 33 : inhibiteur en 2005 mais pas en 2004 ;
 - le lait 32 : témoin non inhibiteur ;
- pour Carmejjane :
 - les laits 49 et 52 : inhibiteurs en 2005 et 2004 ;
 - le lait 46 : témoin non inhibiteur.

4.1.1 Niveaux de contamination et condition d'inoculation des laits testés

Des différences de contamination par *S. aureus* sont perceptibles (Tableau 19) d'un troupeau à l'autre, voire d'une région ou d'une zone de collecte à une autre. Les résultats obtenus mettent aussi en évidence la difficulté de maîtriser les niveaux d'inoculation en *S. aureus* et l'homogénéité dans les laits de fabrication. Compte tenu des différences de niveau d'inoculation observées entre les deux centres, les résultats des fabrications présure et lactique sont présentés au sein de chacun d'eux.

Tableau 19 : Contamination en *S. aureus* des laits avant et après inoculation à 100 ufc/ml (objectif)

Technologie	ITPLC					Carmejjane				
	Effectif	Moyenne	Ect	Min	Max	Effectif	Moyenne	Ect	Min	Max
Présure										
Avant inoculation	5	2,71	0,40	2,00	2,93	3	0,91	0,12	0,78	1,00
Après inoculation	5	2,35	0,24	2,00	2,64	3	1,13	0,13	1,00	1,40
Lactique										
Avant inoculation	5	1,59	0,70	1,00	2,52	3	0,91	0,12	0,78	1,00
Après inoculation	5	2,09	0,31	1,60	2,41	3	1,13	0,23	1,00	1,40

Ect : écart-type ; Min : minimum ; Max : maximum

4.1.2 Croissance de *S. aureus*

En fabrications de type présure

Les résultats des laits testés par le centre fromager de Carmejjane (Figure 23a) sont conformes à ceux obtenus en lactofermentation :

- Lait 46, choisi comme témoin non inhibiteur avec un pic de *S. aureus* à 4,5 log à J+1 ;
- Lait 49 avec les niveaux de *S. aureus* les plus faibles (3 log au pic à J+1) et une décroissance marquée de la population entre J+9 et J+15 ;
- Lait 52 intermédiaire par rapport aux deux autres laits.

Le lait 49 est caractérisé par une acidification plus rapide et plus marquée que les 2 autres laits (Annexe 4.4)

Dans les essais conduits par l'ITPLC, les différences de croissance de *S. aureus* entre laits présumés inhibiteurs (d'après les lactofermentations) et laits non inhibiteurs sont moins marquées (Figure 23b) que dans les essais conduits à Carmejane. Les laits 33, 35 et 38 semblent néanmoins autoriser des croissances de *S. aureus* légèrement moins prononcées (0,5 à 1 log en moins) que le lait témoin 32. Les cinétiques d'acidification ne permettent pas de différencier les laits sur la période T0 à J+9 (Annexe 4.4), exception faite du lait 45, caractérisé par une acidification plus rapide que les autres entre 3h et 17h (non montré).

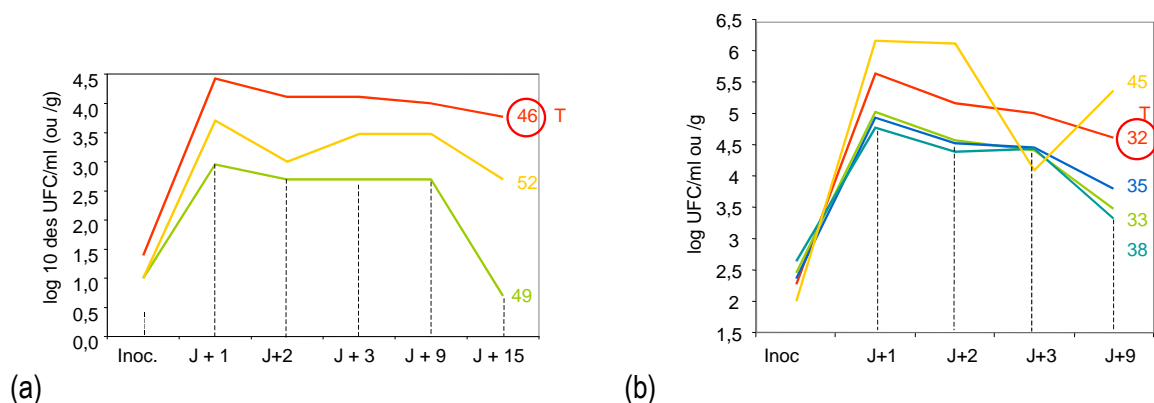


Figure 23 : Evolution de la population de *S. aureus* en transformation présure pour les laits testés à Carmejane (a) et l'ITPLC (b)

L'ensemble des essais en fabrication présure met en évidence un pic de croissance à J+1, les dénombrements de *S. aureus* diminuant légèrement ensuite jusqu'à J+9 puis de manière plus marquée entre J+9 et J+15

En fabrications de type lactique

Parmi les laits testés par le centre fromager de Carmejane (Figure 24a), le lait 49 apparaît là encore comme le plus inhibiteur : pic de croissance de *S. aureus* inférieur à celui des deux autres laits et obtenu plus tardivement.

Parmi les laits testés par l'ITPLC (Figure 24b), l'effet inhibiteur des laits 35 et 38 est plus marqué qu'en fabrication présure puisqu'à J+1, pour ces deux laits, la population de *S. aureus* est inférieure de 1 à 2 log à celle observée pour les autres laits.

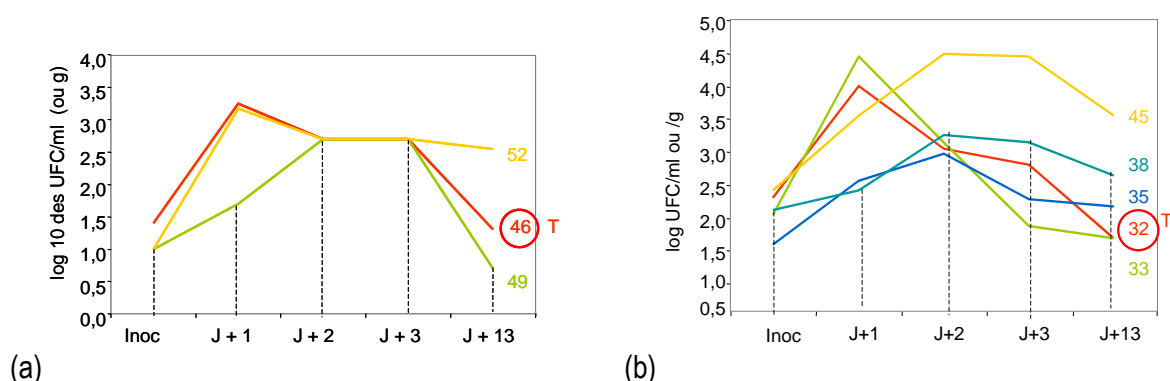


Figure 42 : Evolution de la population de *S. aureus* en transformation lactique pour les laits testés à Carmejane (a) et l'ITPLC (b)

Les différences de potentiel inhibiteur des laits ne semblent pas être liées à des comportements acidifiants différents (Annexe 4.5).

Le pic de croissance de *S. aureus* est obtenu soit à J+1 soit à J+2. Les laits considérés comme inhibiteurs (49 pour Carmejjane, 35 et 38 pour l'ITPLC) semblent freiner le développement de *S. aureus* au début du process fromager ce qui conduit à l'obtention d'un pic maximum à J+2, inférieur d'1 log environ à celui obtenu à J+1 par les laits témoins non inhibiteurs. Sur ce point, le lait 45 se distingue des autres avec un pic de *S. aureus* obtenu à J+2 à des niveaux comparables à ceux du lait 32 témoin non inhibiteur. Par la suite, les niveaux de *S. aureus* ne semblent pas évoluer entre J+2 et J+3. Entre J + 3 et J+13 (de l'entrée en séchoir jusqu'à 10 jours d'affinage) les niveaux de *S. aureus* restent constants ou décroissent.

4.1.3 Caractéristiques microbiologiques et physico-chimiques des laits mis en oeuvre

Caractéristiques microbiologiques des laits mis en oeuvre (Annexes 4.6 et 4.7)

Les niveaux de dénombrement en Flore Mésophile Aérobie Revivifiable (FMAR) sont très proches de 4 log pour l'ensemble des laits que ce soit à l'ITPLC ou à Carmejjane. Seule la FMAR des laits 32 et 33 est apparue plus faible lors d'une série de fabrications. En ce qui concerne les différentes flores lactiques, les populations peuvent varier d'un lait à l'autre mais aussi d'une semaine à une autre.

Ces données, très partielles, ne permettent pas de conclure quant à l'effet de flores spécifiques sur l'existence d'un potentiel inhibiteur.

Comparaison des compositions physico-chimiques des laits et fromages (Annexe 4.8)

Tous les laits ayant fait l'objet de déterminations IgG, présence d'inhibiteurs et indice de lipolyse, étaient en dessous des limites classiquement autorisées (application des mesures réglementaires et/ou des grilles de paiement du lait). Les compositions en matière grasse et matière protéique évoluent peu d'une semaine à l'autre, le lait 45 étant généralement moins riche que les autres.

Les variations observées concernant la composition des fromages (Annexe 4.8) sont directement imputables à la composition des laits et à leur aptitude à acidifier (d'où un égouttage des caillés et des extraits secs de fromages différents) mais ne semblent pas associées à des différences de potentiel inhibiteur.

4.2 Comportement inhibiteur des laits au cours des fabrications réalisées en 2006

À l'issue des essais en lactofermentation conduits en 2006, 5 laits ont été retenus comme potentiellement inhibiteurs (ITPLC : 9, 28, 33 et Carmejjane : 49 et 52) avec toutefois des résultats mitigés pour trois d'entre eux (laits 28, 33 et 49). Deux laits non inhibiteurs ont été conservés en tant que témoins (laits 15 pour l'ITPLC et 46 pour Carmejjane).

Comme dans les précédents essais conduits en 2005, la contamination initiale des laits testés à l'ITPLC est supérieure à celle de ceux collectés à Carmejjane (pas de contamination en souches natives mise en évidence) (Tableau 20). Ce faisant, les niveaux de contamination après inoculation atteignent près de 1000 ufc/ml pour les laits mis en fabrication à l'ITPLC contre seulement 100 ufc/ml à Carmejjane. Ces différences sont susceptibles d'influer sur l'expression du potentiel inhibiteur des laits.

Tableau 20 : Contamination en *S. aureus* des laits avant et après inoculation à 100 UFC/ml (objectif)

Technologie	ITPLC					Carnejane				
	Effectif	Moyenne	Ect	Min	Max	Effectif	Moyenne	Ect	Min	Max
Présure										
Avant inoculation	4	1,37	0,29	0,95	1,64	3	0,95	0,00	0,95	0,95
Après inoculation	4	2,96	0,05	2,92	3,03	3	1,92	0,07	1,85	1,98
Lactique										
Avant inoculation	4	1,42	0,59	0,54	1,78	3	0,95	0,00	0,95	0,95
Après inoculation	4	2,22	0,21	1,96	2,46	3	1,92	0,07	1,85	1,98

En fabrications de type présure

Parmi les laits testés, les laits 9, 49 et 52 apparaissent comme inhibiteurs confirmant ainsi les observations issues des tests de lactofermentation. Ce potentiel d'inhibition s'exprime toutefois de manière diverse. Ainsi peut on observer un écart de 1 log environ au pic de croissance de *S. aureus* (vraisemblablement situé à J+1) entre le lait témoin non inhibiteur 46 et le lait 49. Pour le lait 9, en revanche, le potentiel inhibiteur n'est pas perceptible à J+1 mais est marqué à partir de J+2 (Figure 43).

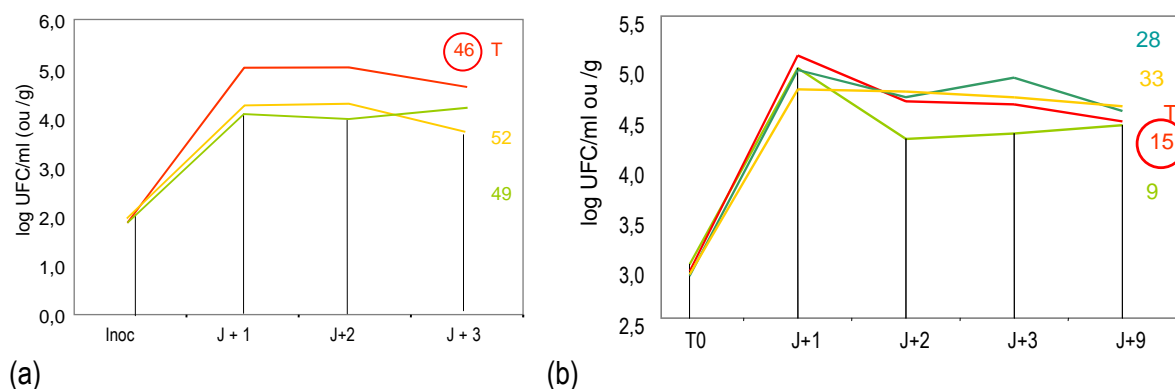


Figure 43 : Evolution de la population de *S. aureus* en transformation présure pour les laits testés à Carnejane (a) et l'ITPLC (b)

En fabrications de type lactique

En 2006, les cinétiques de croissance de *S. aureus* montrent l'obtention d'un pic à J+2. Elles confirment la décroissance de la population de staphylocoques coagulase positive au delà de J+3.

Parmi les laits évalués à Carnejane (Figure 44a), le lait 52 apparaît comme le plus inhibiteur et présente 0,5 log d'écart au pic de croissance de *S. aureus* avec le lait 46. Le lait 49 ne présente cette fois que 0,35 log d'écart avec le lait témoin. Parmi les laits évalués à l'ITPLC (Figure 44b), le lait 9 apparaît là encore comme le plus inhibiteur ce quel que soit le stade de fabrication. Le lait 28, semble également inhibiteur notamment à J+1.

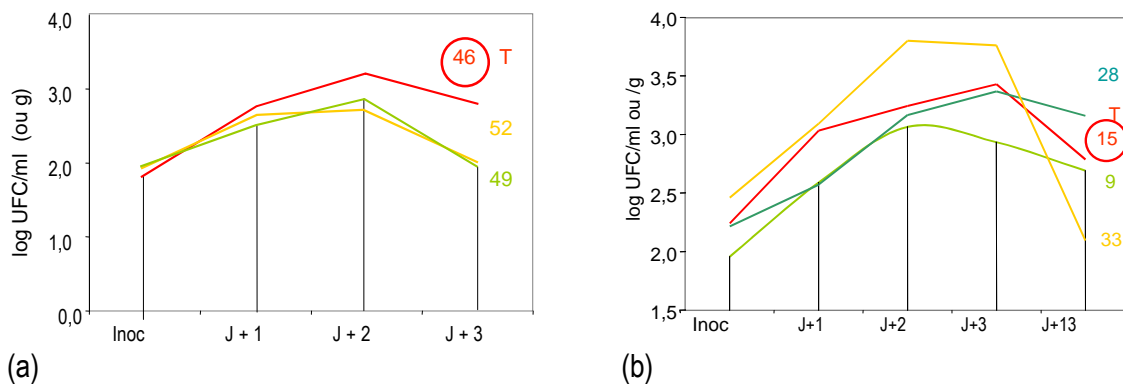


Figure 44 : Evolution de la population de *S. aureus* en transformation lactique pour les laits testés à Carmejane (a) et l'ITPLC (b)

4.3 Etude du caractère prédictif des lactofermentations pour estimer l'évolution de *S. aureus* dans les fromages

4.3.1 Analyse descriptive de la croissance de *S. aureus* 24 heures après inoculation

La croissance totale de *S. aureus* à J+1 est généralement inférieure à 2 log pour les fromages de type « lactique », et supérieure à 2 log pour les fromages de type « présure » (Figure 45). Pour prédire ces cinétiques de croissance, on ne dispose pour autant, au travers des tests de lactofermentation, que d'une information unique (Figure 45).

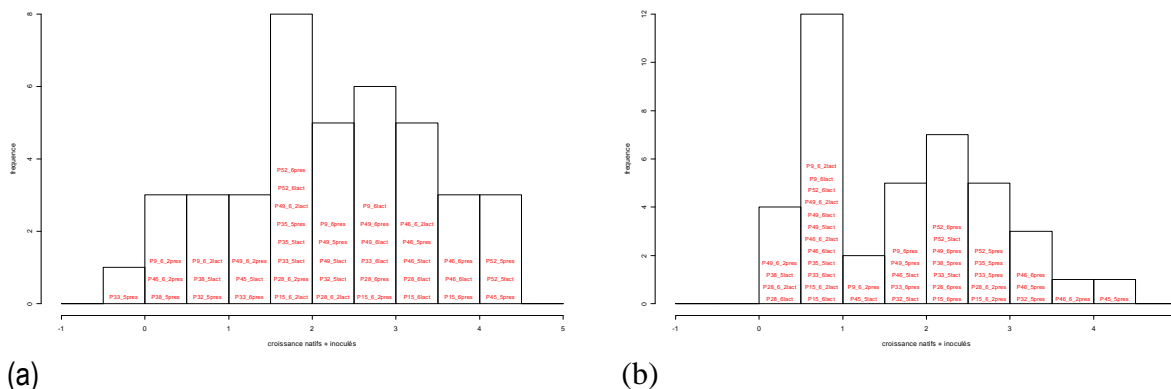


Figure 45 : Croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus*, 24 heures après inoculation (J+1) lors de lactofermentations (a) ou dans les fromages (b)

La relation entre croissance de *S. aureus* en lactofermentation et croissance en fabrication fromagère est présentée Figure 46 selon le type de technologie appliquée.

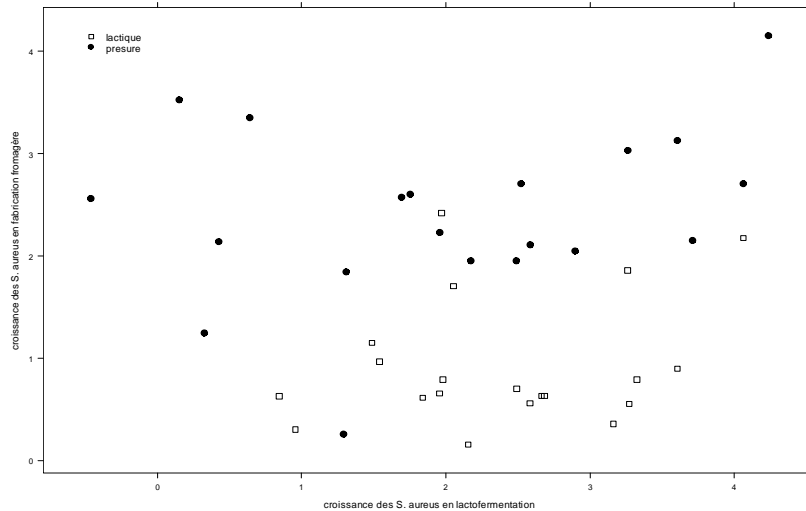


Figure 46 : Relation entre croissance de *S. aureus* en lactofermentation et croissance en fabrication fromagère par type de technologie.

4.3.2 Prédiction de la croissance dans les fromages

Le modèle posé pour étudier la croissance de *S. aureus* dans les fromages en fonction des résultats de lactofermentations ne permet d'expliquer que partiellement la variabilité observée (R^2 de 55%). Seule la technologie employée (lactique vs présure) présente un effet significatif ($P_{>F} = 0.01$). Après ajustement, la croissance de *S. aureus* atteint ainsi en moyenne 0,9 log en technologie lactique contre 2,4 en technologie présure.

La croissance de *S. aureus* observée en lactofermentations, ne permet donc pas de prédire précisément l'évolution enregistrée ultérieurement en fabrications et notamment les différences d'expression du potentiel inhibiteur en fonction du process. De fait, comme l'illustre la figure 47 à partir des données acquises à Carmejjane, les résultats des tests de lactofermentation, obtenus à 27°C sont quantitativement plus proches de ceux des fabrications « présure » que de ceux des fabrications « lactiques ».

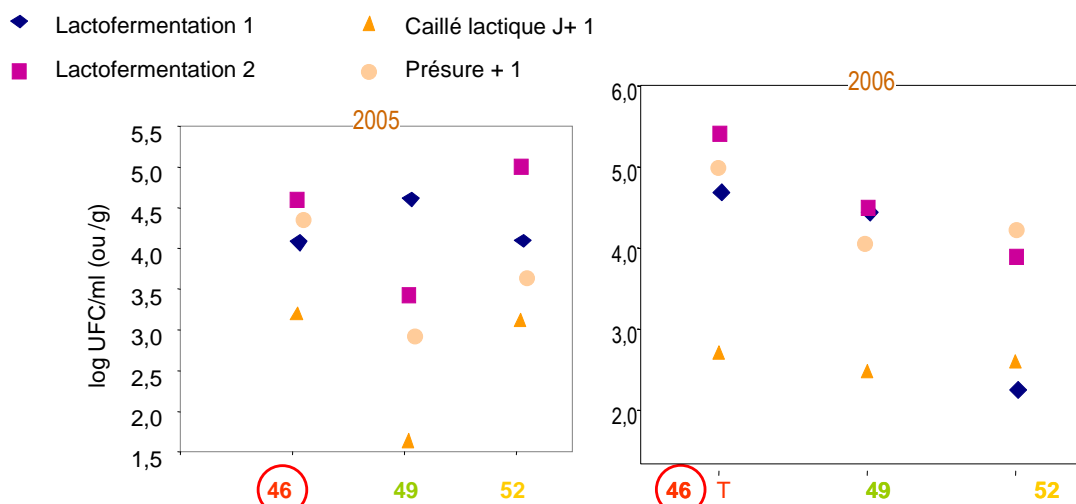


Figure 47 : Comparaison des croissances de *S. aureus* en lactofermentation (en parallèle) et en fabrication à J+1 lors des tests réalisés par le Centre Fromager de Carmejjane

En technologie sensible, de type présure, une bonne corrélation entre croissance de *S. aureus* en lactofermentation et en fabrication a pu être obtenue (Figure 48).

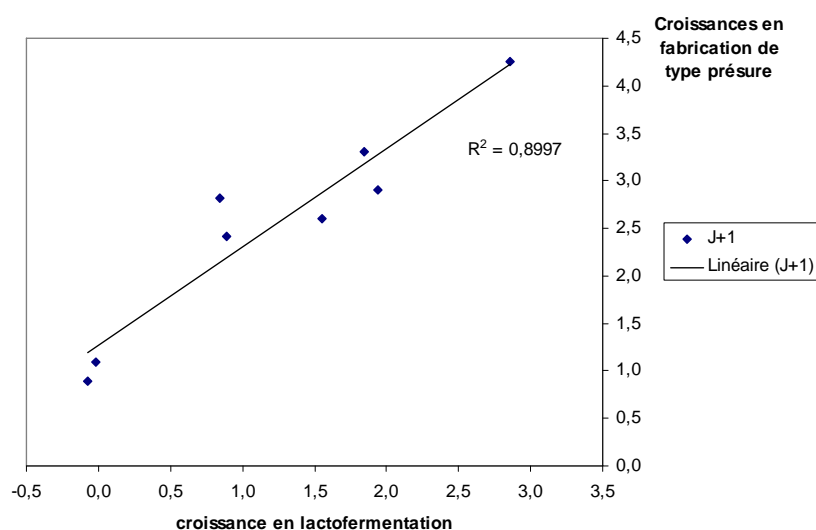


Figure 48 : Relation entre les croissances observée en lactofermentation et en technologie sensible (1% et 0.1% de ferments, à 36°C)

En pratique, le classement relatif des laits par les tests de lactofermentation est globalement en adéquation avec celui obtenu à J+1 lors des fabrications de type lactique ou présure. Des différences d'amplitude dans l'expression du potentiel inhibiteur sont toutefois constatées et, en particulier le potentiel inhibiteur est d'expression plus limitée en fabrication de type lactique, comparativement à un mode de transformation de type présure.

Par ailleurs, lors des tests de lactofermentation, les enregistrements réalisés à 24 heures ne permettent pas d'apprécier les résultats au pic de croissance lorsque celui-ci est obtenu à J+2 (cas le plus fréquent en fabrication lactique).

Les tests de lactofermentation doivent par conséquent être considérés comme des indicateurs uniquement qualitatifs du comportement inhibiteur des laits. Ils permettent de statuer du classement relatif des laits les uns comparativement aux autres sans présager des cinétiques de croissance au cours de l'ensemble du process.

5 Robustesse du potentiel inhibiteur vis à vis des conditions d'inoculation

5.1 Suivi de la croissance de *S. aureus* selon les conditions d'inoculation

5.1.1 Mise en œuvre des tests de lactofermentations

5.1.1.1 Niveaux de contamination des laits en *S. aureus* et conditions d'inoculation

Le tableau 21 présente les niveaux de dénombrement en *S. aureus* avant et après inoculation des souches marquées.

Tableau 21 : Dénombrement en *S. aureus* totaux (en log) avant et après inoculation par les souches exogènes aux quatre niveaux théoriques, 100, 500, 1000 et 5000 ufc/ml soit en log 2.00, 2.70, 3.00, 3.70.

Laits N°	ITPLC				Carmejane		
	9	15	28	Moyenne	49	46	Moyenne
Avant inoculation Souche C	0,95	2,44	1,00	1,46	0,94	0,95	0,95
Après inoculation Souche C							
Niveau 1	1,86	2,55	1,90	2,10	2,17	1,95	2,06
Niveau 2	2,56	2,80	2,50	2,62	2,86	2,44	2,65
Niveau 3	2,93	3,04	2,92	2,96	3,18	2,98	3,08
Niveau 4	343	3,60	3,45	3,50	3,82	3,76	3,79
Avant inoculation Souche A	0,95	2,29	2,30	1,85	0,95	0,95	0,95
Après inoculation Souche A							
Niveau 1	1,59	2,35	2,35	2,10	2,40	2,36	2,38
Niveau 2	2,04	2,41	2,43	2,29	2,86	2,87	2,87
Niveau 3	2,65	2,79	2,79	2,74	3,28	3,12	3,20
Niveau 4	3,34	3,38	3,39	3,37	3,94	3,78	3,86

Dans l'ensemble, les laits évalués à l'ITPLC apparaissent naturellement plus chargés en *S aureus* que ceux testés à Carmejane. Le lait 15, témoin non inhibiteur, a été assez logiquement davantage contaminé que les laits considérés comme inhibiteurs à l'issue des essais en lactofermentation. Le lait 28 a présenté également une population de souches de *S. aureus* élevée : 200 ufc/ml. Ce niveau de contamination a coïncidé avec la survenue de mises-bas tardives lors de la conduite des essais avec la souche de type A.

Les populations de *S. aureus* après inoculation de la souche de type C ont été conformes aux objectifs dans les deux centres. Le niveau d'inoculation de la souche A a été en revanche un peu faible pour les laits de l'ITPLC : niveaux 1 et 2 proches de 100 ufc/ml et objectif de 5000 ufc/ml pour le niveau 4 le plus élevé non atteint (niveaux proches de 2500 ufc/ml).

5.1.1.2 Croissance de *S. aureus*

L'inoculation de lait G, a permis de contrôler le comportement relatif des souches C et A dans les deux centres (Tableau 22)

Tableau 22 : Croissance (delta log sur 24h) des deux souches de *S. aureus* sur lait G

		Carmejane	ITPLC
Souche C	Moyenne	4,87	4,88
	Ecart type	0,51	0,32
Souche A	Moyenne	4,26	4,87
	Ecart type	0,48	0,32

Les essais conduits à l'ITPLC (Figures 50 et 52) confirment le caractère non inhibiteur du lait 15 qui présente par ailleurs des difficultés d'acidification à T final.

Les essais conduits par le Centre Fromager de Carmejana (Figures 49 et 51) sont marqués par le comportement inattendu du lait 46 (témoin non inhibiteur).

Si le niveau de croissance des souches de *S. aureus* après une inoculation de 100 ufc/ml peut être considéré comme normal, il semble en revanche qu'à des niveaux d'inoculation supérieurs la croissance de *S. aureus* (souche inoculée et dans une moindre mesure souches natives) ait été difficile. Aucune hypothèse n'a pu être formulée pour expliquer ces résultats. Parallèlement, dans le lait 49 (lait considéré comme inhibiteur), la croissance de la souche C est restée inférieure à 2 log et a été d'autant plus limitée que l'inoculum a été plus important. Ainsi quel que soit l'inoculum, la population au temps final a toujours atteint environ 10^4 ufc/ml

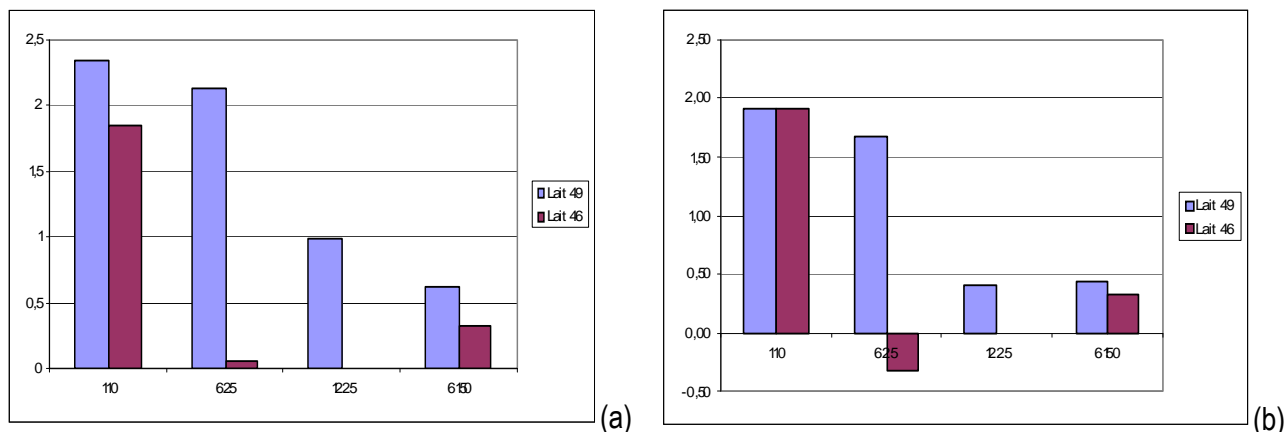


Figure 49 : Croissance (en delta log) de l'ensemble des souches de *S. aureus* (a) et de la souche marquée de type C (b) dans les laits 49 et 46 (témoin) évalués par le Centre Fromager de Carmejana en fonction du niveau d'inoculation

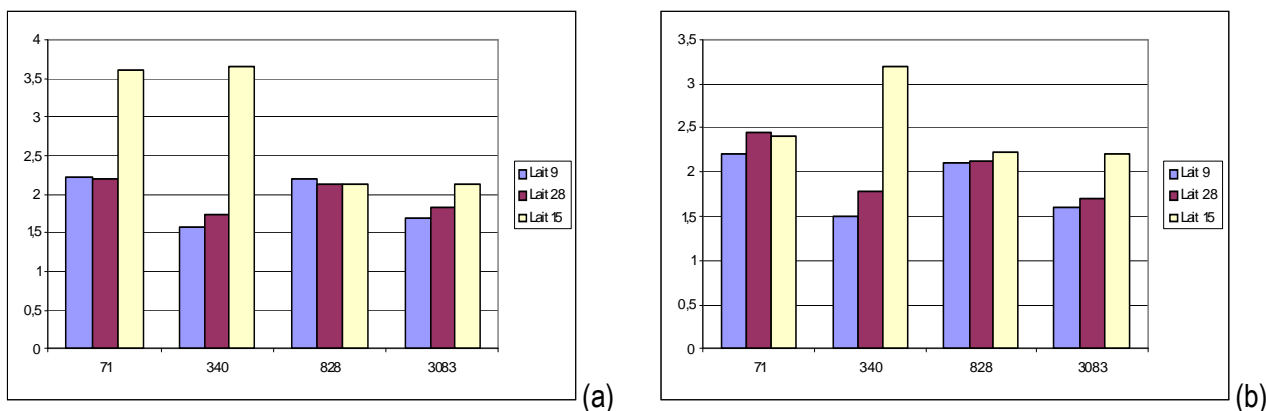
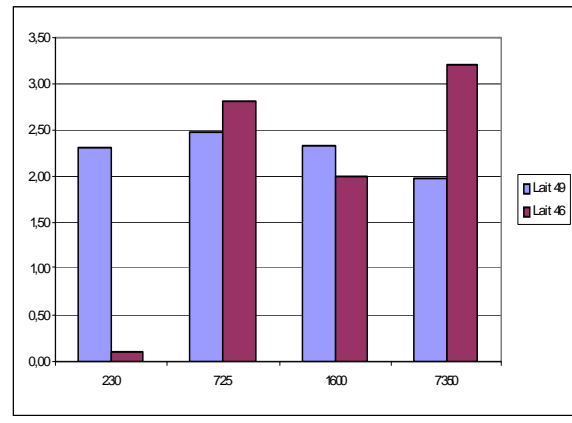
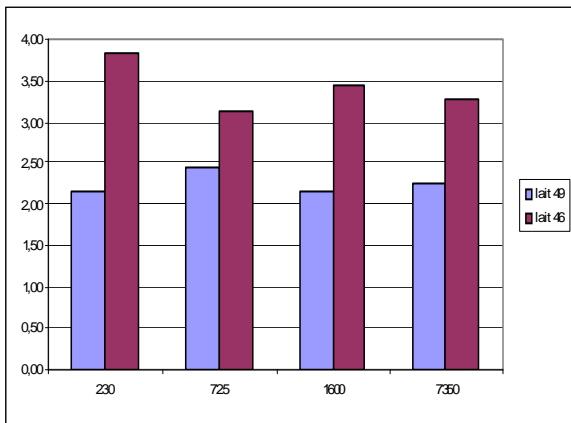


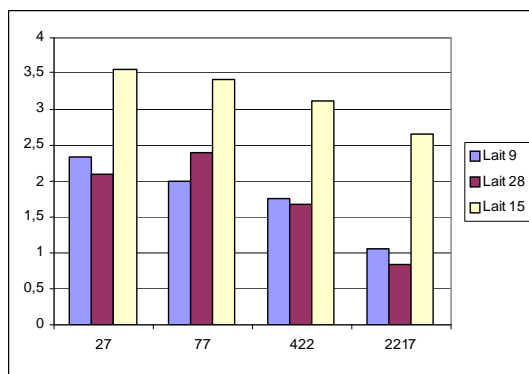
Figure 50 : Croissance (en delta log) de l'ensemble des souches de *S. aureus* (a) et de la souche marquée de type C (b) dans les laits 9, 28 et 15 (témoin) évalués par l'ITPLC en fonction du niveau d'inoculation



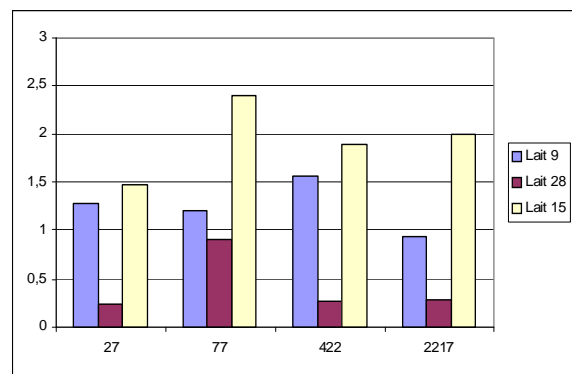
(a)

(b)

Figure 51 : Croissance (en delta log) de l'ensemble des souches de *S. aureus* (a) et de la souche marquée de type A (b) dans les laits 49 et 46 (témoin) évalués par le Centre Fromager de Carmejane en fonction du niveau d'inoculation



(a)



(b)

Figure 52 : Croissance (en delta log) de l'ensemble des souches de *S. aureus* (a) et de la souche marquée de type A (b) dans les laits 9, 28 et 15 (témoin) évalués par l'ITPLC en fonction du niveau d'inoculation

Ces essais confirment le potentiel inhibiteur ou non inhibiteur des laits considérés comme tels lors des lactofermentations précédentes. A l'ITPLC, compte tenu des niveaux de contamination initiaux élevés, s'est posée, notamment pour le lait 28, la question d'une possible compétition entre les souches natives de *S. aureus* et la souche marquée de type A, en particulier pour les faibles inoculums (Figure 52). La population en *S. aureus* totaux est en effet généralement supérieure d'1 log à celle de la souche marquée A et ce n'est qu'au delà d'une inoculation théorique de 5000 ufc/ml que la souche A présente un niveau de concentration proche de celui des souches natives présentes dans les laits inoculés. Ces observations justifient la prise en compte du niveau de contamination initiale des laits dans l'interprétation de leur potentiel inhibiteur (§ 5.3 et 5.4).

5.1.2 Mise en œuvre des essais en fabrications

5.1.2.1 Fabrications de type présure

Croissance de S. aureus dans les fromages réalisés à partir de laits inoculés avec la souche de type C

Le potentiel inhibiteur des laits tel qu'il a été défini lors des tests en lactofermentations a été confirmé en transformation fromagère quel que soit le niveau d'inoculation (Figures 53 et 54) :

- caractère inhibiteur des laits 9 et 49 ;
- laits témoins 15 et 46 non inhibiteurs ;
- comportement intermédiaire du lait 28 comparativement aux laits 9 et 15.

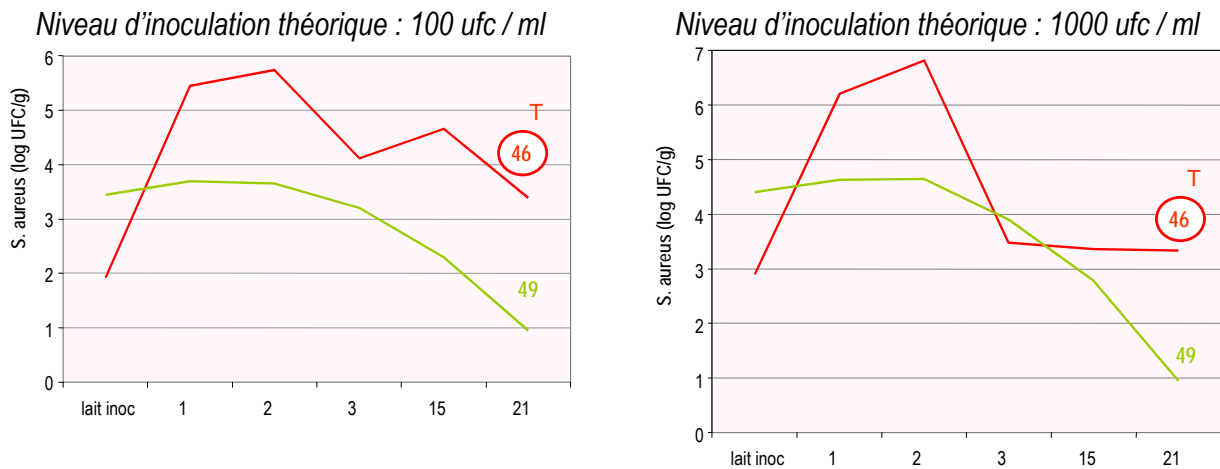


Figure 53 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 49 et 46 (témoin) évalués par le Centre Fromager de Carmejane selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type C

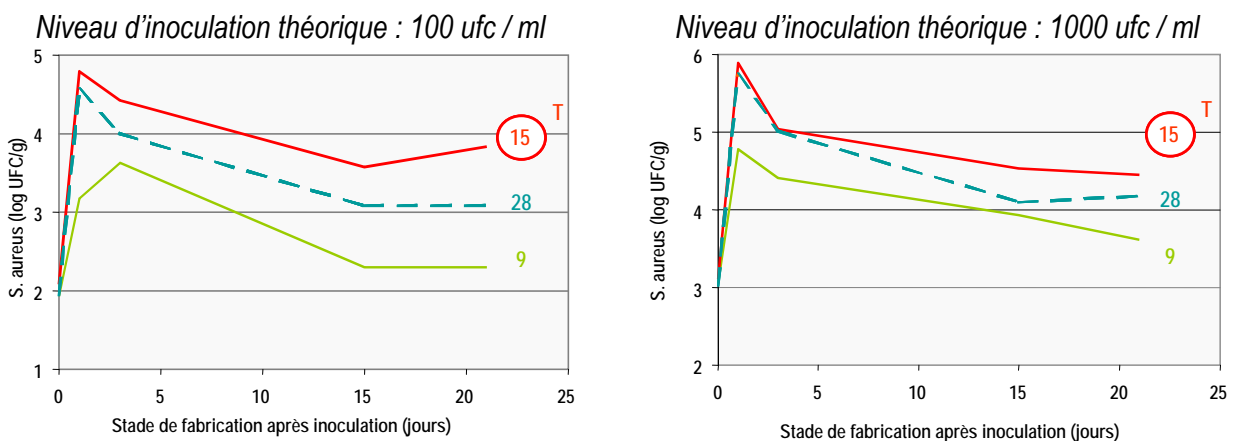


Figure 54 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 28 et 15 (témoin) évalués par l'ITPLC selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type C

Des différences de croissance des populations de *S. aureus* (ensemble des souches natives et inoculée de type C) d'environ 1 log ont été observées entre les laits 9 et 15. Elles ont varié de 1,5 à 3 log entre les laits 49 et 46, ce qui est conforme aux résultats obtenus lors des précédents essais en fabrications.

Les laits inhibiteurs ont permis de maintenir la population de *S. aureus* en deçà de 10^5 ufc/g y compris pour des niveaux d'inoculation proches de 1000 ufc/ml et malgré des niveaux de contamination initiaux parfois élevés (cas du lait 49 avec une contamination initiale supérieure à 1000 ufc/ml). Le risque de production d'entérotoxines généralement observable à partir de 10^6 ufc/g était donc théoriquement faible.

En fabrication présure, le pic de croissance de *S. aureus* a été observé à J+1 ou J+2. Ce pic a été plus marqué pour les laits non inhibiteurs. Au delà de J+3, le niveau de contamination des fromages par *S. aureus* a eu tendance à décroître progressivement.

Croissance de *S. aureus* dans les fromages réalisés à partir de laits inoculés avec la souche de type A

Les résultats obtenus ont différé sensiblement entre les deux centres. En effet, si le potentiel inhibiteur du lait 9 vis-à-vis de *S. aureus* est visible lors d'une inoculation à 100 ufc/ml avec la souche de type A, il n'a en revanche pas été mis en évidence lorsque l'inoculum a dépassé 1000 ufc/ml (Figure 56). Les comportements relatifs des laits inhibiteur et non inhibiteur testés par le Centre Fromager de Carmejjane ont en revanche été similaires quel que soit le niveau d'inoculation de la souche de type A (Figure 55).

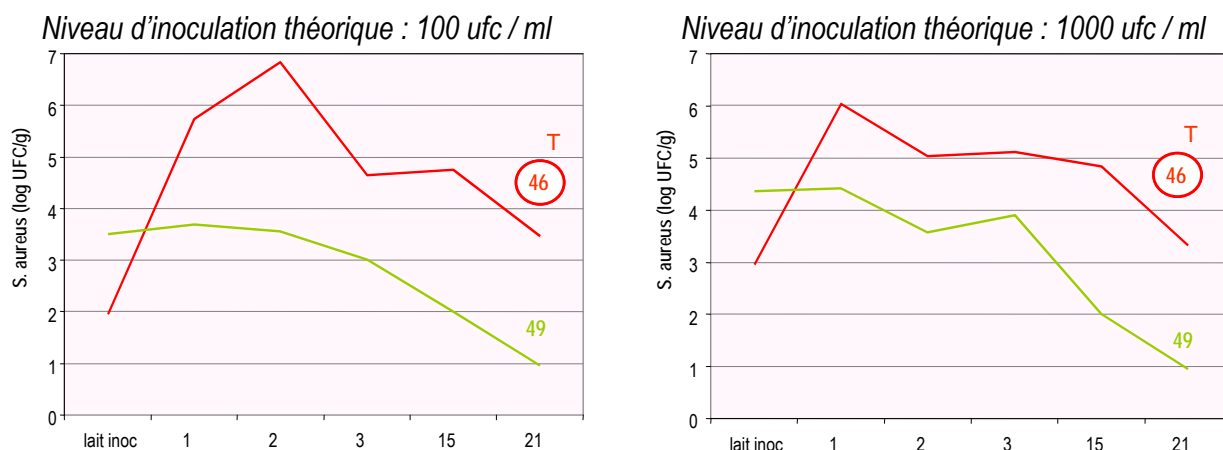


Figure 55 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 49 et 46 (témoin) évalués par le Centre Fromager de Carmejjane selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type A

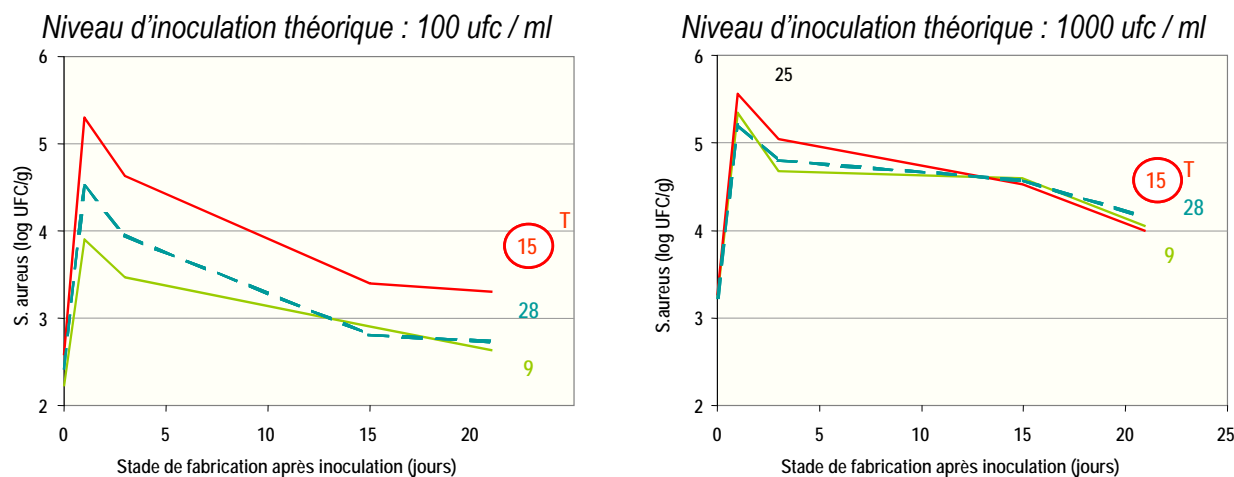


Figure 56 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 28 et 15 (témoin) évalués par l'ITPLC selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type A

5.1.2.2 Fabrications de type lactique

Croissance de *S. aureus* dans les fromages réalisés à partir de laits inoculés avec la souche de type C

En fabrication lactique, après inoculation de la souche de type C, la croissance des populations de *S. aureus* a été comparable dans les produits issus des laits inhibiteurs et non inhibiteurs (Figures 57 et 58).

Le pic de croissance a été obtenu à J+2. Les niveaux de contamination sont restés inférieurs à 10^5 ufc/g tout au long du processus.

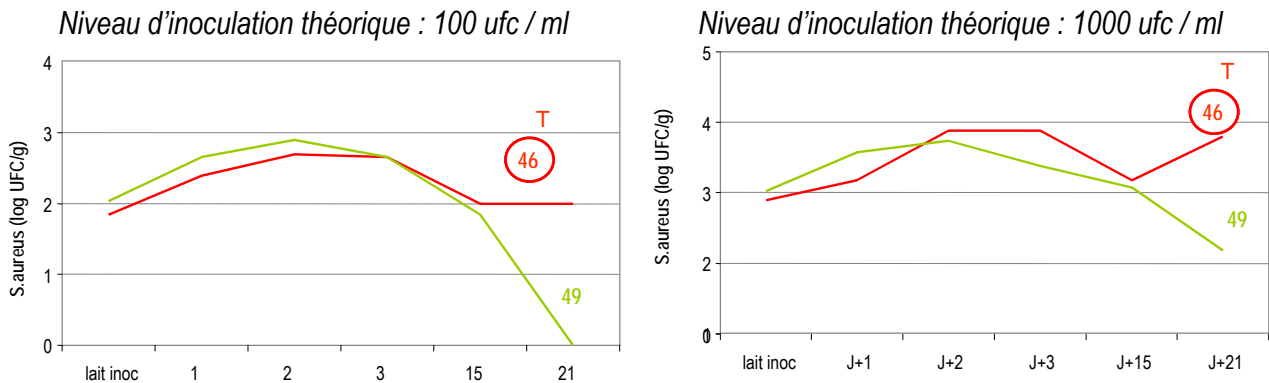


Figure 57 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 49 et 46 (témoin) évalués par le Centre Fromager de Carmejane selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type C

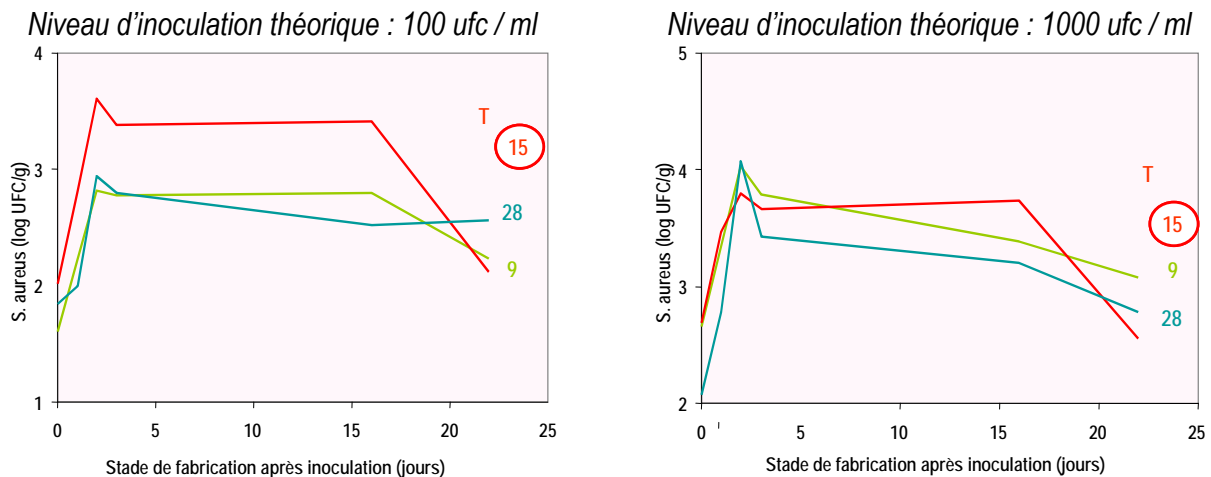


Figure 58 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 28 et 15 (témoin) évalués par l'ITPLC selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type C

Croissance de *S. aureus* dans les fromages réalisés à partir de laits inoculés avec la souche de type A

Les résultats obtenus par le Centre Fromager de Carmejane en fabrication lactique après inoculation de la souche de type A ont été comparables à ceux obtenus avec la souche C (Figures 57 et 59).

Les essais réalisés à l'ITPLC ont témoigné en revanche d'un changement de comportement des laits (Figures 58 et 60). Ce changement de comportement est concomitant de la survenue de mises-bas en septembre – octobre, d'une modification de la composition des laits et de son incidence prévisible sur la transformation. Ainsi, a t'on comparé les extraits secs obtenus à partir des fromages issus des 3 laits testés (Figure 61). Le lait 15 est caractérisé par l'extrait sec le plus élevé : 7 % d'écart à J+3 avec le lait 28. C'est la raison pour laquelle une répétition supplémentaire a été réalisée à l'ITPLC.

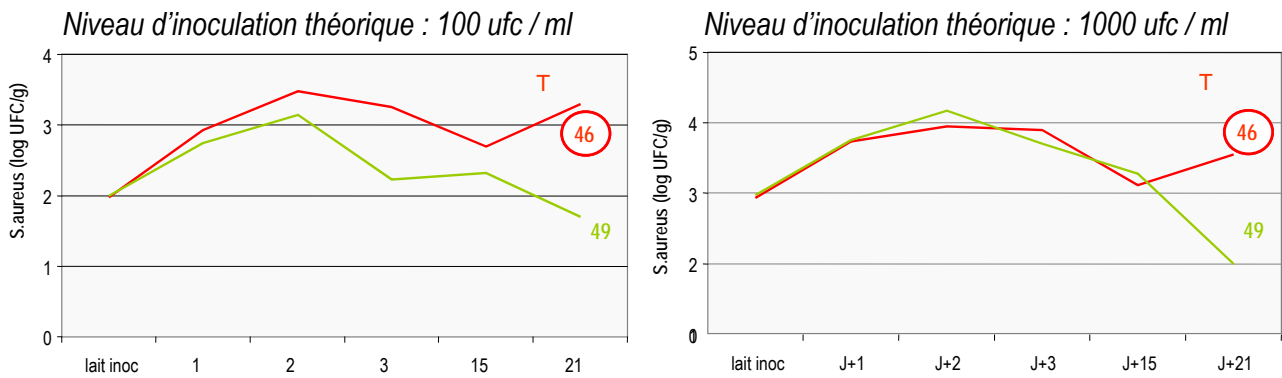


Figure 59 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 49 et 46 (témoin) évalués par le Centre Fromager de Carmejane selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type A

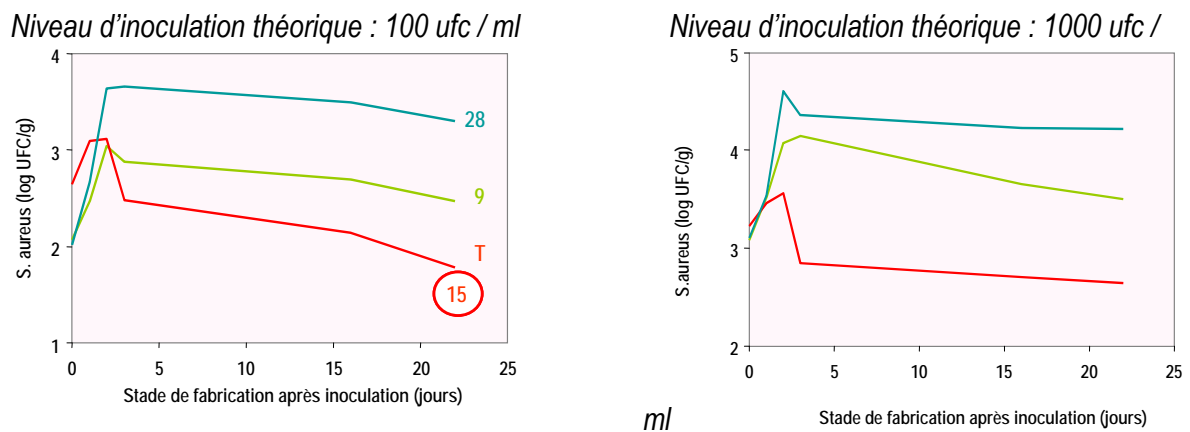


Figure 60 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* dans les laits 28 et 15 (témoin) évalués par l'ITPLC selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type A

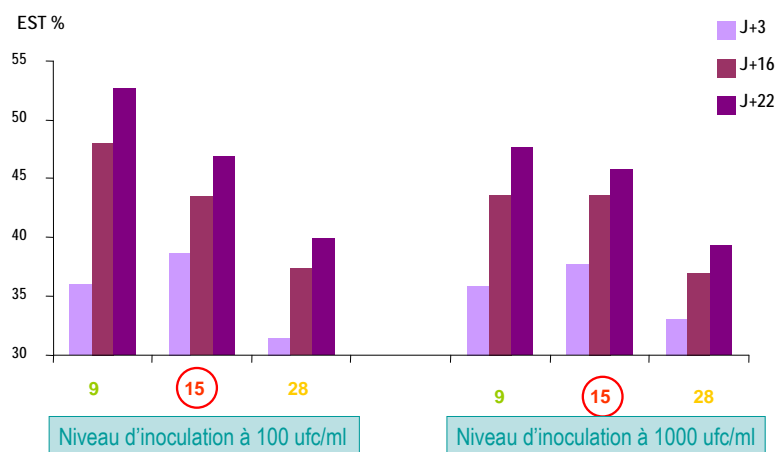


Figure 61 : Extrait sec des fromages lactiques réalisés à partir des laits 9, 15 (Témoin) par l'ITPLC selon le niveau d'inoculation des laits en souche de *S. aureus* de type A

Répétition des essais en technologie lactique à l'ITPLC

Suite à une nouvelle série de lactofermentations ont été évalués 3 laits inhibiteurs (9, 28, 45) et 1 lait témoin (32) non inhibiteur (Figure 62). Le lait 45, contaminé par du sang, n'a pas été retenu dans l'essai faisant intervenir la souche C.

Lors de cette répétition, le lait 28 a confirmé son absence de caractère inhibiteur. Les résultats obtenus peuvent suggérer l'existence d'un effet seuil : le lait 9 s'est en effet démarqué des autres laits à un niveau d'inoculation de 100 UFC /ml ce qui n'a plus été le cas pour une taille d'inoculum de 1000 UFC/ml. Ces observations ont été réalisées avec la souche de type C comme avec la souche de type A.

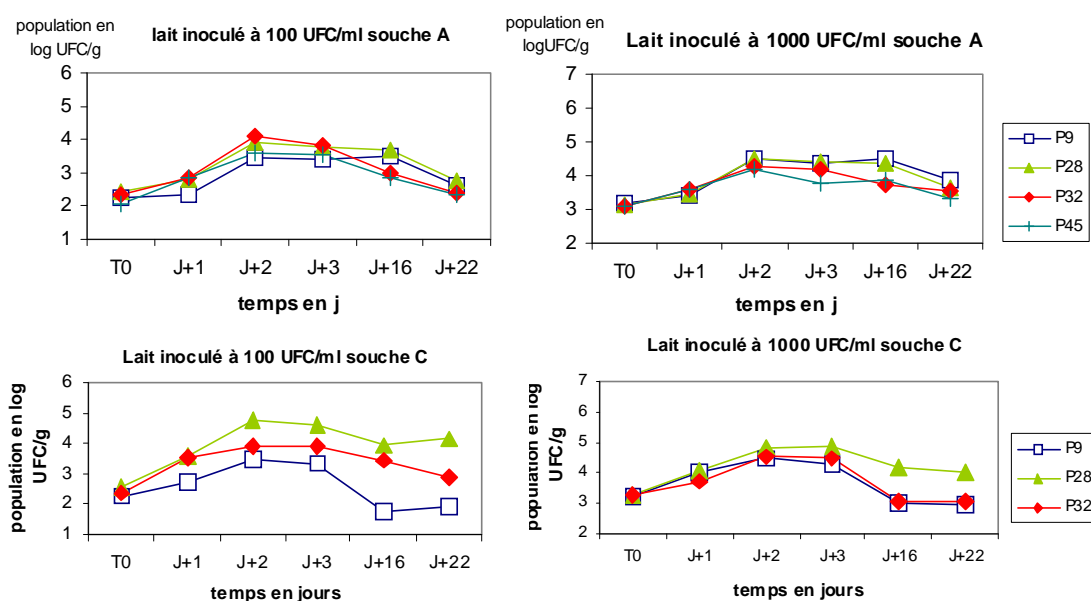


Figure 62 : Croissance (en log) des souches de *S. aureus* type A et C en fabrication de type lactique évaluée par l'ITPLC (répétition des essais)

5.2 Recherche d'entérotoxines dans les fromages

Seuls les fromages de type présure ont présenté les niveaux de populations requis impliquant une recherche d'entérotoxines.

La plupart des recherches d'entérotoxines ont été effectuées sur des fromages fabriqués à partir de laits inoculés à des niveaux élevés (inoculation théorique à 1000 ufc/ml). Le seul résultat positif à J+3 correspond à une fabrication avec un lait non inhibiteur (lait 46) inoculé avec une souche entérotoxigène de type A (Tableau 15). A J+1, 3 tubes sur 4 étaient positifs au VIDAS (Tableau 23).

La détermination des entérotoxines produites a été réalisée en double. Bien que la souche soit productrice d'entérotoxines de type A, ce sont les entérotoxines D (J+1 et J+3) et C (J+3) qui ont été mises en évidence par le kit Oxoid et de manière plus faible les entérotoxines A et B (J+3).

Ces résultats obtenus avec le kit OXOID sont assez surprenants (il n'est pas habituel d'observer un nombre si diversifié d'entérotoxines produites dans les fromages) et demanderaient à être confirmés.

Néanmoins, les résultats obtenus avec le VIDAS indiquent un risque potentiel de production d'entérotoxines dans les fromages de type présure lorsque la teneur initiale en staphylocoques coagulase positive dans les laits n'est pas maîtrisée.

Tableau 23 : Recherche d'entérotoxines dans les fromages type présure

Centre	Lait	Souche inoculée	Taille théorique de l'inoculum	Détermination VIDAS		Détermination OXOID		Dénombrements SCP (en ufc/g)	
				J+3	J+1	J+3	J+1	J+3	J+1
Carvejane	46	A	100	-	ND	ND	ND	ND	5.0 10 ⁵
	46	A	1000	+	+ (3/4)	SEA+/- ; SEB +/- SEC+ ; SED+	SED +	1.3 10 ⁴	1.1 10 ⁶
	46	C	100	-	ND	ND	ND	1.3 10 ³	2.9 10 ⁵
	46	C	1000	-	ND	ND	ND	3.0 10 ²	1.7 10 ⁶
	49	A	1000	-	ND	ND	ND	8.0 10 ³	2.6 10 ⁴
	49	C	1000	-	ND	ND	ND	8.0 10 ³	4.3 10 ⁴
ITPLC	15	A	100	-	ND	ND	ND	4.3 10 ⁴	2.0 10 ⁵
	15	A	1000	-	ND	ND	ND	6.3 10 ⁴	3.7 10 ⁵
	15	C	1000	-	ND	ND	ND	3.3 10 ⁴	2.5 10 ⁵
	9	A	1000	-	ND	ND	ND	4.7 10 ⁴	2.2 10 ⁵
	28	A	1000	-	ND	ND	ND	1.1 10 ⁵	1.6 10 ⁵
	28	C	1000	-	ND	ND	ND	3.5 10 ⁴	1.8 10 ⁵

SCP : Staphylocoques à coagulase positive ; ND : non déterminé.

5.3 Evaluation de l'effet dose-réponse

5.3.1 Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de la souche marquée inoculée

D'un point de vue purement descriptif, la figure 63 fait apparaître, principalement pour le Centre Fromager de Carvejane, une amplitude de croissance de la souche de *S. aureus* de type C lors des lactofermentations d'autant plus faible que la taille de l'inoculum est plus élevée.

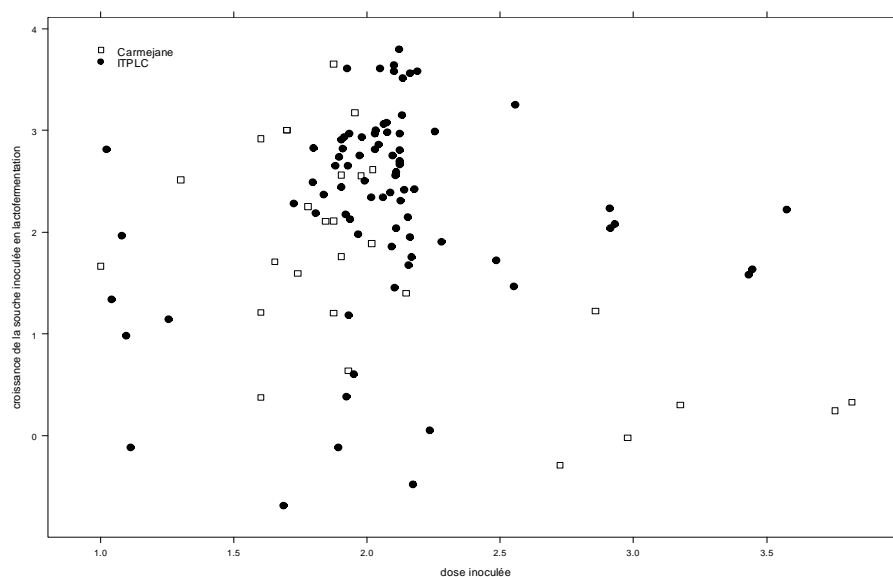


Figure 63. Croissance, en lactofermentation, de la souche de *S. aureus* inoculée en fonction de la taille de l'inoculum pour les deux centres d'essai

La variabilité expliquée par le modèle défini pour l'analyse de variance est de 31% (R^2).

Les résultats diffèrent selon les centres ($p = 0,0029$) : les niveaux de croissance obtenus à Carmejane sont en moyenne plus faibles que ceux obtenus à l'ITPLC. Le niveau de contamination des laits en souches natives influe significativement sur la croissance de la souche inoculée ($p = 0,0011$). Enfin, l'interaction souche inoculée*souches natives, est également significative ($p = 0,0002$). Les moyennes ajustées des croissances de la souche de *S. aureus* marquée en fonction du Centre expérimental d'une part et du niveau de contamination initial des laits d'autre part sont rapportées respectivement dans les tableaux 24 et 25.

Tableau 24 : Moyennes ajustées de la croissance de la souche de *S. aureus* marquée selon le centre d'étude

	Centre expérimental	
	Carmejane	ITPLC
Moyenne ajustée (log10)	2,05	2,61

Tableau 25 : Moyennes ajustées de la croissance de la souche de *S. aureus* marquée selon le niveau de contamination initial en souches natives des laits

	Niveau de contamination initial des laits en souches natives		
	$\leq 1 \log$	$1 \log < \leq 2 \log$	$> 2 \log$
Moyenne ajustée (log10)	2,02	2,69	2,28

La relation entre la taille de l'inoculum et la croissance de la souche inoculée à T_{final} ne répond à aucune loi de réponse connue (Annexes 4.9 et 4.10). La quasi-totalité des doses inoculées étant comprises entre 1,8 et 2,2 log, il est possible que la plage de variation soit trop restreinte pour en permettre la mise en évidence.

5.3.2 Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus*

La variabilité expliquée par le modèle est de 28 % (R^2). Seuls les effets Centre ($p = 0,0001$) et l'interaction souche inoculée*souches natives ($p = 0,031$) se sont avérés significatifs. Les tendances restent toutefois les mêmes que celles décrites pour la souche inoculée seule, avec une croissance inférieure de *S. aureus* dans les laits testés à Carmejane par rapport à ceux testés à l'ITPLC (moyennes ajustées : 1,88 vs 2,65).

5.4 Evaluation de l'incidence de la souche et du niveau d'inoculation sur la croissance de *S. aureus*

5.4.1 Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de la souche marquée inoculée

Le R^2 du modèle d'analyse a été de 34%. L'effet souche apparaît significatif sur la croissance de la souche inoculée ($p = 0,0069$) : la souche A présente une croissance inférieure à celle de la souche C (Tableau 26). Par ailleurs, une légère interaction entre la souche native et la souche inoculée a été mise en évidence ($p = 0,0111$) et l'effet centre est à la limite de la significativité ($p = 0,0615$).

Les moyennes ajustées des croissances de la souche de *S. aureus* marquée en fonction du Centre expérimental d'une part et du type de souche d'autre part sont rapportées respectivement dans les tableaux 26 et 27.

Tableau 26 : Moyennes ajustées de la croissance de la souche de *S. aureus* marquée selon le centre d'étude

	Centre expérimental	
	Carnejane	ITPLC
Moyenne ajustée (log10)	1,05	1,69

Tableau 27. Moyennes ajustées de la croissance de la souche de *S. aureus* marquée selon le niveau de contamination initial en souches natives des laits

	Nature de la souche inoculée	
	Entérotoxigène de type A	Entérotoxigène de type C
Moyenne ajustée (log10)	1,24	1,51

5.4.2 Incidence de la taille de l'inoculum sur la croissance de l'ensemble des souches de *S. aureus*

Le R² du modèle appliqué est de 43 %. Seule la taille de l'inoculum est apparue comme légèrement significative ($p = 0,0204$) : la croissance des souches de *S. aureus* tend à diminuer lorsque la taille de l'inoculum augmente.

6 Efficacité du potentiel inhibiteur en technologie fromagère sensible

Les conditions d'inoculation sont synthétisées dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Dénombrements en *S. aureus* totaux (en log) avant et après inoculation par la souche de type C à 100 ufc/ml lors des essais sur technologie fromagère sensible.

Laits N°	ITPLC					Carnejane		
	9	15	28	45	Moyenne	49	46	Moyenne
Avant inoculation Souche C								
	2,02	1,78	2,06	0,95	1,70	1,48	3,24	2,36
	1,87	2,08	1,87	1,00	1,70			
Après inoculation Souche C								
Série 1	2,36	2,26	2,32	1,94	2,22	4,00	4,92	4,46
Série 2	2,30	2,30	2,18	2,15	2,23			

Lors des essais réalisés à l'ITPLC, l'incidence de la dose de ferment sur la croissance de *S. aureus* est manifeste pour tous les laits exception faite du lait 28 : croissance accrue avec une dose de ferment de 0,1 %. Les laits jugés inhibiteurs (9 et surtout 28) en lactofermentation (à 27°C) ont conservé leur potentiel pendant les fabrications. L'expression de leur potentiel inhibiteur est d'autant plus marquée que la dose de ferment utilisée est plus faible (Figure 64).

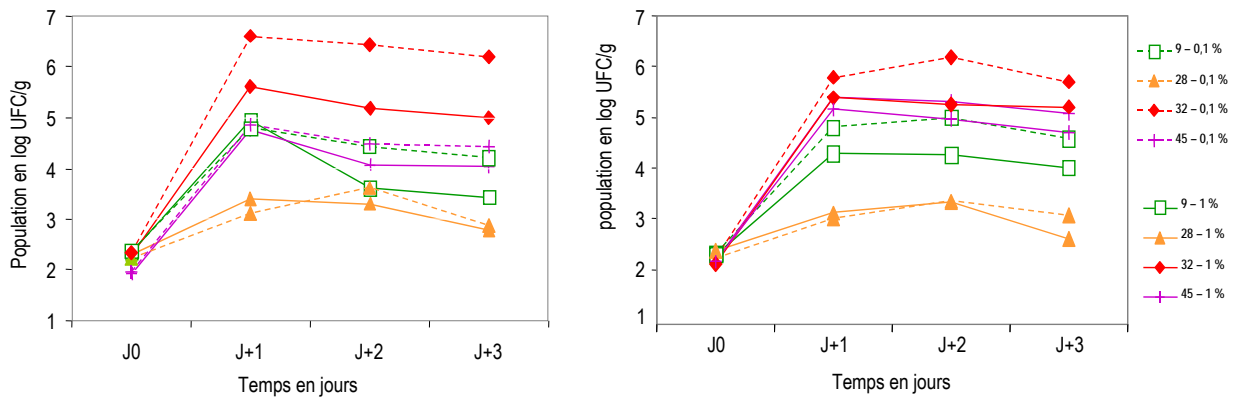


Figure 64 : Croissance de *S. aureus* en fabrication de type présure à 36°C selon la dose de ferment CHN14 (0,1 vs 1 %) au cours des essais conduits à l'ITPLC : essai 1 (a) et répétition à 1 semaine d'intervalle (b)

Les forts niveaux d'inoculation des laits testés à Carmejane n'ont pas permis d'évaluer leur potentiel inhibiteur dans de bonnes conditions (Tableau 28, Figure 65). Néanmoins, on observe que l'ajout de ferments est inutile dans le cas du lait inhibiteur (lait 49) mais qu'il a au contraire un rôle très important dans le cas du lait témoin non inhibiteur (lait 46).

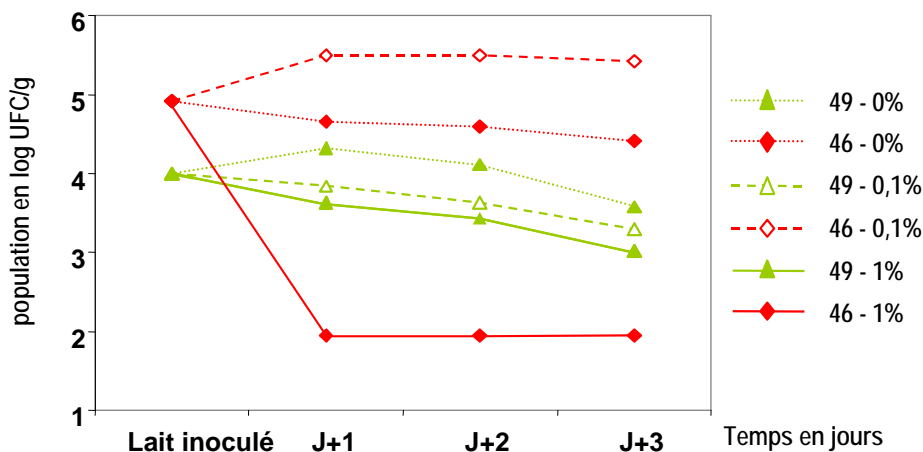


Figure 65 : Croissance de *S. aureus* en fabrication de type présure à 36°C selon la dose de ferment CHN14 (0,1 vs 1 %) au cours des essais conduits à Carmejane

L'étude parallèle des flores lactiques montre que le lait 49 possède déjà naturellement une flore lactique acidifiante importante (Figure 66) permettant une acidification marquée (Figure 67). À l'inverse, le lait 28, reconnu comme inhibiteur, ne parvient pas à s'acidifier avec peu de ferment (Figure 68), le caillé restant de ce fait très humide. Ces résultats confirment que les mécanismes d'inhibition ne sont pas strictement et systématiquement liés à la capacité acidifiante des laits.

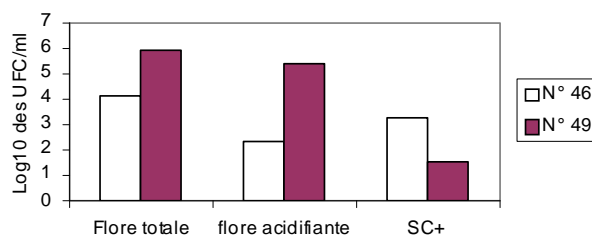


Figure 66 : Composition microbienne initiale des laits 46 et 49 testés à Carmejane

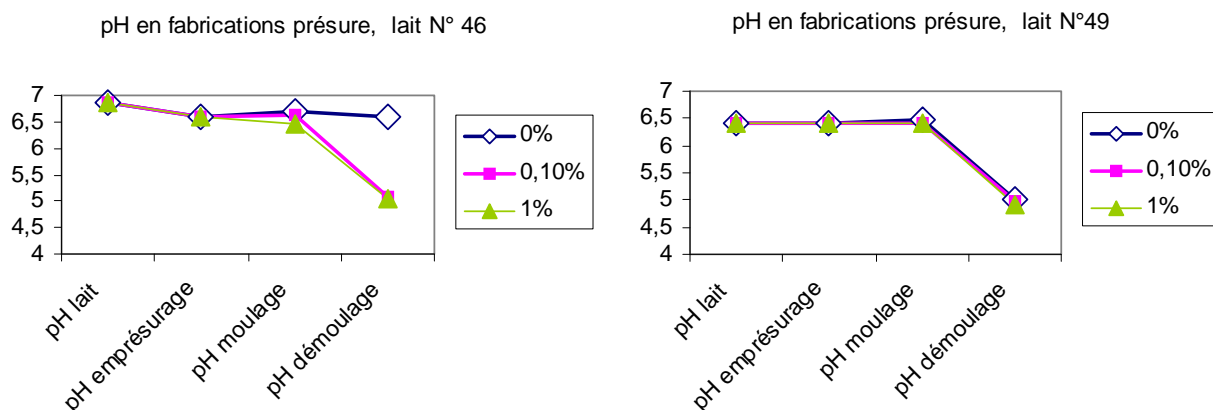


Figure 67: Pouvoir acidifiant naturel des laits 49 et 46 testés à Carmejane

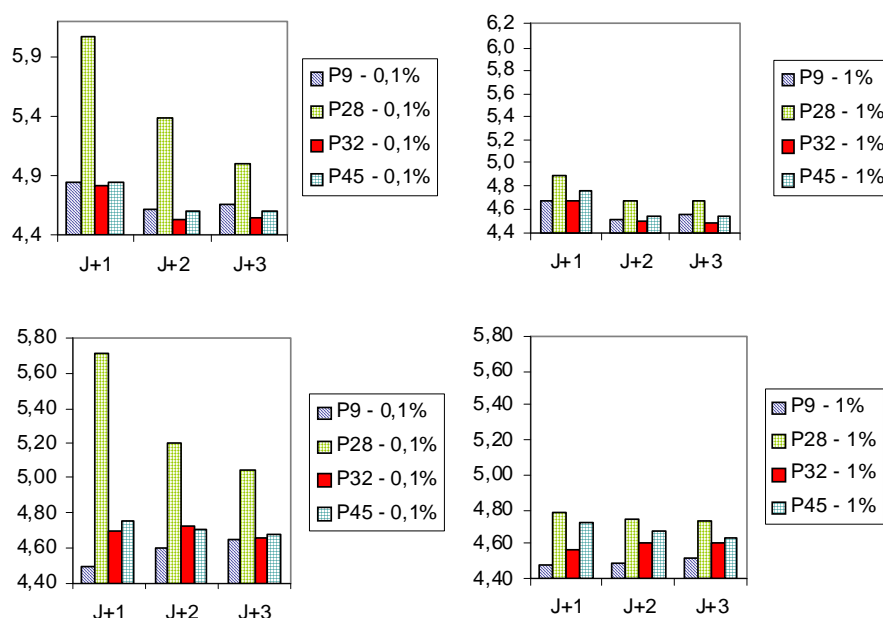


Figure 68 : Évolution du pH des fromages selon les laits mis en œuvre à l'ITPLC

Ces essais montrent que l'ajout de ferment est important pour les laits non inhibiteurs en raison de l'incidence de l'acidification ainsi induite sur la croissance de *S. aureus*. De manière corollaire, l'utilisation de laits naturellement inhibiteurs peut donc être jugée particulièrement intéressante en fabrications sensibles.

7 Comparaison des écosystèmes des laits inhibiteurs et non inhibiteurs

7.1 Description des écosystèmes microbiens

7.1.1 Analyses microbiologiques des laits

Les résultats des dénombrements (Log ufc/ml) obtenus sur les différents milieux utilisés sont présentés de manière détaillée en Annexe 4.12.

Le milieu M17L à 30°C a montré une grande diversité de colonies sur les boîtes de dénombrement : certaines boîtes étaient jaunes (acidification par utilisation du lactose par les lactocoques) et beaucoup étaient violettes. Ce milieu ne permet donc pas de traduire le niveau des lactocoques dans les laits.

Ceux-ci sont mieux appréciés sur le milieu de Turner à 30°C qui, malgré une grande diversité et la présence de nombreuses colonies Gram négatif, a permis une sélection des lactocoques par comptage des colonies rouges et roses caractéristiques de *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus lactis cremoris*. Ainsi, le niveau des lactocoques s'est avéré très variable (0,31 à 5 Log ufc/ml) selon les laits.

Le niveau des entérocoques dénombrés sur le milieu SB était également très variable d'un lait à l'autre avec des valeurs comprises entre 0,31 et 3,46 Log ufc/ml.

Les flores à Gram négatif dénombrées sur le milieu PCAI et Gram positif non lactiques dénombrées sur le milieu CRBM sont apparues moins variables et se sont situées dans des fourchettes respectives de 2,51 à 4,34 et de 2,71 à 3,94 log ufc/ml.

Les lactobacilles mésophiles dénombrés sur le milieu FH étaient peu importants avec des niveaux de flore compris entre 0,3 et 2,63 Log ufc/ml.

La population de levures dénombrée sur le milieu OGA a par contre été très variable sur le plan qualitatif (diversité des types de colonies) et quantitatif avec des niveaux variant de 0,3 à 4,31 Log ufc/ml dans les différents laits.

Les deux axes, 1 et 2, définis lors de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir de l'ensemble des dénombrements effectués sur les laits, expliquent seulement 60% de la variance (Figure 69). La répartition des laits sur ces 2 axes témoigne de leur grande diversité et de l'absence de séparation marquée des laits inhibiteurs et non inhibiteurs ou des laits de Carmejeane et de l'ITPLC en fonction des niveaux de flores sur les différents milieux de culture.

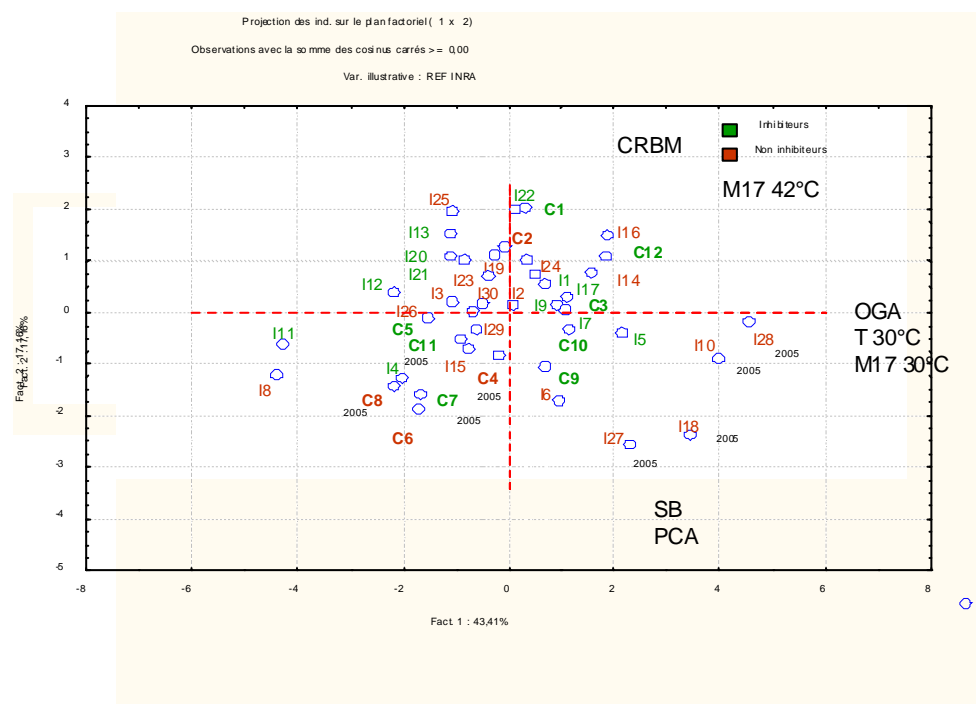


Figure 69 : Analyse en Composante principale des résultats (Log UFC/ml) de dénombrements des laits inhibiteurs et non inhibiteurs de Carmejeane (C1 à C12) et de l'ITPLC (I1 à I30).

Les niveaux de flore des laits inhibiteurs ou non ont été comparés. Des données moyennes mentionnées en Annexe 4.12 et visualisées par des histogrammes sur les figures 70 à 73, il ressort que :

- Pour les laits de Carmejane, les différences de moyennes des niveaux de flores entre les laits inhibiteurs et non inhibiteurs sont inférieures à 0,5 Log pour les milieux M17 à 30°C et 42°C, SB, PCAI et CRBM et ne permettent pas de discriminer les laits. Par contre, les niveaux de flore sur les milieux OGA (levures) et Turner à 30°C (colonies roses : *Lc. lactis cremoris*) ont tendance à être supérieurs dans les laits inhibiteurs à ceux observés dans les laits non inhibiteurs Figure 70). Cette caractéristique des laits inhibiteurs de Carmejane a été plus marquée dans les laits inhibiteurs de 2005, notamment pour les flores du milieu de Turner à 30°C Figure 71).
- Pour les laits de ITPLC, les différences de moyennes des niveaux de flores entre les laits inhibiteurs et non inhibiteurs sont inférieures à 0,5 Log pour tous les milieux utilisés et ne permettent pas de discriminer les laits (Figure 72). Aucune différence significative ne permet de distinguer les laits inhibiteurs 2004 de ceux de 2005 sur la base des dénombrements microbiens (Figure 73).
- Les laits de Carmejane (Figure 71) ont un niveau de flores entérocoques et levures plus élevé que ceux de l'ITPLC.

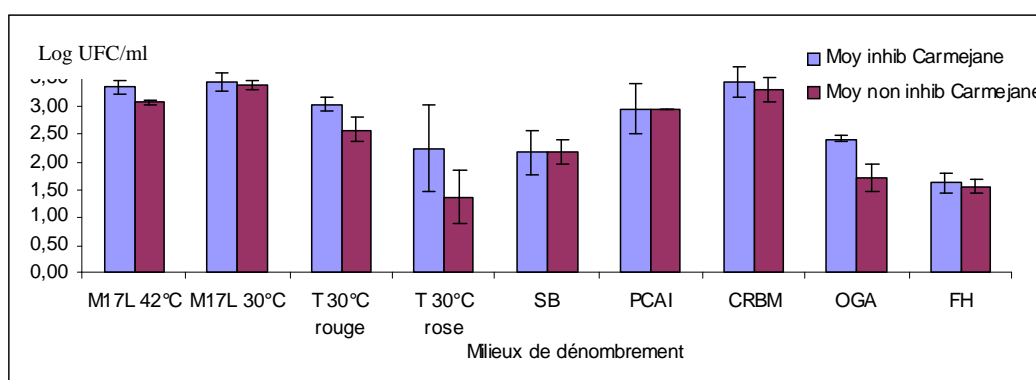


Figure 70 : Moyennes des niveaux de flores (Log ufc/ml) des laits inhibiteurs et non inhibiteurs de Carmejane sur les 8 milieux de dénombrements.

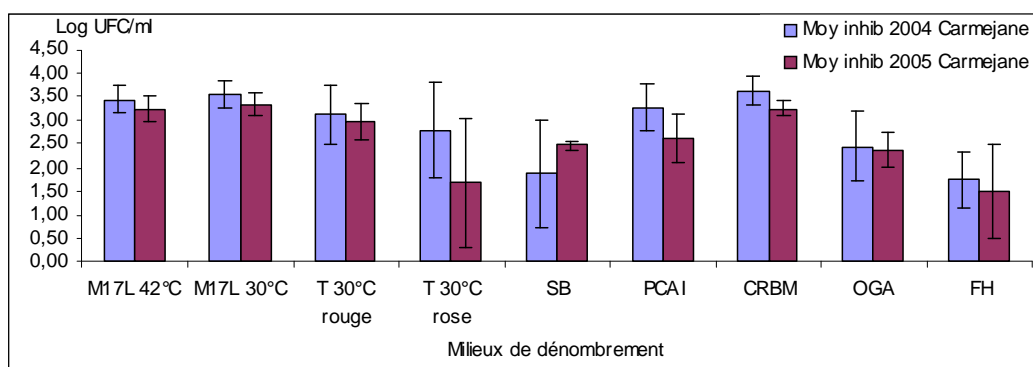


Figure 71 : Moyennes des niveaux de flores (Log ufc/ml) des laits inhibiteurs collectés en 2004 et 2005 par Carmejane sur les 8 milieux de dénombrements.

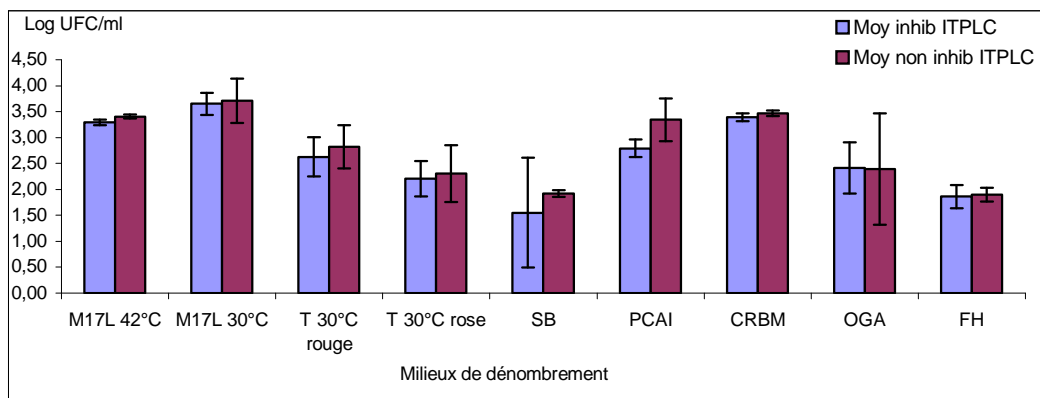


Figure 72 : Moyennes des niveaux de flores (Log ufc/ml) des laits inhibiteurs et non inhibiteurs de l'ITPLC sur les 8 milieux de dénombrements.

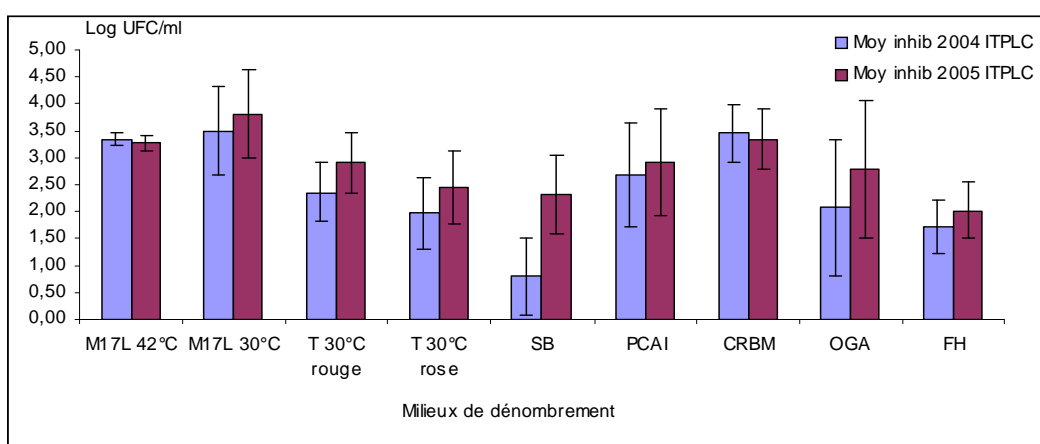


Figure 73 : Moyennes des niveaux de flores (Log ufc/ml) des laits inhibiteurs collectés par l'ITPLC en 2004 et 2005 sur les 8 milieux de dénombrements.

7.1.2 Analyses des équilibres microbiens

Les profils V3 SSCP des laits sont diversifiés avec un total de 26 pics différents identifiés.

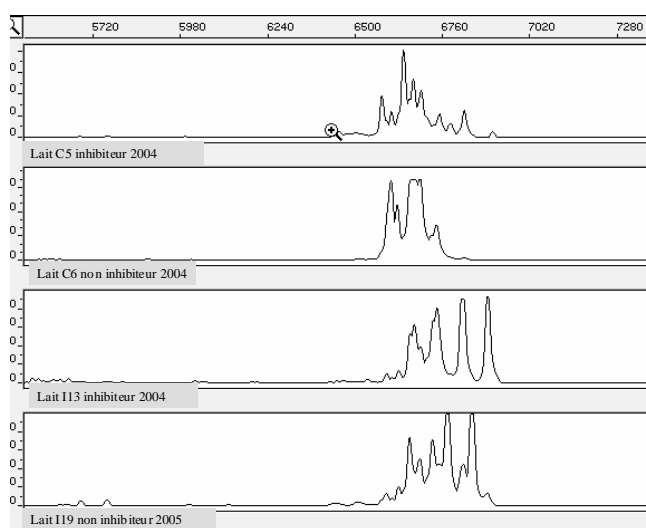


Figure 74 : Exemples de profils SSCP V3 de laits inhibiteurs et non inhibiteurs de Carêmejane et de l'ITPLC.

La figure 74 présente des exemples de profils V3 SSCP obtenus pour des laits inhibiteurs et non inhibiteurs provenant de Carmejane et de l'ITPLC.

Les deux axes 1 et 2 déterminés lors de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir de l'ensemble des résultats (ratios des pics) de l'analyse SSCP V3 des laits inhibiteurs et non inhibiteurs de Carmejane (C1 à C12) et de l'ITPLC (I1 à I30) (Figure 75) expliquent seulement 42% de la variance.

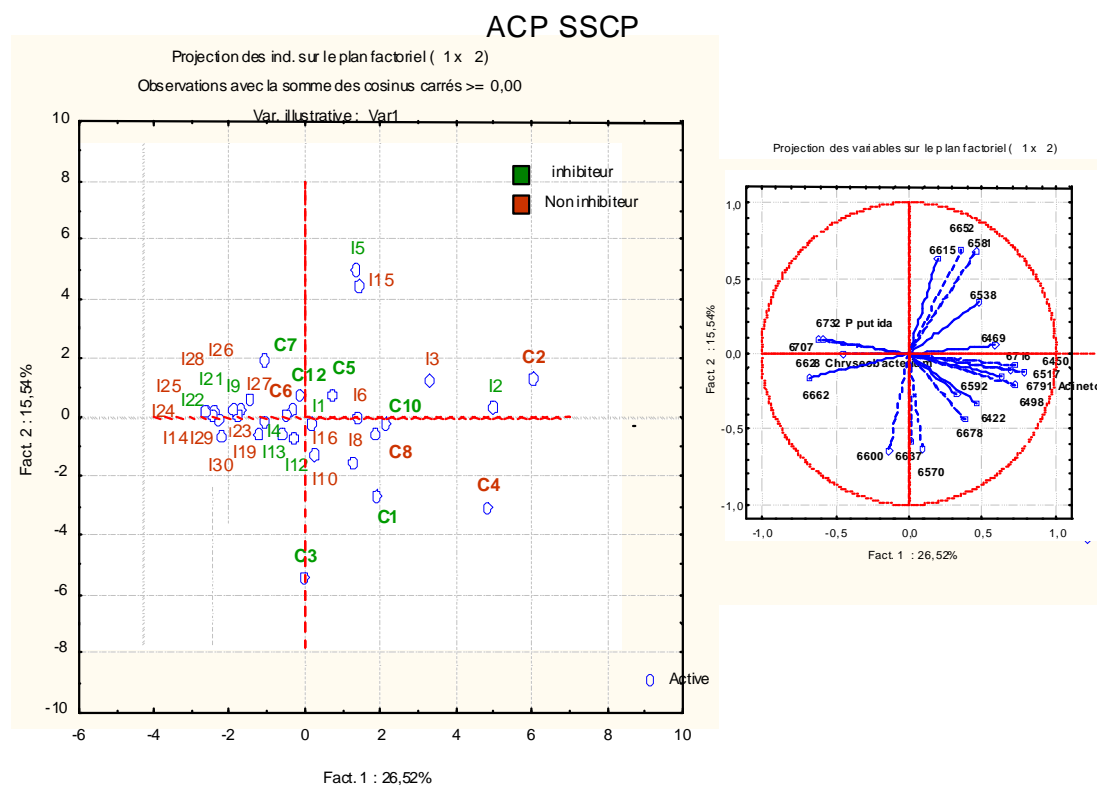


Figure 75 : Analyse en Composante principale des ratios de pics des profils SSCP V3 des laits inhibiteurs et non inhibiteurs de Carmejane (C1 à C12) et de l'ITPLC (I1 à I30).

La répartition des laits sur ces 2 axes montre une grande diversité de ces laits, sans séparation marquée des laits inhibiteurs et non inhibiteurs en fonction des ratios des pics des profils SSCP V3. Par contre, l'ACP montre que les laits de Carmejane sont différents des laits ITPLC sur la base des pics 6570 (non assigné), 6678 (assigné à *Enterococcus faecalis*), 6422 (non assigné), 6498 (assigné à *Corynebacterium casei*), 6517 (non assigné), 6791 (assigné à *Acinetobacter baumannii*).

Une grande variabilité des ratios des pics entre les laits inhibiteurs pour chaque série (Carmejane ou ITPLC) est observée. Cette analyse par SSCP ne donne pas une image quantitative des différentes populations mais un équilibre entre celles-ci. Cet équilibre semblerait fortement déterminé par la dominance ponctuelle des bactéries à Gram négatif qui ne permettrait pas de mettre en évidence des pics impliqués dans l'inhibition.

7.1.3 Identification des colonies sur milieu de Turner (Tableau 29)

Seules 3 colonies sur 45 ont été identifiées comme *Lactococcus lactis cremoris* dans le lait non inhibiteur de Carmejane et aucune ne correspond à *Lactococcus lactis lactis* ni à *Lactococcus garvieae*.

Dans les deux laits inhibiteurs de L'ITPLC, 55% et 67% des colonies ont été positives à l'amplification avec les amorces *Lactococcus lactis lactis* et 4,5% des colonies ont été identifiées comme *Lactococcus garvieae*.

Tableau 29 : Identification par PCR spécifiques des colonies sur les boîtes de dénombrement du milieu de Turner à 30°C de 1 lait non inhibiteur et de 2 laits inhibiteurs.

Laits	Inhibition	Nombre de colonies total	PCR spécifique <i>Lc lact lact/cremoris</i>	PCR spécifique <i>Lc garvieae</i>
C4	Non inhibiteur	45	3 positives à <i>Lc lact lact cremoris</i>	0
I21	Inhibiteur	22	12 positives à <i>Lc lact lact</i>	1
I1	Inhibiteur	49	33 positives à <i>Lc lact lact</i>	0

7.1.4 Quantification par PCR temps réel de *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus lactis cremoris* dans les laits et gels de lactofermentation

Les résultats obtenus lors de la mise au point de la méthode de quantification par PCR temps réel et relatifs à sa sensibilité et sa spécificité sont présentés en Annexe 4.13.

Aucune amplification des ADN de *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus lactis cremoris* n'a été obtenue par analyse en PCR quantitative des ADN extraits des 39 laits étudiés tant inhibiteurs que non inhibiteurs. Ces résultats laissent supposer que les lactocoques présents dans les laits sont en quantité inférieure ou égale au seuil de détection de la méthode qui est de 10^3 cellules/ml de lait (Annexe 4.13)

Cette hypothèse est validée par les résultats de dénombrement des flores des laits sur le milieu de Turner (§ 7.1.1). Les dénombrements totaux atteignent en effet des valeurs comprises entre $7,0 \cdot 10^1$ et $1,0 \cdot 10^3$ ufc/ml selon les laits, sachant que la totalité des microorganismes se multipliant sur ce milieu ne sont pas des lactocoques.

En ce qui concerne les gels de lactofermentation issus des laits, aucune amplification des ADN de *Lactococcus lactis cremoris* n'a été obtenue par analyse en PCR quantitative. Les résultats bruts de quantification (2 répétitions) des 2 espèces *Lactococcus garvieae* et *Lactococcus lactis lactis* dans les 39 gels de lactofermentation sont présentés en Annexe 4.14. Les quantités observées pour les deux répétitions dans chaque échantillon sont assez proches pour les deux espèces quantifiées et témoignent d'une bonne reproductibilité de la méthode. Les niveaux de *Lactococcus garvieae* détectés dans les gels varient de $1,3 \cdot 10^3$ à $1,8 \cdot 10^5$ cellules/ml alors que les niveaux de *Lactococcus lactis lactis* varient de $1,1 \cdot 10^5$ à $8,0 \cdot 10^9$ cellules/ml.

Les niveaux moyens des deux espèces *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus garvieae* quantifiés dans les gels inhibiteurs et non inhibiteurs de *S. aureus* ainsi que le pourcentage de gels amplifiés sont représentés sur la figure 76.

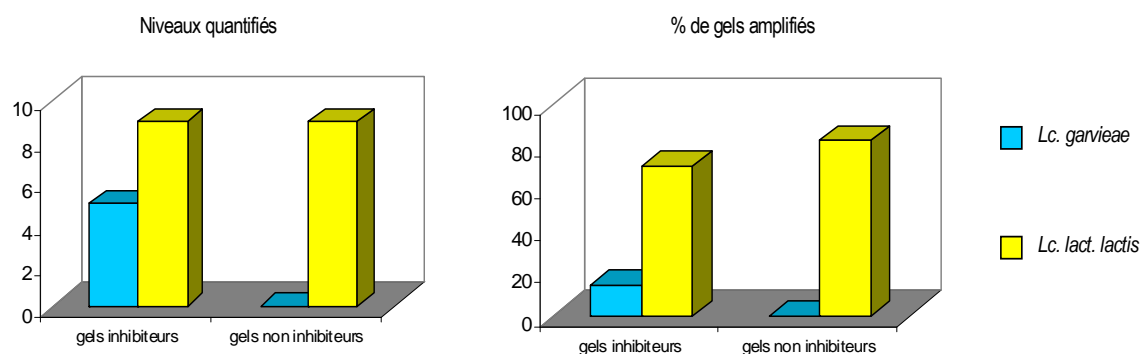


Figure 76 : Niveaux moyens de *Lc. lact. lactis* et *Lc. garvieae* quantifiés dans les gels inhibiteurs et non inhibiteurs de *S. aureus* et pourcentage de gels amplifiés pour les deux espèces

Les résultats montrent que l'ADN de *Lactococcus garvieae* a été détecté et quantifié uniquement dans quelques gels inhibiteurs, soit 14% des gels inhibiteurs analysés. A l'inverse, l'ADN de *Lactococcus lactis lactis* a été détecté et quantifié indifféremment dans les deux types de gels avec des concentrations moyennes nettement supérieures (10^9 ufc/ml) à celles de *Lactococcus garvieae*. De plus, une grande variabilité des équilibres entre *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus garvieae* a été observée. Ces équilibres ne varient pas en fonction du caractère inhibiteur ou non des gels vis-à-vis de *S. aureus*. Il n'y aurait donc pas de corrélation entre les concentrations de *Lactococcus lactis lactis* dans les gels et les propriétés inhibitrices de ces mêmes matrices.

Les flores *Lactococcus* des gels inhibiteurs et non inhibiteurs ont parallèlement été dénombrées sur le milieu de Turner pour essayer de valider les niveaux obtenus par PCR quantitative. Le manque de sélectivité du milieu et la diversité des flores dénombrées ont rendu difficile le dénombrement des lactocoques. De ce fait, seuls quelques gels ont pu être dénombrés. Dans ce cas, il est important de noter que les dénombrements classiques sur milieux de culture sont toujours un peu plus faibles que ceux obtenus par PCR quantitatives.

7.2 Détermination des teneurs en antimicrobiens naturels

Sur les laits collectés en 2004, il semble que les teneurs moyennes en lactoferrine soient supérieures dans les laits inhibiteurs de Carmejane à celles obtenues dans les laits de l'ITPLC. Ces teneurs sont également supérieures à celles obtenues dans les laits jugés comme non inhibiteurs (Tableau 30). Ces observations n'ont pas été confirmées en 2006 sur un moindre nombre de laits (Tableau 32).

Tableau 30 : Concentration en lactoferrine dans les laits testés en lactofermentation en 2004 selon leur potentiel d'inhibition vis à vis de *S. aureus*

Centre	Laits potentiellement inhibiteurs		Laits potentiellement non inhibiteurs	
	Identification du lait	Lactoferrine (en µg/ml)	Identification du lait	Lactoferrine (en µg/ml)
ITPLC	9	368	22	271
	15	288	27	362
	17	379	28	320
	20	325	30	302
	21	316	32	465
	35	250	33	369
	38	221	42	156
	41	156	44	318
	45	119		
		Moyenne	269	Moyenne
Carnejane	47	981	46	369
	48	270	55	364
	49	1143		
	52	1070		
	53	421		
		Moyenne	871	Moyenne

En ce qui concerne le système lactoperoxydase, on n'observe pas de différence entre laits inhibiteurs et non inhibiteurs (Tableaux 30 et 31). En revanche, on peut indiquer que le thiocyanate est en quantité relativement importante et ne constitue pas un facteur limitant.

Tableau 31 : Concentration en enzyme lactoperoxydase et en thiocyanate dans les laits jugés inhibiteurs ou non inhibiteurs de la croissance de *S. aureus* après test de lactofermentation en 2004 et 2005

Centre	Lait	Laits potentiellement inhibiteurs				Laits potentiellement non inhibiteurs				
		2004		2005		2004		2005		
		Lactoperoxydase (en µg/ml)	Thiocyanate (en µg/ml)	Lactoperoxydase (en µg/ml)	Thiocyanate (en µg/ml)	Lactoperoxydase (en µg/ml)	Thiocyanate (en µg/ml)	Lactoperoxydase (en µg/ml)	Thiocyanate (en µg/ml)	
ITPLC	9	10,6	6,7			9		4,7	7,9	
	15	5,0	7,1			15		5,9	9,1	
	17	8,6	7,7			17		5,3	8,2	
	20	12,3	8,4			20		5,3	9,8	
	21	8,2	8,6			21		6,6	7,9	
	33			4,9	11,3	22	7,5	10,4		
	35	6,3	9,6	5,7	11,5	27	8,2	10,0	7,2	9,9
	38	4,7	8,0	5,0	9,2	28	7,8	8,2	5,3	7,3
	41	6,3	14,4			30	8,3	11,3		
	45	3,9	8,3	3,7	9,5	32	10,7	8,3	8,1	9,3
						33	8,9	8,9		
						42	7,7	10,8		
						44	9,3	10,5		
		Moy.	7,3	8,8	4,8	10,4	Moy.	8,5	9,6	6,0
Carnejane	47	5,7	7,3			46	5,7	9,4	8,8	7,8
	48	9,2	8,5	5,2	6,8	53			6,8	14,7
	49	5,5	8,1	6,3	13,2	55	7,2	7,2		
	52	5,3	7,7	6,1	7,5					
	53	6,7	11,3							
		Moy.	6,5	8,6	5,9	9,1	Moy.	6,5	8,3	7,8

Tableau 32 : Mesure des teneurs en lactoferrine, lactopéroxydase et thiocyanate dans les laits de fabrication mis en oeuvre en 2006 selon leur potentiel d'inhibition vis à vis de *S. aureus*

Centre	Lait	Potentiel inhibiteur	Laits ayant servi aux fabrications de type présure			Laits ayant servi aux fabrications de type lactique		
			Lactoferrine (en µg/ml)	Lactoperoxydase (en µg/ml)	Thiocyanate (en µg/ml)	Lactoferrine (en µg/ml)	Lactoperoxydase (en µg/ml)	Thiocyanate (en µg/ml)
ITPLC	9	I	124	9,8	8,9	131	7,3	9,2
			91	9,3	9,6	172	9,2	10,0
	28	I	165	4,6	9,4	176	6,0	8,9
			142	5,6	8,8	210	8,2	9,2
	15	NI	194	7,8	10,4	135	8,4	14,8
			175	9,1	9,9	141	10,8	15,8
Carnejane	49	I	136	8,3	12,1	255	6,0	14,5
	46	NI	109	6,7	11,2	ND	ND	ND

I : inhibiteur ; NI : non inhibiteur ; ND : non déterminé (échantillon déstabilisé)

C. Discussion et conclusions

Mise en évidence de l'existence d'écosystèmes laitiers naturellement inhibiteurs de S. aureus

Grâce à une sélection de troupeaux approfondie et au terme d'une phase de prospection initiale sur les laits de 55 troupeaux, des laits ont été jugés potentiellement inhibiteurs. Leur fréquence est relativement élevée : 6 laits identifiés soit de l'ordre de 10 % des laits préalablement sélectionnés sur leurs historiques de contamination par *S. aureus*. Ces résultats sont conformes aux attendus initiaux du programme d'étude et permettent d'attester de l'existence d'écosystèmes laitiers naturellement inhibiteurs de *S. aureus*.

Quatre des six laits considérés comme les plus prometteurs en 2004 ont permis de limiter la croissance tant des souches natives de *S. aureus* que de la souche inoculée expérimentalement. Les résultats rapportés au Chapitre 1 sur le typage des souches font état à la fois de l'existence d'un microbisme spécifique à chaque exploitation et, simultanément, de la présence de plusieurs types de souches de *S. aureus* présents conjointement dans les laits et/ou les fromages. Il est donc de l'intérêt des transformateurs tant industriels que fermiers de disposer de laits dont le potentiel inhibiteur soit le moins possible dépendant des souches de *S. aureus* en présence. Le choix et l'étude de laits « polyvalents » semblent par conséquent devoir être privilégiés.

La mise en évidence du potentiel inhibiteur a nécessité la mise au point préalable d'un test de lactofermentation spécifique : inoculation par une souche de *S. aureus* à raison de 100 ufc/ml et incubation 24h à 27°C. Lors de leur mise en oeuvre, la viabilité de la souche inoculée a pu être vérifiée grâce à l'inoculation de lait G, stérile. Dans ces laits, l'absence d'autres micro-organismes est en effet favorable à la croissance de *S. aureus*, considéré comme un mauvais compétiteur (Mossel et Van Netten, 1990). Les niveaux de contamination (de l'ordre de 10⁷ à 10⁸ ufc/ml) atteints 24 heures après inoculation correspondent à ceux observés par Lamprell (2003) et ont permis de valider les conditions d'inoculation. La contamination initiale des laits, parfois élevée, a en revanche pu interférer avec la croissance de la souche marquée. Une possible compétition entre souches natives et souche inoculée a, de fait, été évoquée à plusieurs reprises au cours de l'étude. Bien qu'ayant permis de statuer sur les qualités inhibitrices des laits vis-à-vis de *S. aureus*, les tests de lactofermentation ont montré leurs limites. En particulier, ils ne permettent qu'une appréciation qualitative du potentiel inhibiteur des laits (classement comparatif) et sont, toutes proportions gardées, moins informatifs sur les cinétiques de croissance en fabrications lactiques qu'en fabrications de type présure.

Observation d'un potentiel inhibiteur d'expression variable selon les laits et au cours du temps

Les mécanismes d'inhibition mis en jeu dans les laits identifiés sont variés comme le suggèrent leurs profils d'acidification. On peut suspecter pour les laits à acidification rapide, une inhibition due à la flore lactique acidifiante et/ou à l'acide lactique produit. Les observations réalisées antérieurement par Le Mens *et al.*, (1999) vont dans ce sens. En ce qui concerne les laits à acidification lente, l'inhibition pourrait être due à la flore lactique (aromatisante ou acidifiante), indépendamment de l'acidification proprement dite et/ou à la présence de composés chimiques (inhibiteurs naturels en particulier). Malgré le rôle effectif de l'acidification pour limiter la croissance de *S. aureus* (Meyrand *et al.*, 1999 ; Delbes *et al.*, 2006), le caractère inhibiteur des laits n'est pas toujours lié à leur capacité acidifiante ce que constatent Stecchini *et al.* (1991) et confirment Alomar *et al.* (2008). L'évolution des courbes d'acidification au cours du temps n'est pas non plus prédictive des changements d'expression du potentiel inhibiteur.

Le potentiel inhibiteur des laits est, de fait, susceptible de varier d'une lactation à une autre, voire au sein d'une même campagne. De nombreux changements surviennent en pratique d'une campagne de lactation à une autre. Ils incluent des mouvements d'animaux (réforme de 25 % en moyenne de l'effectif caprin) mais aussi des changements de pratiques ou de matériel pouvant induire des modifications significatives des équilibres microbiens ainsi que le suivi de la dynamique des écosystèmes laitiers à la Station du Pradel l'a mis en évidence. Sur le plan pratique, la variabilité du potentiel inhibiteur au cours du temps constitue un frein à la recherche des laits inhibiteurs et à leur étude, en raison notamment de la nécessité de vérifier régulièrement leur statut avant tout essai les impliquant. Elle renvoie également à la nécessité de poursuivre les travaux concernant l'identification et la hiérarchisation des facteurs de variation des écosystèmes.

*Validation et expression du potentiel inhibiteur en transformation : des conséquences sur la croissance de *S. aureus* et corrélativement sur la production d'entérotoxines*

L'existence de laits de troupeaux naturellement inhibiteurs, observée lors des tests de lactofermentation, a été confirmée en fabrications de type présure et lactique.

Les pics de population maximale en *S. aureus* sont observés à J+1 et généralement J+2 (sauf exception) en fabrications présure et lactique respectivement. A J+1, dans le cas des fromages de type présure, on se situe au démoulage avec généralement un classique facteur de concentration des *S. aureus* du lait au fromage (Lamprell, 2003). En revanche, J+1 pour les fromages lactiques correspond au moulage et le prélèvement correspondant est constitué d'une partie de coagulum et d'une partie de lactosérum moins concentrée en *S. aureus*. La population maximale de *S. aureus* n'est donc observée qu'ultérieurement, 48 heures après l'emprésurage, ce qui correspond, comme pour les fabrications de type présure, au démoulage.

Les croissances observées ($\log(S. aureus \text{ à } J+1) - \log(S. aureus \text{ dans le lait à l'inoculation à } J0)$) pour la souche caprine de type C sont de 3 à 4 log en fabrication présure. Un dépassement du seuil de 10^6 ufc/g est donc possible à la suite d'une inoculation à 10^2 ufc/ml. Cette croissance est comparable à celle observée par Delbes *et al.*, (2006) pour des souches natives en fabrication au lait cru de Salers et Saint Nectaire. Les croissances observées en fabrications lactiques sont plus faibles, de l'ordre de 1 à 2 log.

Le recours à des laits inhibiteurs permet de limiter la croissance de *S. aureus* d'environ une à trois unités logarithmiques par rapport à celle qui pourrait être observée dans des laits non inhibiteurs. Ce phénomène d'inhibition est plus marqué en fabrication présure (y compris dans les conditions les plus à risque, c'est-à-dire à 36°C et en présence d'une faible quantité de ferments) qu'en fabrication lactique. Il

permet le plus souvent de maintenir la population de *S. aureus* en deçà de 10^5 ufc/ml. Ce seuil maximum (M) est celui désormais retenu pour les fromages au lait cru dans le règlement (CE) N° 2073/2005 du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. L'analyse doit être réalisée au pic de population jugé maximum ($m = 10^4$ ufc/g, $M=10^5$ ufc/g, nombre d'échantillons analysés égal à 5, nombre maximal de résultats entre m et M égal à 2). Au-delà de 10^5 ufc/g, le fromage doit faire l'objet d'une recherche d'entérotoxines. Delbes *et al.* (2006) ont ainsi mis en évidence la synthèse d'entérotoxines dans certains fromages au lait cru présentant une population de *S. aureus* de 5,06 log à J+1.

Dans la présente étude, des entérotoxines n'ont été trouvées que dans les fromages de type présure, fabriqués à partir d'un lait non inhibiteur, après inoculation d'une souche entérotoxigène de type A (biotype non connu) à raison de 1000 ufc/ml et pour une population maximale de *S. aureus* ayant atteint plus de $1,1 \cdot 10^6$ ufc/g. Dans des conditions équivalentes (même lait inoculé, même taille d'inoculum, technologie fromagère identique) mais en recourant cette fois à une souche entérotoxigène de type C, aucune entérotoxine n'a pu être mise en évidence malgré une contamination élevée (plus de 10^6 ufc/g) des fromages. Ces résultats confirment le caractère entérotoxigène plus marqué des souches de type A comparativement aux souches de type C (Lamprell, 2003). Dans les fromages lactiques, les niveaux atteints étaient inférieurs à 10^5 ufc/g. Le pic de *S. aureus* est en outre généralement obtenu à J+2, c'est-à-dire à un pH déjà très acide (4,40). Or, selon Halpin Dohnalek et Marth (1989), Lindqvist *et al.* (2002), Zeconi *et al.* (2006), les toxines semblent n'être produites qu'à pH supérieur à 5,15. La production de toxines est également dépendante d'autres paramètres tels que la température, le taux d'eau libre, le taux de sel, la disponibilité des nutriments ou encore le potentiel rédox. Meyrand *et al.* (1999) rendent compte de ces différents aspects et montrent que la production de toxines est moindre en milieu complexe tel que le fromage qu'en milieu de synthèse. Selon Cachon *et al.* (2002), des évolutions différentes de potentiel redox du lait peuvent être observées selon les genres bactériens présents. Le potentiel redox chute par exemple plus rapidement avec les lactocoques. Ce phénomène peut avoir une incidence sur la production de toxines, limitée en milieux réducteurs tels que les fromages (Aubert *et al.*, 2002 cités par Lamprell, 2003). Dans ce contexte et compte tenu des conditions de fabrication, les risques d'entérotoxigénèse semblent limités en fabrications lactiques. Ils pourraient toutefois concerner quelques laits jugés non inhibiteurs présentant un pic proche de 10^5 ufc/g à J+1 (au moulage), si l'acidification est trop lente ou peu intense.

L'inhibition observée apparaît de façon précoce et permet de réduire le pic de population maximale, résultats non obtenus dans des études antérieures en recourant à des bactériocines ou des bactéries bactériocinogènes. L'activité antimicrobienne des bactériocines produites par les bactéries lactiques acidifiantes communément rencontrées dans les laits crus et les fromages a été mise en évidence à de multiples reprises (Stecchini *et al.*, 1991 ; Todorov *et al.*, 1999 ; Hernandez *et al.*, 2005 ; Akçelik *et al.*, 2006). Pour autant, l'efficacité de la production de bactériocines sur la réduction de la contamination des fromages par *S. aureus* est le plus souvent peu documentée et insuffisamment quantifiée. Etudiant l'inhibition induite par la nisine produite par *Lactococcus lactis* sur les bactéries pathogènes habituellement incriminées dans les intoxications alimentaires, Arques *et al.* (2004) ont décrit une faible réduction de *S. aureus* suivie d'une reprise de croissance de la population bactérienne. Ces auteurs précisent qu'une résistance de *S. aureus* à la nisine peut apparaître. Un couplage avec une autre bactériocine (reuterine) peut néanmoins y remédier. Les bactériocines sont généralement moins actives sur *S. aureus* que sur *Listeria monocytogenes* et les quantités efficaces sont doses dépendantes (fonction du nombre de *S. aureus* présents). Par ailleurs, un temps d'action minimum est nécessaire aux bactériocines pour permettre une décroissance de la population de *S. aureus* dans le produit laitier sans écarter pour autant les risques au pic maximum de croissance (Benkerroum *et al.*, 2002 ; Arques *et al.*, 2004 ; Hamama *et al.*, 2002). A titre d'illustration, pour des fromages à pâte pressée saumurés puis conservés sous vide (Arques *et al.*, 2005), la décroissance du niveau de *S. aureus* diffère entre

fromages sans et avec bactéries productrices de bactériocines uniquement à partir de 20 jours de conservation (1 log d'écart maximum entre l'essai et le témoin).

Au delà du pic de croissance, une diminution de la population de *S. aureus* a été observée de façon plus ou moins marquée selon les laits (inhibiteurs vs non inhibiteurs) et les technologies (présure vs lactique). Elle varie de 0 à 2 log d'ufc/g. Simultanément, le pH passe en moyenne de 4,75 à J+1 à 4,50 à J+3 puis à 5,5-5,7 à J+15 en fabrications de type présure et de 4,35 à J+1 à 4,45 à J+3 puis 5,0 à J+15 en fabrications lactiques. A l'inverse, pour des fromages à pâte pressée non cuite tels que Reblochon ou Tomme de Savoie où le pH ne descendait pas en dessous de 5, Lamprell n'a pas observé de décroissance de la population de *S. aureus* entre J+1 et J+15.

L'incidence des effets « seuils » et « souches » diffère selon les essais. En lactofermentations, la croissance des souches de *S. aureus* semble d'autant plus limitée que la taille de l'inoculum est plus élevée. En fabrications, les essais conduits à l'ITPLC semblent témoigner d'un effet seuil. Il semble alors qu'au-delà de 1000 ufc/ml, les laits inhibiteurs ne soient plus en mesure de jouer un rôle suffisant pour limiter la croissance de la population de *S. aureus* et obtenir des produits conformes sur le plan réglementaire. Ces observations demanderaient à être validées et confirmées. Néanmoins et conformément aux observations réalisées sur le terrain, la prévention en élevage (gestion de la santé animale) reste un élément clé de la maîtrise de la contamination des laits et des fromages qui en sont issus et prime sur toute action en fabrication.

*Caractérisation des laits inhibiteurs :
des mécanismes d'action complexes impliquant des investigations complémentaires*

Différentes analyses ont été réalisées en vue de caractériser les laits considérés comme inhibiteurs. Les dénombrements microbiens et les analyses moléculaires SSCP des laits n'ont pas permis de mettre en évidence de différences marquées entre les laits inhibiteurs et non inhibiteurs ou entre les laits testés à Carmejeane et à l'ITPLC. Cependant quelques tendances semblent se dégager.

De façon globale, les laits de Carmejeane se distinguent par des niveaux d'entérocoques et de levures plus importants que ceux de l'ITPLC. Plus généralement, les deux centres d'essais sont situés dans deux bassins de production distincts, caractérisés par des structures et des pratiques d'élevages différentes. En régions Poitou-Charentes et Centre, les élevages dont le lait est collecté sont majoritaires. Il s'agit le plus souvent d'élevages de grande taille (plus de 100 à 150 chèvres par exploitation), en zéro-pâturage. En zone AOC Banon, les élevages fermiers sont proportionnellement plus nombreux. Les tailles de troupeaux sont plus limitées, le recours au pâturage ou au pastoralisme plus fréquent. Enfin, les niveaux d'exigence des entreprises laitières sont d'autant plus élevés que les produits commercialisés (fabrication de type présure) sont effectivement sensibles et les risques de non conformité importants en cas d'absence de maîtrise de la contamination initiale des laits. De fait, les laits testés à Carmejeane ont généralement présenté des niveaux de contamination par *S. aureus* inférieurs à ceux des laits testés à l'ITPLC. Ces différents éléments concourent vraisemblablement, directement ou indirectement (application de mesures d'hygiène, modification des pratiques de traite, soins portés aux trayons, orientation des réformes,...), à l'obtention d'écosystèmes laitiers différents.

Parmi les laits collectés à Carmejeane, les laits inhibiteurs se différencient des laits non inhibiteurs par des niveaux de levures et de lactocoques plus importants. L'identification des colonies sur le milieu de Turner étaye l'hypothèse selon laquelle les laits inhibiteurs seraient plus chargés en lactocoques et plus particulièrement en *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus garvieae*.

Partant de ce constat, une méthode de quantification des lactocoques dans les produits laitiers par PCR en temps réel a été développée pour *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris* et *Lactococcus garvieae* et appliquée aux laits et aux gels de lactofermentation qui en étaient issus. Sur les laits, aucune amplification des ADN provenant de ces espèces bactériennes n'a été obtenue, conséquence vraisemblable de concentrations inférieures à 10^3 cellules/ml, seuil de détection de la méthode. Dans ces conditions, l'application de la PCR temps réel aux laits crus de chèvre apparaît difficile. Ortigosa *et al.* (2001) pour le lait de brebis, Mas *et al.* (2002), Manolopoulou *et al.* (2003) pour le lait de chèvre rapportent quant à eux des concentrations supérieures de lactocoques mais obtenus sur milieu M17 : 4,18, 5,11 et 5,18 log cfu/g respectivement. Or, le milieu M17 est considéré comme moins sélectif que les milieux de Turner ou Elliker même si selon Mas *et al.* (2002) le milieu M17 permet le développement préférentiel des lactotocoques (64 % des isolats).

Le développement privilégié des souches potentiellement inhibitrices pendant les 24 heures de lactofermentation permet l'obtention de concentrations compatibles avec les seuils de sensibilité des analyses PCR et facilite de fait la détection des lactocoques ciblés dans les gels correspondants. *Lactococcus garvieae* a ainsi été mis en évidence dans quelques gels, tous issus de laits considérés comme inhibiteurs. *Lactococcus lactis lactis* a été détecté plus largement aussi bien dans les gels de laits inhibiteurs que non inhibiteurs. Sur le plan quantitatif, aucun lien n'a pu être établi entre le potentiel inhibiteur des laits et les niveaux de *Lactococcus lactis lactis* dans les gels. Ces résultats incitent à formuler plusieurs hypothèses :

- sur le caractère souche-dépendant des propriétés inhibitrices des bactéries ;
- sur la précocité de l'expression du potentiel inhibiteur des laits ;
- sur les mécanismes d'action en jeu dans l'inhibition.

De fait, la capacité de *Lactococcus lactis* à limiter la croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines est avérée par Haines et Harmon (1973) et plus récemment par Akçelik *et al.* (2006), Psoni *et al.* (2007). L'efficacité de souches de *Lactococcus lactis lactis* pures (vs un ferment classique) sur la croissance des souches natives de *S. aureus* a été rapportée par Gonzales *et al.* (2003) en fabrication de fromage Iborens au lait cru mais apparaît variable. La production de bactériocines est également inconstante et souche-dépendante (Casla *et al.*, 1996 ; Haines et Harmon, 1973). Mise en évidence par Akçelik *et al.* (2006) en ce qui concerne *Lactococcus lactis*, ou par Villani *et al.* (2001) en ce qui concerne *Lactococcus garviae*, la présence de substances antimicrobiennes dans les surnageants de culture n'est ainsi détectée ni par Ammor *et al.* (2006), ni par Alomar *et al.* (2008). Enfin le spectre d'activité des bactériocines lorsqu'elles sont produites diffère selon les souches productrices. Celui de la garviecin L1-5 produite par *Lactococcus garviae* est large (Villani *et al.*, 2001), des souches proches de la souche productrice mais également des espèces très différentes telles *Listeria monocytogenes* et *Clostridium* spp. pouvant être inhibées. Le spectre d'activité n'inclut cependant pas *Staphylococcus aureus* à la différence de la nisine et de la lacticin 481 (Akçelik *et al.*, 2006) produites par des souches de *Lactococcus lactis lactis*.

Dans le cadre de cette étude, l'expression du potentiel inhibiteur des laits a parfois été observée très précocement. Dans ce cas, la réalisation d'analyses à 24 heures, en fin de lactofermentation, ne rend pas compte de la cinétique d'évolution des populations bactériennes et des changements opérés dans les équilibres microbiens et s'avère en définitive d'un intérêt limité.

La compréhension du rôle de *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus garvieae* dans l'inhibition de la croissance de *S. aureus* demande par conséquent des investigations à plus grande échelle, en s'appuyant sur un plus grand nombre de comparaisons entre laits (gels) inhibiteurs et non inhibiteurs et en réalisant des quantifications plus précoces.

Les travaux de Haines et Harmon (1973), Akçelik *et al.* (2006), Psoni *et al.* (2007), Alomar *et al.* (2008) illustrent bien la complexité et la diversité des mécanismes impliqués dans l'inhibition. Outre, l'abaissement du pH et la possible production de bactériocines, la compétition microbienne vis-à-vis des nutriments présents dans le milieu est amplement décrite dans la littérature comme susceptible de jouer un rôle inhibiteur (Dacosta, 2000 ; Haines et Hamon, 1973 ; Lincoln *et al.*, 1995 ; Onoue et Mori, 1997) mais n'a pas pu être mise en évidence lors d'interactions *Lactococcus* - *S. aureus* en lait microfiltré (Alomar *et al.*, 2008).

Enfin, l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par de nombreuses bactéries lactiques (*Lactobacillus* spp, *Leuconostoc* spp, *Lactococcus lactis lactis*) peut induire une réduction significative de la concentration en bactéries pathogènes et notamment de *S. aureus* (Haines et Harmon, 1973 ; Ito *et al.*, 2003). Au delà de son pouvoir antimicrobien propre, le peroxyde d'hydrogène intervient aussi via l'activation du système lactoperoxydase – thiocyanate.

Le système lactoperoxydase - thiocyanate est en effet dépendant non seulement de l'alimentation (augmentation, par exemple, du thiocyanate avec une alimentation comportant des crucifères), de la période de lactation mais aussi des bactéries présentes dans le lait (Zapico *et al.*, 1991). En présence de H_2O_2 , la lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate induisant la production d'hypothiocyanate. Oxydant sélectif, cet anion présente un pouvoir bactéricide vis-à-vis des bactéries Gram négatif et plutôt bactériostatique vis-à-vis des bactéries Gram positif (Piard et Desmazeaud, 1991). Ce faisant, le système lactoperoxydase – thiocyanate est considéré comme efficace contre *S. aureus* (Piard et Desmazeaud, 1991) ; H_2O_2 l'est également (Dhiya et Speck, 1968) même s'il semble être plus intéressant contre des germes tels que *Brucella*, *E. coli* et *Listeria* en lait de chèvre (Seifu *et al.*, 2004). Le rôle des inhibiteurs naturels doit par conséquent être envisagé concomitamment à celui des microorganismes.

Parmi les molécules à activité antimicrobienne présentes dans le lait, la lactoferrine a également été analysée et quantifiée dans la présente étude. Des différences de concentrations ont été observées dans les différents laits testés sans que l'on puisse évaluer leur implication exacte dans les phénomènes d'inhibition de *S. aureus*. Au delà du caractère souche dépendant de la sensibilité à la lactoferrine (Lee *et al.*, 2004, Kutila, 2005), celle-ci est également *a priori* plus efficace sur des bactéries Gram négatif tels que *E. coli* ou *P. aeruginosa* (Kutila, 2005) que sur des bactéries Gram positif comme *S. aureus*. Son rôle reste donc à préciser.

Des modifications de paramètres physicochimiques par les lactocoques tels que le potentiel redox (Cachon *et al.*, 2002) ont été proposées pour expliquer en partie le potentiel inhibiteur d'écosystèmes. D'autres molécules synthétisées par les bactéries présentes dans le lait pourraient également participer à l'effet inhibiteur observé pour certains laits. Piard et Desmazeaud (1991) précisent qu'outre le phénomène d'acidification essentiellement lié à la production d'acide lactique, d'autres acides organiques faibles ayant un pKa plus haut que celui de l'acide lactique (et donc présents sous forme protonée, forme la plus active, en plus forte proportion), présentent un effet inhibiteur supérieur à celui de l'acide lactique. Ils citent pour exemple l'acide acétique (pKa de 4,75 contre 3,86 pour l'acide lactique) pouvant être produit à la fois par certaines bactéries lactiques homofermentaires (en conditions défavorables) et hétérofermentaires et plus actif que l'acide lactique contre *S. aureus* (Daly *et al.*, 1972). De même, d'autres substances telles que l'acétaldéhyde (et le diacetyl dans une bien moindre mesure) pourraient également inhiber *S aureus* : 10 à 100ppm sont nécessaires et peuvent être produits par les bactéries lactiques telles que *Lactobacillus bulgaricus*. La présence de ces molécules ainsi que les mécanismes de production y afférents n'ont pas été étudiés dans le cadre de cette étude.

D. Conclusions et perspectives

Les travaux engagés sur les écosystèmes laitiers inhibiteurs se sont avérés prometteurs tant par le nombre de laits identifiés sur leur capacité à limiter la croissance de *S. aureus* que par l'amplitude de l'inhibition constatée en fabrication, notamment de type présure, considérée comme la plus sensible. Néanmoins, la variabilité du potentiel inhibiteur ne permet pas à ce stade de cibler les exploitations dont proviennent les laits dans le but d'en décrire les pratiques et d'identifier celles qui permettraient d'orienter favorablement les écosystèmes. Une étude plus complète des facteurs de variation des écosystèmes des laits doit être poursuivie pour mieux comprendre et, le cas échéant contrôler, l'origine des évolutions constatées.

La comparaison des caractéristiques des laits inhibiteurs et non inhibiteurs a permis de formuler plusieurs hypothèses quant à l'éventualité d'un rôle conjoint des lactocoques et des molécules à activité antimicrobienne dans l'activité inhibitrice. Cependant les premiers résultats obtenus à l'issue du développement des outils moléculaires de quantification des espèces de lactocoques *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus lactis cremoris* n'ont pas permis d'établir de lien entre l'inhibition de *S. aureus* dans les gels et le niveau de *Lc. lact. lactis* et le rôle de *Lc. garvieae*, plus fréquent dans les gels inhibiteurs et à un niveau plus élevé reste à confirmer. Après vérification de ces données à plus grande échelle (comparaison d'un plus grand nombre de gels inhibiteurs ou non), d'autres hypothèses devront par conséquent être formulées. Les études ultérieures devront notamment prendre en compte le caractère souches dépendant des propriétés inhibitrices de *Lactococcus* et la précocité des effets inhibiteurs des laits vis-à-vis de *S. aureus* qui implique la réalisation d'une quantification dans les premières heures de lactofermentation. La lourdeur des tests d'évaluation de l'aptitude inhibitrice des laits (recours à des inoculations expérimentales) rend délicate leur généralisation. Faute de disposer d'indicateurs simples pour cibler les laits potentiellement inhibiteurs, de nouvelles approches méthodologiques semblent devoir être envisagées. Elles pourraient s'appuyer sur l'inventaire et l'analyse des capacités inhibitrices des populations microbiennes isolées à partir des laits reconnus comme inhibiteurs.

Les gels provenant des laits inhibiteurs pourraient également être réutilisés en tant que ferments en fabrications et leur activité inhibitrice sur *S. aureus* évaluée.

De façon plus globale, la maîtrise de la qualité sanitaire des laits et des produits semble devoir être traitée par le biais de plusieurs voies complémentaires. La maîtrise de la contamination de la matière première et par conséquent la gestion sanitaire du cheptel constituent un préalable indispensable. Au delà, il convient de s'interroger sur les flux microbiens en élevage (origine, transmission, dynamique au cours du temps), sur les leviers d'action disponibles en amont (incidence de pratiques d'élevage susceptible d'influer significativement sur les populations microbiennes, voire sur l'orientation des écosystèmes) et en aval (recours à des ferments, à des bactériophages spécifiques,...) de la production.

Bibliographie

- Aarestrup, F.M., Dangler, C.A., Sordillo, L.M. (1995) Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Can. J Vet Res.*;59:124-128.
- Abee T., Krockel L., Hill C. (1995) Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.*, 28, 169-185.
- Abu-Samra M.T., Elsanousi S.M., Abdalla M.A., Gameel A.A., Abdel Aziz M., Abbas B., Ibrahim K.E., Idris S.O. (1988) Studies on gangrenous mastitis in goats, *Cornell. Vet.*, 78, 3, 280-300.
- Adams DS, Mc Donald JS, Hancock D, Mc Guire TC, 1988. staphylococcus aureus antigens reactive with milk immunoglobulins G of naturally infected dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 26 : 1175-1180.
- Akçelik O., Tükel C., Ozcengiz G., Akçelik M. (2006) Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Mol Nutr Food Res.*, 50(3), 306-313.
- Alawa J. P., Ngele M. B., Ogwu D. (2000) Chronic caprine mastitis in Nigerian goat breeds: microbiological flora and histopathological findings. *Small Rum. Res.*, 35 (3), 203-207.
- Alhendi A.B., al-Sanhousi S.M., al-Ghasnawi Y.A., Madawi M. (1993) An outbreak of abscess disease in goats in Saudi Arabia, *Zentralbl Veterinarmed*, 40, 9-10, 646-651.
- Alomar J., Loubiere P., Delbes C., Nouaille S., Montel M.C. (2008) Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiol.*;25(3) : 502-508.
- Althaus R.L., Molina M.P., Rodriguez M., Fernandez N. (2001). Analysis time and lactation stage influence on lactoperoxidase system components in dairy ewe milk. *Journal of Dairy Science* 84,1829-1835
- Ameh J. A., Tari I. S., (2000) Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. *Small Rum. Res.*, 35(1), 1-5.
- Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17 (6), 454-461.
- Arihara K., Ota H., Itoh M, Sameshima T., Yamanaka H., Akimoto M., Kanai S., Miki T. (1998) *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation, *J. Food Sci.*, 63, 3, 544-547.
- Arques JL Nunez M, Medina M, Rodriguez E (2004) Synergetic effect of reuterin in combination with nisin on *Staphylococcus aureus* in milk, *Michwissenshaft* 59 (7/8), 373-375.
- Arques JL, Rodriguez E, Gaya P, Medina M, Guamis B, Nunez M (2005) Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 98,254-260.
- Arslan S, Uraz G (2005) Inhibitory activity of natural isolates of lactic acid bacteria from raw milk against hazardous microbes. *Milchwissenschaft*, 60(1), 31-33.
- Aubert C, Capelle N, Jeanson S, Eckert H, Divies C, Cachon R (2002) Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Sciences des aliments*, 22, 177-187.
- Avci G., Sel T. (2004). Milk and serum lactoferrin levels in Angora goats during lactation period. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 51, 181-187.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. (1990) Yeasts : Characteristics and identification, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Baudry Ch., Mercier P., Mallereau M-P, Lenfant D., (2000) Evaluation de l'efficacité du post trempage chez la chèvre. *Rev. Med. Vet.*, 151 (11) : 1035-1040

- Beimfohr C., Ludwig W., Schleifer K.H. (1997) Rapid Genotypic Differentiation of *Lactococcus lactis* Subspecies and Biovar, *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 216-221.
- Benkerroum N, Oubel H, Ben Mimoun L (2002) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in yogurt fermented with a bacteriocin producing thermophilic starter. *J Food Protec* 65(5) 799-805.
- Bergonier D, Berthelot X, Lagriffoul G, de Cremoux R, Rupp R. (2002) Etiologie et épidémiologie des mammites non mycoplasmiques des petits ruminants, *Le Point Vétérinaire.*, 33 (Pathologie ovine et caprine) : 40-45.
- Bergonier D, de Cremoux R, Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X., (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, 34, 689-716.
- Bergonier D., Berthelot X., Romeo M., Contreras A., Coni V., De Santis E., Rolesu S., Barillet F., Lagriffoul G., Marco J., (1999) Fréquence des différents germes responsables de mammites cliniques et subcliniques chez les petits ruminants laitiers, *Proceeding of the 6th International Symposium on the Milking of Small Ruminants, Athens, September 26 – October 1 1998*, 130-136.
- Berthier F., Beuvier E., Dasen A., Grappin R. (2001) Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers, *Int. Dairy J.* 11, 293-305.
- Beuvier E., Arnould C., Rolet-Répécaud O., Lefrileux Y., de Cremoux R., Dupont D. (2007) Sandwich ELISA for goat lactoferrin quantification in milk during lactation. *IXth International Conference on AgriFood Antibodies (ICAFA), 10–13 September 2007, Oslo, Norvège.*
- Bockelmann W, Hoppe-Seyler T (2001) The surface flora of bacterial smear ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int Dairy J*, 11(4/7), 307-314.
- Cabral KG, Lämmle C, Zschöck M, Langoni H, de Sá ME, Victória C, Da Silva A. (2004) Pheno- and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can J Microbiol.* 50(11):901-9.
- Cachon, R., Jeanson, S, Aldarf M, Diviès, C (2002) Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, 82, 281-288
- Callon C., Delbès C., Duthoit F., Montel M.C. (2006) Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses, *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 172-180.
- Callon C., Millet L., Montel M.C. (2004) Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese, *J. Dairy Res.* 71, 231-244.
- Capellas M, Mor-Mur M, Gervilla R, yuste J, Guamis (2000) Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese; *Food Microbiol.*,17(6) 633-641.
- Casla D., Requena T, Gómez R. (1996)Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105. *J Appl Bacteriol.*;81(1), 35-41.
- Chatelin Y.M., Richard J. (1981) Etudes de quelques cas de contaminations microbiennes importantes du lait à la ferme. *Lait*, 61, 80-94.
- Chatelin Y.M., Richard J., Escude M.J., Braquehay C., Chalard J.P., Lenevanen J.P. (1983)Comparaison, dans des conditions courantes, de l'efficacité de quatre méthodes de nettoyage des machines à traire. *Le Lait*, 63, 87-101.
- Chen P.W., Chen W.C., Mao F.C. (2004). Increase of lactoferrin concentration in mastitic goat milk. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 345-350.
- Chen P.W., Mao F.C. (2004) Detection of lactoferrin in bovine and goat milk by enzyme-linked-immunosorbent assay. *Journal of Food and Drug Analysis*, 12, 133-139.

- Cibick R., Lepage E., Tailliez P. (2000) Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional french cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification, *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 267-78.
- Cintas L.M., Casaus P., Fernandez M.F., Hernandez P.E., (1998) Comparative antimicrobial activity of enterocin 50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria, *Food Microbiol.*, 15, 3, 289-298.
- Contreras A., Corrales J.C., Sanchez A., Sierra D., (1997). Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. *Journal of Dairy Science.* 80, 2815-2819.
- Crass B.A., Bergdoll M.S. (1986) Toxin involvement in toxic shock syndrome. *J Infect Dis.*;153(5), 918-926.
- Cremoux (de) R., Heuchel V., Chatelin Y-M. (2001) Evaluation de stratégies de contrôle des comptages de cellules somatiques des laits de mélange en élevage caprin. *Renc. Rech. Ruminants*, 8, 157-160.
- Cremoux (de) R., Poutrel B., (2000) Les numérations cellulaires chez la chèvre : un outil de diagnostic présomptif des infections mammaires. *Proceedings of the 7th International Conference on goats, Tours, 15 - 21 mai 2000*, 757-760.
- Cremoux (de) R., Poutrel B., Berny F., (1995). Efficacy of antibiotic treatment at drying-off for udder infections in goats, In *Third Int. Mastitis Sem., Proceedings II S5* : 91.
- Cremoux (de) R. (1995). Relations entre les numérations cellulaires du lait et les infections mammaires chez la chèvre. *Thèse de doctorat vétérinaire. Université Paul Sabatier. Toulouse.* 71pp.
- da Silva ER, do Carmo LS, da Silva N. (2005) Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet Microbiol. Mar* 20;106(1-2):103-7.
- Da Silva, E.R., Boechat, J.U.D., da Silva, N. (2006) Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from goat mastitis in Brazilian dairy herds. *Letters in Applied Microbiology.* 42:30-34.
- Dacosta Y., (2000) La bio-protection des aliments - L'antagonisme microbien au service de la sécurité et de la qualité microbiologiques
- Dahiya RS, Speck, ML (1968) Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci*, 51, 1568-1572.
- Daly C, Sandine WE, Ellilker PR (1972) Interactions of food starters cultures and food borne pathogens : *Streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. *J milk Food Technol.*, 35, 349-357.
- David V, Guerin B, Fontez B, Tormo H, Lefrileux Y, (2001). Effects of temperature on growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in farm made cheeses (goat raw milk acid curd cheeses). *Renc. Rech. Ruminants*, 8, 83-86.
- De Buyser M L, Dufour B, Maire, M, Lafarge V, (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J. Food Microbiol.*, 67 (1-2), 1-17.
- De Buyser M.L., Janin F., Dilasser F., (1985) Contamination of ewe cheese with *Staphylococcus aureus* : study of an outbreak of food poisoning, p. 677-678. In J. Jeljaszewicz (ed.), *The staphylococci. Zbl. Bacteriol. Suppl.* 14, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.
- De Buyser M.L., Lombard B., Schulten S.M., In't Veld P.H., Scotter S.L., Rollier P., Lahellec C. (2003) Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999-Enumeration of coagulase-positive *staphylococci* in foods. *Int J Food Microbiol*; 83(2):185-94.
- De Buyser ML, Dilasser F, Hummel R, Bergdoll MS (1987) Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin -1 production by staphylococci isolated from goat's milk. *Int J Appl. Bacteriol*, 5, 301-309.
- Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Beresford T.P. (2000) A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*, *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 510-522.

- Delbes C, Alomar J, Chougi N, Martin JF, Montel MC (2006). *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cow's raw milk. *Journal of Food Protection*, 69(9), 2161-2167.
- Desmazeaud, M.J., de Roissard H. (1994) Chapitre I-4 : Métabolisme general des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques Volume I, de Roissard et Luquet, Lorica Ed, Uriage, France*.
- Dewani P., Rind R., Bhutto B., (2002). Bacteriological studies on mastitis in ewes and goats. *J. of Anim. and Vet. Advances*, 1 (2), 98-100.
- Direction Générale de l'Alimentation (2005) Techniques de detection et d'identification des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers Note de service du 27/07/05.
- Dubernet S., Desmasure N, Gueguen M., (2002) A PCR-based method for ifentification of *lactobacilli* at the genus level, *FEMS Microbiol. Lett.*, 214, 271-275.
- Dukta-malen S., Evers S., Courvalin P. (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 33, 24-27.
- Dupont D., Arnould C., Rolet-Repecaud O., Duboz G., Faurie F., Martin B., Beuvier E. (2006). Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies. *International Dairy Journal* 16(9), 1081-1087.
- Dupont D., Arnould C., Rolet-Repecaud O., Duboz G., Faurie F., Martin B., Beuvier E. (2006). Determination of bovine lactoferrin concentrations in cheese with specific monoclonal antibodies. *International Dairy Journal* 16(9), 1081-1087.
- Duthoit F., Godon J.J., Montel M.C. (2003) Bacterial community dynamics during production of "Registered Designation of Origin" Salers Cheese as evaluated by 16S rRNA gene SSCP analysis., *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3840-3848.
- Dykes G.A., Hastings W.N. (1998) Fitness costs associated with class lia bacteriocins resistance in *Listeria monocytogenes* B73, *lett. Appl. Microbiol.*, 26, 5-8.
- Fontecha J., Pelaez C., Juarez M., Requena T., Gomez C., Ramos M. (1990) Biochemical and Microbiological Characteristics of Artisanal Hard Goat's Cheese, *J. Dairy Sci.* 73, 1150-1157.
- Foschino R., Invernizzini A., Barucco R., Stradiotto K., (2002) Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year, *J. Dairy Res.*, 69, 213-225.
- Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. (2005) Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol.* 107(3-4):295-9.
- Freitas A, Malcata FX (1999) Technological optimisation of Picante cheese using microbiological, chemical and physical criteria. *J food Engineering*, 41(3/4), 163-175.
- Gaya P, Medina M, Bautista I, Nunez M, (1988) Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 6, 249-257
- Gilbert F.B., Fromageau A., Gelineau L., Poutrel B. (2006) Differentiation of bovine *Staphylococcus aureus* isolates by use of polymorphic tandem repeat typing. *Vet Microbiol.*, 117 (2-4) : 297-303.
- Gómez-Lucía E., Goyache J., Orden J.A., Domenech A., Javier Hernandez F., Ruiz-Santa Quiteria J.A., Lopez B., Blanco J.L., Suárez G. (1992) Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese, *J. Dairy Sci.*;75(1) :19-26.
- Gonzales J, Mas, M, Tabla R, Moriche J, Roa I, Rebollo JE, Caceres P, (2003) Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibores goat's milk cheeses. *Lait*, 83, 193-202.
- Groth P., Schumann K., Martin B., Schuetze K., Augsten I., Kramer E. Stackebrandt, (1999) *Ornithinococcus hortensis* gen. Nov., sp. Nov., a soil actinomycete which contains L-ornithine, *Int. J.*

Syst. Bacteriol. 49, 1717-1724.

Gupta R.K., Goel N.K., (1993) Antimicrobial potentials of *lactococci* – A review, *Microbiol. Aliments Nutr.*, 11, 4, 477-490.

Haeghebaert S., Le Querrec F., Bouvet P., Gallay A., Espie E., Vaillant V. (2002) Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001. *Bull. Epidemiol. Hebdo.*, 50.

Haeghebaert S., Le Querrec F., Gallay A., Bouvet P., Gomez M., Vaillant V., (2002) les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1999 et 2000, *Bull. Epidemiol. Hebdo*, 23, 105-110.

Haenlein G.F.W. (2002) Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity, *Small Rum. Res.* 45, 2, 163-178

Hajek V., Marsalek E. The differentiation of pathogenic *staphylococci* and a suggestion for their taxonomic classification. *Zentralbl. Bakteriol.* (originale A), 217, 176-182.

Halpin-Dohnalek MI, Marth EH (1998) *Staphylococcus aureus* : production of extracellular compounds and behavior in Foods – a review. *J Food Protection* 52, 267-282.

Hamama A, El Hankouri N, El Ayadi M (2002). Fate of enterotoxinogenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin LC *Lactis* strain during manufacturing of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *Int Dairy J.*12, 933-938.

Hechard Y., Dherbomez M, Cenatiempo Y, Letellier F (1990) Antagonism of lactic acid bacteria from goat's milk against pathogenic strains assessed by the "sandwich method". *Lett Appl Microbiol*, 11,185-188.

Haines W.C., Harmon L.G. (1973) Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl Microbiol.*;25(3) :436-441.

Hennekine J.A., Kerouanton A., Brisabois A., M.L. de Buyser. (2003) Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.*, 94 : 321-329.

Hernández D., Cardell E., Zárate V. (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J Appl Microbiol.*;99 (1), 77-84.

Ibrahim GF, Baldock AK, Radford DR, Ireland LB, (1981) Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in cheddar cheese produced with variable starter activity, *Journal of Food Protection*, 44 (4), 263-267.

International Dairy Federation. (1988). Code of practice for the preservation of raw milk by use of the lactoperoxidase system. *Bulletin of the International Dairy Federation* 234, 5-15.

ISO/TS 19036 (2006) Microbiologie des aliments – Lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives. Genève : ISO, 2006. 26p.

Ito A., Sato Y., Kudo S., Sato S., Nakajima H., Toba T. (2003) The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Curr Microbiol.*;47(3) : 231-236.

Jooste P.J., Hugo C.J. (1999) The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family *Flavobacteriaceae*, *Int. J. Food Microbiol.* 53, 81-94.

Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM (2005a) Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway *J Applied Microbiol*, 99(1), 158-166.

Jorgensen HJ, Mork T, Rorvik LM (2005b) The occurrence of *S aureus* on a farm with small scale production of raw milk cheese . *J Dairy Sci*, 88(11), 3810-3817

Kansal R., Davis C., Hansmann M., Seymour J., Parsonnet J., Modern P., Gilbert S., Kotb M. (2007) Structural and functional properties of antibodies to the superantigen TSST-1 and their relationship to menstrual toxic shock syndrome. *J Clin Immunol.*, 27(3), 327-338.

- Khan MA, Kim CH, Kakoma I, Morin E, Hansen RD, Hurley WL, Tripathy DN, Baek BK, (1998). Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by polymerase chain reaction analysis. *Am.J. Vet. Res.* 59, 807-813.
- Kokan N.P., Bergdoll M.S., (1987), Detection of low enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2675-2676.
- Kumar R & Bhatia K.L. (1999).). Standardization of method for lactoperoxidase assay in milk. *Lait* 79, 269-274.
- Kunstmann G., Schröder E., Hasbach H., Pulverer G. (1989) Immune response to toxic-shock-syndrome toxin-1 (TSST-1) and to staphylococcal enterotoxins A, B and C in *Staphylococcus aureus* infections. *Zentralbl Bakteriol.*, 271(4), 486-492.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. (1998) The yeasts: A taxonomic Study, 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam.
- Kutila T (2005) Role of lactoferrin in treatment of bovine mastitis *Mastitis Newsletter*, 26 , 22-23
- Kyozaire J.K., Veary C.M., Petzer I.M., Donkin E.F. (2005) Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems, *J. South African Vet. Assoc.* 76, 69-73.
- Laithier C., Chatelin Y.M., Talon R., Barral J., Tormo H., Lefrileux Y. (2005) Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage / désinfection sur la sélection positive des biofilms. *Renc. Rech. Ruminants* 12, 367-370.
- Lamprell H. (2003). Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. *Thèse de l'Université de Bourgogne.* 199 p.
- Lapeyre C. (1997). Détection des entérotoxines staphylococciques. La lettre de CECALAIT, 24, 6-8.
- Lapeyre C., (1999). Staphylocoques - Entérotoxines staphylococciques - produits laitiers. Risques en pathologie humaine. *Renc. Rech. Ruminants*, 6, 307-310.
- Laukova A, Czikkova S, Dobransky T, Burdova O, (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milks products. *Food Microbiol.* 16, 93-99.
- Le Loir, Y, Baron, F, Gautier M, (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning *Genet Mol Res* 2(1), 63-76
- Le Mens P, Lefrileux Y, Tormo, H Vernozy Rozand C, (1999) Etude de la croissance de *Staphylococcus aureus* dans le lait et les fromages de chèvre au lait cru. *Renc Rech. Ruminants*, 6, 299-302.
- Leclerc V., Dufour B., Lombard B., Gauchard F., Garin-Bastuji B., Salavat G., Brisabois A., Poumeyrol M., de Buyser M-L, Gnassou-Besse N., Lahellec C., (2002), Pathogens in meat and milk products : surveillance and impact on human health in France, *Liv. Product. Sci.*, 76, 195-202.
- Lee H.K., Chun J., Moon E.Y., Ko S.H., Lee D.S., Lee H.S., Bae K.S. (2001) *Hahella chejuensis* gen. Nov., sp. Nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 661-666.
- Lee N.-Y., Kawai K., Nakamura I., Tanaka T., Kumura H., Shimazaki K.I. (2004) Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganism isolated from mastitic milk. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 1267-1269.
- Leitner G., Merin U., Silanikove N., Ezra E., Chaffer M., Gollop N., Winkler M., Glickman A., Saran A., (2004) Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts, NAGase activity and gross composition of goats' milk, *J. Dairy Res.* 71, 311-315.
- Leriche F., Bordessoules A., Fayolle K., Karoui R., Laval K., Leblanc L., Dufour E. (2004) Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas* spp. : monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling, *J. Microbiol. Met.* 59, 33-41.
- Leriche V, Carpentier B., (2000) Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel by *Staphylococcus sciuri* biofilms, *J. Appl. Microbiol.*, 88, 594-605.

- Lewus C.B., Kaiser A., Montville T.J., (1991), Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 6, 1683-1688.
- Lincoln R.A., Leigh J.A., Jones N.C. (1995) The amino acid requirements of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. *Vet Microbiol.*, 45(2-3), 275-279.
- Lindqvist R, Sylven S, Vagsholm I (2002) Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int J Food Microbiol.* 78, 155-170.
- Little C. L., Louvois J. (de), (1999). Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' milk on retail sale in England and Wales. A PHLS Dairy Products Working Group Study. *Epidemiology and Infection*, 122 (3), 403-408
- Lombard B., (2004) Les essais inter-laboratoires en microbiologie des aliments. *Thèse de l'INA-PG*. 371 pp.
- Lopez M.A., Javier Zavala Diaz de la Serna F., Jan-Roblero J., Romero J.M., Hernandez-Rodriguez C., (2006) Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico, *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 145-154.
- Mahanta P.N., Thungchamo K., Dutta G.N., Devriese I.A., (1997) Identification and characterization of *staphylococci* isolated from cutaneous lesions of goats, *Zentralbl Veterinarmed*, 44, 5, 309-311.
- Manolopoulou E., Sarantinopoulos P., Zoidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis I.G., Anifantakis E.M. (2003) Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol.*; 82 (2), 153-161
- Mas M.; Tabla R.; Moriche J., Roa I., Gonzalez J., Rebollo J.E., Caceres P. (2002) Ibore goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening = Fromage de chèvre des Ibore. *Le Lait*, 82 (5), 579-587.
- Matos J.S., White D.G., Harmon R.J., Langlois B.E., (1991), Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland, *J. Dairy Sci.*, 74, 1544-1549.
- Matsunaga T., Kamata S., Kakiichi N., Uchida K. (1993) Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci.*; 55(2), 297-300.
- Meisel C., Gehlen K.H., Fischer A., Hammes W.P., (1989) Inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* in dry sausages by *Lactococcus curvatus*, *Micrococcus varians* and *Debaryomyces hansenii*, *Food Biotechnol.*, 3, 2, 145-168.
- Ménard J.L., Heuchel V. (1994) 1- Prévention de la contamination du lait de vache par *Staphylococcus aureus*. Evaluation de l'application d'un test ELISA pour le dépistage des infections mammaires. 2- Intérêt du diagnostic bactériologique des infections mammaires dans les élevages livrant un lait très contaminé. *Compte rendu de fin d'opération d'une recherche financée par le Ministère de la Recherche et de la Technologie. Décision d'aide N° 91 G 0235*.
- Menzies P.I., Ramanoon S.Z., (2001) Mastitis of sheep and goats, *Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, 17, 2, 333-358.
- Mercier P., Baudry Ch, Lenfant D., Mallereau M-P. (1998). Etude de l'efficacité d'un traitement antibiotique au tarissement chez la chèvre, *Rec. Med. Vet.*, 174 : 7-14.
- Michel V., Hauwuy A., Montel M.C., Coulon J.B., Chamba J.F. (2005) Pratiques d'élevage et composition microbienne des laits crus. *Symposium INRA PSDR, Territoires et enjeux de développement régional. 9-11 mars 2005*
- Meunier D. (1999) Infections mammaires à *Staphylococcus aureus*. Caractérisation et évaluation d'antigènes pour le diagnostic immunologique. *Thèse de l'Université de Tours*, 155 pp.
- Meyrand A., Boutrad-Loei S., Ray-Gueniot S., Mazuy C., Gaspard C.E., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C., Vernozy-Rozand C., (1998), Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats'milk, *J. Appl. Microbiol.*, 85, 3, 537-544.

- Meyrand, A., Vernozy-Rozand C. (1999) Croissance et entérotoxinogénèse de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Rév. Méd. Vét.*, 150, (7), 601-616.
- Meyrand, A., C. Vernozy-Rozand, C. Gonthier, C. Mazuy, S. Ray-Gueniot, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre et Y. Richard (1999b). Main differences in behavior and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in two different raw milk cheese. *Rév. Méd. Vét.*, 150, (3), 271-278.
- Michel V, Hauwuy A, Chamba JF (2001) La flore microbienne des laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production *Lait*, 81 , 575-592
- Montville T.J., Winkowski K., Ludescher R.D., (1995) Models and mechanisms for bacteriocin action and application, *Int. Dairy J.*, 5, 797-814.
- Morea M., Baruzzi F., Cocconcelli P.S. (1999) Molecular and physiological characterization of dominant populations in traditional Mozzarella cheese processing, *J. Appl. Microbiol.* 87, 574-582.
- Morgan F, Bonnin V, Meyrand A, Mazuy C, Mallereau MP, Perrin G, Vernozy-Rozand, (2000) Comportement de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* dans les fromages de chèvre au lait cru. *Renc Rech Ruminants*,7,351-354.
- Moroni P., Pisoni G., Antonini M., Ruffo G., Carli S., Varisco G., Boettcher P. (2005) Subclinical mastitis and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from Two Italian Goat Herds, *J. Dairy Sci.* 88, 1694-1704.
- Moroni, P.; Pisoni, G.; Vimercati, C.; Rinaldi, M.; Castiglioni, B., Cremonesi, P., Boettcher, P. (2005) Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Chronically Infected Dairy Goats. *Journal of Dairy Science.*;88(10):3500-3509.
- Mortvedt C., Nes I.F., (1990), Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain, *J. Gen. Microbiol.*, 136, 1601-1607.
- Mossel D, Van Netten, P (1990) *Staphylococcus aureus* and related *staphylococci* in foods : ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *J Appl. Bacteriol. Symp. Supp.*, 123-145.
- Muehlherr J. E.; Zweifel C.; Corti S.; Blanco J. E., Stephan R. (2003) Microbiological Quality of Raw Goat's and Ewe's Bulk-Tank Milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science.*; 86(12):3849-3856.
- Ndegwa E.N., Mulei C.M., Munyua S.J. (2001), Prevalence of microorganisms associated with udder infections in dairy goats on small-scale farms in Kenya, *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 72, 2, 97-98.
- Noletto ALS, Bergdoll M (1980) Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enterotoxigenic *staphylococci*, *Applied and Environmental microbiology*, 1167-1171.
- Noletto A.L., Malburg Júnior L.M., Bergdoll M.S. (1987) Production of staphylococcal enterotoxin in mixed cultures. *Appl Environ Microbiol.* ;53(10) : 2271-2274.
- Note de service DGAL/SDSSA/N2006-8048 du 20 Février 2006 concernant l'entrée en application du règlement (CE) N° 2073/2005.
- Note de service DGAL/SDSSA/N2008-8009 du 14 Janvier 2008 concernant les précisions relatives aux modalités de mise en œuvre des analyses microbiologiques de denrées alimentaires et d'exploitation des résultats.
- Olarte C, Sanz S, Gonzalez Fandos E, Torre P (2000) The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameron cheese). *J Appl Microbiol*, 88 , 421-429
- Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D.L., Ueda S., Shinagawa K., (2002) Detection of seg, she, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harbouring seg, she, or sei genes, *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3, 857-862.
- Onoue Y., Mori M. (1997) Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *Int J Food Microbiol.*, 36(1), 77-82.
- Oppong D., Bryant S.D., Rangarajan R., Steele S., Radwell D., Hyllengren L. (2006) Application of molecular techniques to identify bacteria isolated from the leather industry, *J. Am. Leath. Chem. Assoc.*

101, 40-144.

Orden JA, Goyache J, Henandez J, Domenech A suarez G, Gomez Lucia E (1992) Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot, *J Appl. Cateriol*,72(6),486-489.

Ortigosa M., Torre P., Izco J.M. (2001) Effect of pasteurization of Ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of roncal cheese. *J Dairy Sci.* 84(6), 1320-1330.

Piard JC, Desmazeaud M (1991) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 525-541.

Pisano M.B., Elisabetta Fadda M., Deplano M., Corda A., Cosentino S. (2006) Microbiological and chemical characterization of Fiore sardo, a traditional sardinian cheese made from ewe's milk, *Int. J. Dairy Technol.* 59, 171-179.

Pitt WM, Harden TJ, Hull RR (2000) Investigation of the antimicrobial activity of raw milk against several foodborne pathogens *Milchwissenschaft*, 55(5) , 249-252

Poutrel B, Cremoux (de) R., Ducelliez M, Verneau D. (1997). Control of intramammary infections in goats – Impact on somatic cell counts, *J. of Anim. Sci.*, 75 : 566-570.

Prado B., Jara A., Moral A. del, Sánchez E. (2001). Numerical taxonomy of microorganisms isolated from goat cheese made in Chile. *Current Microbiol.*, 43(6), 396-399.

Psoni L., Kotzamanidis C., Yiangou M., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2007) Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *Int J Food Microbiol.*;114(2), 211-220.

Rainard P., Poutrel B., Caffin J.P. (1982). Lactoferrin and transferrin in bovine milk in relation to certain physiological and pathological factors. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 13, 321-328.

Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires

Reyes J. F. F.; García A.; Allara M.; García A.; Olivares Y.; Ríos G., (1999). Some physico-chemical and microbiological characteristics of goat milk produced in Quisiro [Venezuela]. *Rev. Fac. Agron.*, 16(1), 99-106.

Roberson J. R., Fox L. K.; Hancock D. D., Gay J. M., Besser T. E. (1994) Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *Journal of Dairy Science.*; 77(11):3354-3364.

Roberson J.R., Fox L.K., Hancock D.D., Gay J.M., Besser T.E. (1998) Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition, *J. Dairy Sci.*, 687-693.

Roberts AK (2002) The effect of sorbic acid on the survival of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* on shredded cheddar and mozzarella cheese. *Master of Science in Food Science and Technology. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University*, 42 p.

Rodriguez E, Arques JL, Gaya P, Tomillo J, Nunez M, Medina M (2000) Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. *Milchwissenschaft*, 55(11), 633-635.

Rosario Corbo M., Lanciotti R., Albenzio M., Sinigaglia M. (2001) Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region, *Int. J. Food Microbiol.* 69, 147-152.

Rosec, J.-P. (1999). Les Staphylocoques entérotoxiques : Etude épidémiologique de souches d'origine alimentaire et détection par PCR multiple. *Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc*, 249 pp.

Ryan D.P., Greenwood P.L, (1990), Prevalence of udder bacteria in milk samples from four dairy goats herds, *Aust. Vet. J.*, 67, 10, 362-363.

- Sabat, A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W.; Travis J., Potempa J. (2003) New method for typing *Staphylococcus aureus* strains multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41(4), 1801-1804.
- Sable S., Portrait V., Gautier V., Letellier F., Cottenceau G. (1997) Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening, *Enz. Microbiol. Technol.* 21, 212-220.
- Sabreen M. S.; Abdel-Haleem A. A., (2000). Microbiological evaluation of sheep's and goat's milk in Assiut Governorate. *Assiut Vet. Med. J.*, 42 (84), 36-46.
- Sanchez-porro C., Martin S., Mellado E., Ventosa A. (2006) Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes, *J. Appl. Microbiol.* 94, 295-300.
- Schaak MM, Marth EH (1988). Interaction between lactic acid bacteria and some foodborne pathogens : a review. *Cult dairy Prod J*, 23(4), 14-20.
- Seifu E, Buys EM, Donkin EF, Petzer IM (2004) Antibacterial activity of the lactoperoxydase system against foodborne pathogens in Saanen and South African indigenous goat milk. *Food Control*, 15, 447-452
- Sharma S., Kashyap S. K., Sharma K. N., (1999). Bacterial status of mastitic and normal milk samples of goats. *Indian J. of Anim. Sci.*, 69 (4), 229-230.
- Sinapis E., Hatziminaoglou I., Marnet P.G., Abas Z., Bolou A., (2000). Influence of vacuum level, pulsation rate and pulsator ratio on machine milking efficiency in local Greek goats, *Livestock Production Science* 64 (2-3) 175-181
- Smith E. M. ; Green L. E.; Medley G. F.; Bird H. E., Dowson C. G. (2005) Multilocus Sequence Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from High-Somatic-Cell-Count Cows and the Environment of an Organic Dairy Farm in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology.*;43:4731-4736.
- Smyth DS, Hartigan PJ, Meaney WJ, Fitzgerald JR, Deobald CF, Bohach GA, Smyth CJ. (2005) Superantigen genes encoded by the egc cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *J Med Microbiol.*; 54, 401-411.
- Snoep J.J., Sampimon O. C., Bloemert J., van der Mei J., (1995) Evaluation of an ELISA test to detect *Staphylococcus aureus* antibodies in bovine milk samples, *In Third Int. Mastitis Sem., Proceedings II* S2, 28-32.
- Srinivasan V., Sawant A.A., Gillespie B.E., Headrick S.J., Ceasaris L., Oliver S.P. (2006) Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathog Dis.*;3 (3), 274-83
- Stecchini M.L., Sarais I., de Bertoldi M.. (1991)The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *Int J Food Microbiol.*, 14(2), 99-109.
- Stephan R., Annemüller C., Hassan A.A., Lämmli C. (2001) Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet Microbiol.*, 78(4), 373-382.
- Sung Y Y , Wu TI, Wang PH (1999) Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. *Small Rum. Res*, 33(1),17-23.
- Takeuchi S, Maeda T, Hashimoto N, Imaizumi K, Kaidoh T, Hayakawa Y (2001) Variation of the agr locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. *Vet Microbiol.*;79(3), 267-274
- Tatini S.R., Jezeski J.J., Olson Jc, Casman E.P. (1971) Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk, *Journal of Dairy Science*, 54, 312-320
- Thomas D., Chou S., Dauwalder O., Lina G. (2007) Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chem Immunol Allergy*. 93, 24-41.

- Todorov S., Onno B., Sorokine O., Chobert J.M., Ivanova I., Dousset X. (1999) Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Int J Food Microbiol.*;48(3), 167-177.
- Tomassone R., Dervin C., Masson J-P., (1993) Biométrie, modélisation de phénomènes biologiques. Ed : Elsevier-Masson. pp 553.
- Tormo H., Ali Haimoud Lekhal D., Laithier C. (2006). Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre : principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage. *Renc. Rech. Ruminants*, 13, 305-308.
- Tornadijo M.E., Fresno J.M., Bernardo A., Martin-Sarmiento R.M., Carballo J. (1995) Microbial changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's milk cheese (Armada variety), *Lait* 75, 551-570.
- Tornadijo M.E., Fresno J.M., Carballo J., Sarmiento R.M. (1996). Population levels, species, and characteristics of Micrococcaceae during the manufacturing and ripening of Armada-Sobado hard goat's milk cheese., *J. Food Prot.*, 59(11), 1200-1207.
- Tornadijo M.E., Fresno J.M., Sarmiento R.M., Carballo J. (1998) Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk, *Lait* 78, 647-659.
- Tornadijo ME, Fresno JM, Carballo, J, Sarmiento RM (1996). Population levels, species and characteristics of Micrococaccae during the manufacturing and ripening of Armada-Sobado hard goat's milk cheese. *J Food Prot*, 59(11)1200-1207.
- Turner S.A., Williamson J.H., Thomson N.A., Roche J.R., Kolver E.S. (1983). Diet and genotype affect milk lactoferrin concentrations in late lactation. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 63, 87-90.
- Valle J., Gomez-Lucia E., Piriz S., Goyache J., Orden J.A., Vadillo S. (1990) Enterotoxin production by *staphylococci* isolated from healthy goats, *Appli. Environ. Microbiol.*, 56, 5, 1323-1326.
- Vaughan E.E., Caplice E., Looney R., O'Rourke N., Coveney H., Daly C. (1994), Isolation from food sources of lactic acid bacteria that produced antimicrobials, *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 2, 118-123.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Huard, C., Pépin, M. (2003) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis.;96:69-79.
- Vernozy C., Mazuy C., Lapeyre C., Chantegrelet G., Richard Y., (1994), Etude des souches de staphylocoques à coagulase négative (S.C.N.) isolées de fromages de chèvre en région Rhône-Alpes : identification, antibiotypie et entérotoxigénicité, *Rev. Med. Vet.*, 145, 107-113.
- Vernozy-Rozand C., Mazuy-Cruchaudet C., Bavai C., Richard Y. (2004). Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 490-494.
- Vernozy-Rozand C., Meyrand A., Mazuy C., Delignette-Muller M.L., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C., Richard Y., (1998) Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses, *J. Dairy Sci.*, 65, 2, 273-281.
- Villani F., Aponte M., Blaiotta G., Mauriello G., Pepe O., Moschetti G. (2001) Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J Appl Microbiol.*;90(3) : 430-439.
- Vimercati C, Cremonesi P, Castiglioni B, Pisoni G, Boettcher PJ, Stella A, Vicenzoni G, Moroni P. (2006) Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows, goats and sheep with intramammary infections on the basis of gene polymorphisms and toxins genes. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 53(9):423-8.
- Wang Y., Tu Y., Han F., Xu Z., Wang J. (2005). Developmental gene expression of lactoferrin and effect of dietary iron on gene regulation of lactoferrin in mouse mammary gland. *Journal of Dairy Science* 88, 2065-2071.

- White, E. C.; Hinckley, L. S., (1999). Prevalence of mastitis pathogens in goat milk. *Small Rum. Res.*33(.2), .117-121.
- Williams D.M., Mein G.A., (1985). The role of machine milking in the invasion of mastitic organisms and implications for maintaining low infection rates. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 37, 415-425.
- Yazdankhah S.P., Solverod L., Simonsen S., Olsen E. (1999) Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in composite milk. *Vet. Microbiol.* 67: 113-125.
- Yoon J.H., Lee K.C., Weiss N., Kang K.H., Park Y.H. (2003) *Jeotgalicoccus halotolerans* gen. Nov., sp nov and *Jeotgalicoccus psychrophilus* sp nov., isolated from the traditional Korean fermented seafood jeotgal, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 595-602.
- Zadocks R.N., van Leeuwen W.B., Kreft D., Fox L.K., Barkema H.W., Schukken Y.H., van Belkum A., 2002. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage type pulsed field gel electrophoresis and binary typing, *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3894-3902.
- Zapico P., Gaya P., De Paz M., Nuñez M., Medina M. (1991) Influence of breed, animal, and days of lactation on lactoperoxidase system components in goat milk. *J Dairy Sci.* 1991;74(3), 783-787.
- Zarate V., Belda F., Pérez C., Cardell E. (1997) Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening, *Int. Dairy J.* 7, 635-641.
- Zecconi A, Calvinho L, Fox L (2006) *Staphylococcus aureus* intramammary infections *IDF Bulletin n° 408*
- Zlotkin A., Eldar A., Ghittino C., Bercovier H. (1997) Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 983-985.
- Zottola E.A., Smith E.A., (1991), Pathogens in cheese, *Food Microbiol.*, 8, 171-182.
- Zottola E.A., Yezzi T.L., Ajao D.B., Roberts R.F., (1994), Utilization of cheddar Cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods, *Int. J. Food. Microbiol.*, 24, 1-2, 227-238.
- Zschöck, M., Sommerhäuser, J., Castaneda, H. (2000) Relatedness of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mammary gland suffering from mastitis in a single herd. *J. Dairy Sci.*; 67:429-435.
- Zschöck M., Risse K., Sommerhäuser J. (2004) Occurrence and clonal relatedness of *secYst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. *Lett Appl Microbiol.*;38 (6), 493-498.

Valorisation – Diffusion

Beuvier E., Arnould C., Rolet-Répécaud O., Lefrileux Y., de Cremoux R., Dupont D. (2007) Sandwich ELISA for goat lactoferrin quantification in milk during lactation. *IXth International Conference on AgriFood Antibodies (ICAFA), 10–13 September 2007, Oslo, Norvège.*

Callon C, Delbès C, Montel M.C. (2007) Application de la PCR en temps réel pour la quantification des lactocoques dans les produits laitiers. *Colloque de l'Association francophone d'Ecologie Microbienne. 15-18 octobre 2007. La Grande Motte, France.*

Callon C., Duthoit F., Delbes C., Ferrand M., de Cremoux R., Montel MC (2007) Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year. Molecular approaches. *Syst Appl. Microbiol*, 30, 547-560.

Callon C., Gilbert F.B., de Cremoux R., Montel M.C. (2008) Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control*, 19 (2), 143-150.

Callon C., Gilbert F.B., Poutrel B., de Cremoux R., Dubuc-Forfait C., Champion J-L, Montel M.C. (2007) Sources of contamination by *Staphylococcus aureus* of goat milk and cheese determined by VNTR analysis. *Vth International Symposium on the Challenge to Sheep and Goats Milk sectors, 18–20 April 2007, Alghero/Sardinia, Italie.*

De Cremoux R., Callon C., Gilbert F.B., Poutrel B., Dubuc-Forfait C., Champion J-L, Montel M.C. (2006) Contamination du lait et des fromages de chèvre par *S. aureus* : prévalence et origine. *Bulletin des GTV*, 37, 103-110.

De Cremoux R., Gaborit P., Barral J., Lautier G., Lauret A. (2006) Evaluation de la contamination par *Staphylococcus aureus* des laits de tank et de citerne en filière caprine *Renc Rech Ruminants*, 13, 420.

De Cremoux R., Lauret A., Barral J., Poutrel B., Gilbert F., Montel M.C., Beuvier E., Lictévout V., Lefrileux Y., Roussel Ph., Heuchel V. (2005) Control of the contamination by *Staphylococcus aureus* of goat raw milk and cheese. *4^{ème} Conférence internationale sur les mammites FIL –IDF, 12-15 Juin, Maastricht, Pays Bas.*

De Cremoux R., Raynal Ljutovac K. (2004). Maîtrise de la contamination par *Staphylococcus aureus* dans la filière caprine. *L'égide*, 36, p 2

Gilbert F.B., Fromageau A., Poutrel B., Lictévout V., Dubuc-Forfait C., Champion J-L, de Cremoux R. (2006) Dépistage par ELISA des mammites à *Staphylococcus aureus* chez la chèvre, *Renc Rech Ruminants*, 13.

Gilbert F.B., Poutrel B., Fromageau A., Lictévout V., Dubuc-Forfait C., Champion J-L, de Cremoux R. (2007) Detection by ELISA of caprine mastitis due to *S. aureus* *Vth International Symposium on the Challenge to Sheep and Goats Milk sectors, 18–20 April 2007, Alghero/Sardinia, Italie.*

Raynal-Ljutovac K., Barral J., Poutrel B., Guillet I., Boivin J., Gaborit P., Dirberg R., de Cremoux R. (2006) Recherche d'écosystèmes microbiens inhibiteurs de la croissance de *S. aureus* dans le lait de chèvre; *Renc Rech Ruminants*, 13, 415-418

Les différents volets de ce programme de recherche ont par ailleurs fait l'objet de présentations auprès de différents publics :

- techniciens fromagers : Journées de perfectionnement technique des techniciens du réseau « produits laitiers fermiers », 6-8 juin 2007, Mâcon.
- techniciens fromagers et éleveurs : 4^{èmes} rencontres du fromage fermier, 17 octobre 2007, Carmejeane.
- vétérinaires : rencontres techniques vétérinaires, 26 juin 2007, Millau.

Annexes

Annexe 1

Evaluation des risques de contamination par *S. aureus* en filière caprine

Annexe 1.1 : Description de la méthode MLVA adoptée pour le typage des souches de *S. aureus*

Différents gènes ont été amplifiés avec les amorces mises au point comme indiqué dans le tableau 1 ci-dessous :

gènes	Amorces	Séquence de l'amorce
clfA	clfA-F clfA-R	5'-GCATTTAATAACGGATCAGG 5'-TGAATTAGGCGGAACACTACAT
clfB	clfB-F clfB-R	5'-AGCCATACGTCATGACCCC 5'-CAGCAGTAAATCCGAAAGAC
SAV 1078	SAV-F SAV-R	5'-GTGCATAATGGCCTTACGAAT 5'-TGGGAGGAATTAATCATGTC
fnb	Fnb-F Fnb-R	5'-ATACACTTCCAAAAGTAAGCGG 5'-ATTTCAATAACAGGTGTTACTACT
coa	Coa-F Coa-R	5'-TCAAGCAACTGAAACAACAG 5'-TACTCTAGGCCCATATGTCTG
staphylokinase	Sta-F Sta-R	5'-TGTGACTGGAGTTGATGGTA 5'-GCTCTGATAAATCTGGGACA

Le typage des souches a nécessité d'avoir recours à une méthode de génétique moléculaire, la Polymerase Chain Reaction (PCR). Le MIX PCR contient pour une réaction (volume final : 25 µl) :

- tampon 10X sans MgCl₂ : 2.5 µl
- MgCl₂ 25mM : 1.5 µl (Qbiogene, Illkirch, France)
- dntp 25 mM : 0.2 µl (Qbiogene),
- amorce F 10 µM : 1.25 µl
- amorce R 10 µM : 1.25 µl
- Taq polymérase 5U/µl : 0.2 µl (Qbiogene),
- eau : 17.1 µl
- + 1 µl ADN

L'amplification de l'ADN a été réalisée après une étape de dénaturation préalable de 5 min à 94°C suivie de :

- 25 cycles de 30s. à 94°C ;
- incubation de 30s. aux températures d'hybridation définies pour chaque TR (55°C : clfB ; 53°C : coa, SAV, clfA et sta ; 47°C : fnb) ;
- incubation 30s. à 72°C ;
- phase d'extension finale de 10 min à 72°C avant descente à 4°C.

Huit µl de produits d'amplification ont été déposés dans un gel d'agarose Seakem à 1,5 % en présence de bromure d'éthidium (10 µl/200 ml) dans un tampon TBE 0,5X. La migration a été effectuée pendant 5 heures à 90 V. Quatre échelles de 50 pb ou 100 pb (3 µl + 5 µl d'eau) ont été déposées pour chaque gel.

Annexe 1.2 : Analyse typologique des numérations cellulaires

Six classes d'élèves – années ont été définies à partir des 955 observations disponibles :

- classe 5 (53 observations) caractérisée principalement des numérations cellulaires inférieures à 750 000 cellules/ml ;
- classe 2 (121 observations) avec des numérations cellulaires généralement inférieures à 1 million de cellules par ml ;
- classe 3 (123 observations) caractérisée par des numérations cellulaires comprises entre 0,75 et 1,25 millions de cellules/ml ;
- classe 4 (192 observations) caractérisée par des numérations cellulaires comprises entre 1,25 et 2 millions de cellules/ml ;
- classe 8 (160 observations) caractérisée par des numérations cellulaires supérieures à 1,5 millions de cellules/ml ;
- classe 7 (60 observations) caractérisée essentiellement par des numérations cellulaires supérieures 2 millions de cellules et la présence de valeurs manquantes ;
- classe 6 (77 observations) caractérisée principalement par la fréquence des valeurs manquantes et, en second lieu, par des numérations cellulaires comprises entre 0,75 et 1,5 millions de cellules/ml ;
- classe 1 (169 observations) caractérisée principalement l'existence de valeurs manquantes.

Le premier plan de l'analyse en composantes multiples (ACM) est représenté Figure 1.

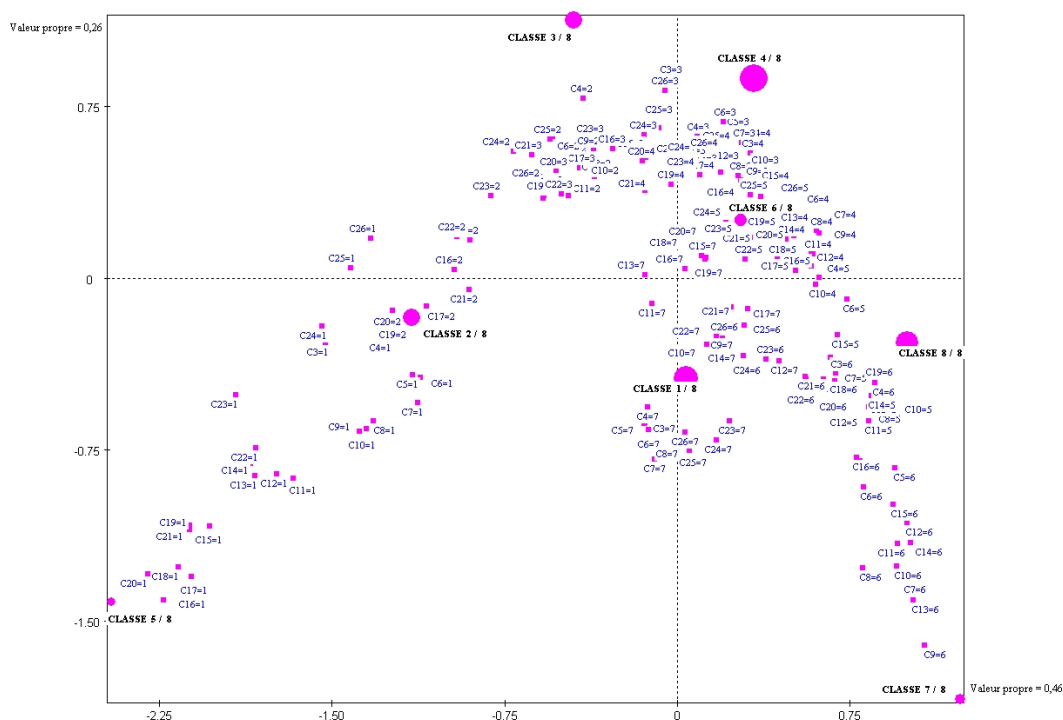


Figure 1 : Variables actives et positions relatives des classes dans le premier plan factoriel de l'ACM

La forme parabolique du nuage des points indique une forte structuration des données. Les individus situés sur la gauche en bas du graphique sont caractérisés par des dénombrements faibles. Inversement pour ceux situés à droite. Les individus en haut du graphique ont un profil marqué par des valeurs intermédiaires pour l'ensemble des variables. Les données manquantes sont situées à l'intérieur de la parabole et non dessus. Elles se séparent en deux groupes. Les variables C11 à C19 au centre du graphe correspondent aux mois de mai à septembre, période de l'année où le taux de

données manquantes est le plus faible. En bas du graphique, on retrouve les variables C3 à C8 et C23 à C26, qui correspondent aux mois de janvier-mars et novembre-décembre, périodes où le taux de données manquantes est le plus élevé.

Tableau 1. Nombre d'individus, moyenne des valeurs manquantes et moyenne géométrique des numérations cellulaires (en milliers/ml) des éleveurs-années par classe et année

Classe	2001			2002			2003			2004			Ens. des années		
	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy
1	55	6,9	1410	53	7,7	1348	37	6,6	1350	24	6,4	1342	169	6,8	1368
2	45	3,0	1005	28	3,3	988	33	3,0	1011	15	2,7	1044	121	2,8	1007
3	33	0,8	1100	38	0,9	1149	31	0,3	1096	21	1,3	1112	123	0,6	1116
4	54	0,9	1370	43	1,0	1359	58	0,4	1393	37	1,1	1374	192	1,2	1375
5	22	2,3	741	17	2,2	730	11	2,8	769	3	1,4	727	53	3,0	742
6	25	6,0	1244	20	6,5	1298	20	5,1	1371	12	6,5	1323	77	5,9	1302
7	11	4,6	2130	19	6,8	2242	15	5,1	2252	15	4,1	2082	60	2,7	2183
8	32	1,4	1671	45	2,0	1698	49	0,9	1736	34	1,7	1715	160	1,1	1708
Ens.	277	3,0	1255	263	3,6	1320	254	2,9	1350	161	2,8	1393	955	2,6	1320

n : nombre d'éleveurs-année

mqt : nombre de valeurs manquantes en moyenne sur 24 prélèvements

moy : moyenne géométrique du nombre de cellules (en milliers)

La seconde analyse réalisée sur le tableau des éleveurs (299 observations¹) a conduit à une typologie en 9 groupes (Figure 2, Tableau 2) :

- Groupe 1 : caractérisé par l'appartenance à la classe 5 en tant qu'éleveur-année;
- Groupe 2 : caractérisé par l'appartenance à la classe 2 en tant qu'éleveur-année ;
- Groupe 3 : caractérisée par l'appartenance à la classe 3 en tant qu'éleveur-année ;
- Groupe 4 : caractérisée par l'appartenance à la classe 4 en tant qu'éleveur-année ;
- Groupe 5 : caractérisée par l'appartenance à la classe 8 en tant qu'éleveur-année ;
- Groupe 6 : caractérisée par l'appartenance à la classe 7 en tant qu'éleveur-année ;
- Groupe 7 : caractérisée par l'appartenance à la classe 6 en tant qu'éleveur-année ;
- Groupes 8 : caractérisée par l'appartenance à la classe 1 en tant qu'éleveur-année ;
- Groupe 9 : caractérisée par les réponses manquantes (éleveurs absents certaines années).

¹ Seuls 299 éleveurs au lieu de 466 apparaissent dans le tableau final. En effet, les éleveurs ayant un nombre de données manquantes supérieur à 12 pour chacune des années étudiées n'ont pu être affectés à aucune classe. Ils ont été réintroduits par la suite, mais seulement en tant qu'individus illustratifs.

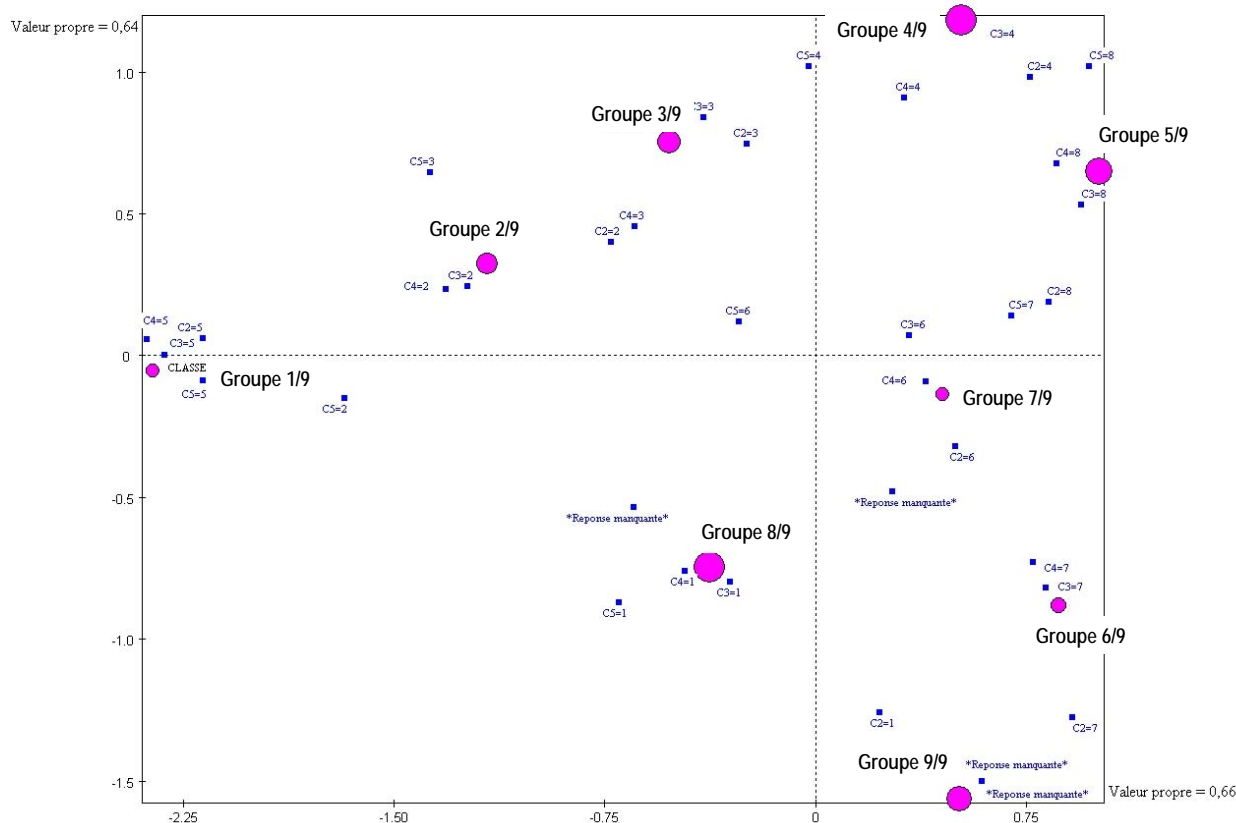


Figure 2 : Variables actives et positions relatives des classes de la typologie finale dans le premier plan factoriel de l'ACM

L'axe 1 peut s'interpréter comme le gradient de numérations cellulaires (moins de 750 000 cellules par ml à gauche), plus de 1,5 million à droite. L'axe gauche a tendance à séparer les classes ayant de nombreuses valeurs manquantes (en bas) des autres (en haut).

Tableau 2. Nombre d'individus, moyenne des valeurs manquantes et moyenne géométrique des numérations cellulaires (en millier/mls) des éleveurs par groupe et année

Classe	2001			2002			2003			2004		
	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy
1	17	6,4	715	17	3,8	743	18	2,4	850	18	8,2	1094
2	28	5,2	945	30	3,7	1008	31	2,3	1078	30	7,0	1173
3	34	1,5	1085	34	0,7	1153	34	1,3	1191	34	9,6	1218
4	47	1,4	1257	47	0,4	1362	46	1,3	1409	46	4,6	1478
5	42	1,9	1522	42	0,7	1650	41	2,8	1703	38	10,8	1748
6	21	5,5	1777	21	5,1	2146	18	7,9	2090	16	16,3	1676
7	20	4,9	1229	20	5,2	1367	19	6,1	1368	18	12,9	1401
8	45	8,8	1286	46	6,5	1347	47	5,5	1381	45	10,1	1321
9	36	9,3	1411	14	19,9	1438	5	22,4	1027	4	22,5	1615
Ens.	277	3,6	37	263	2,9	17	254	2,8	17	161	2,6	14

n : nombre d'éleveurs-année

mqt : nombre de valeurs manquantes en moyenne sur 24 prélèvements

moy. : moyenne géométrique du nombre de cellules (en milliers)

Graphiquement, quelles que soient la classe et l'année, on constate une augmentation des numérations cellulaires tout au long de l'année. Les numérations cellulaires commencent à croître vers juillet pour culminer vers novembre.

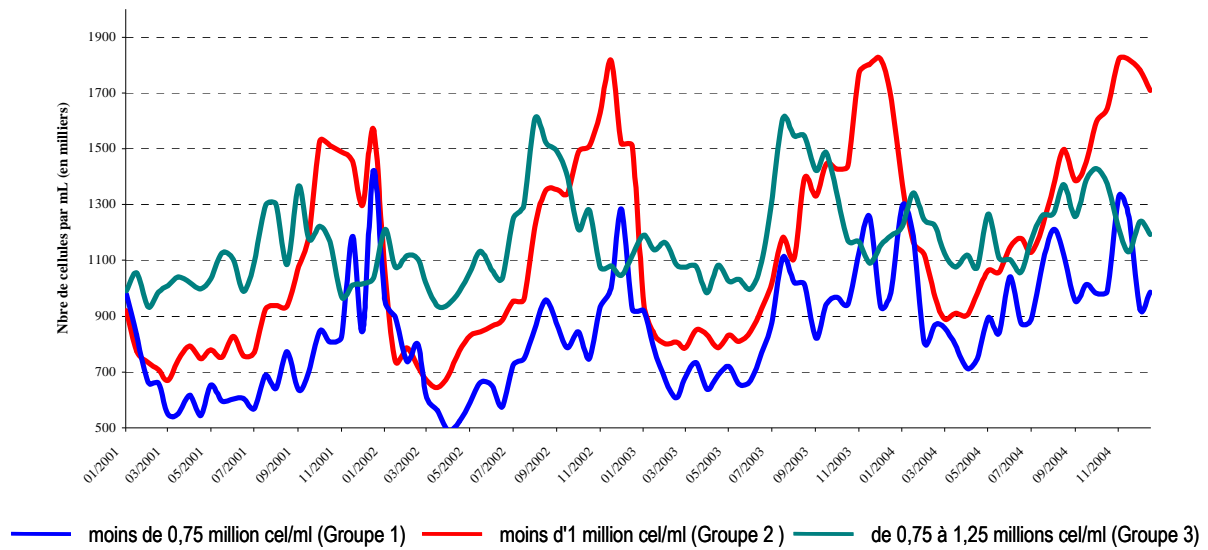


Figure 3 : Moyenne géométrique par quinzaine pour les groupes ayant des faibles niveaux de numérations cellulaires

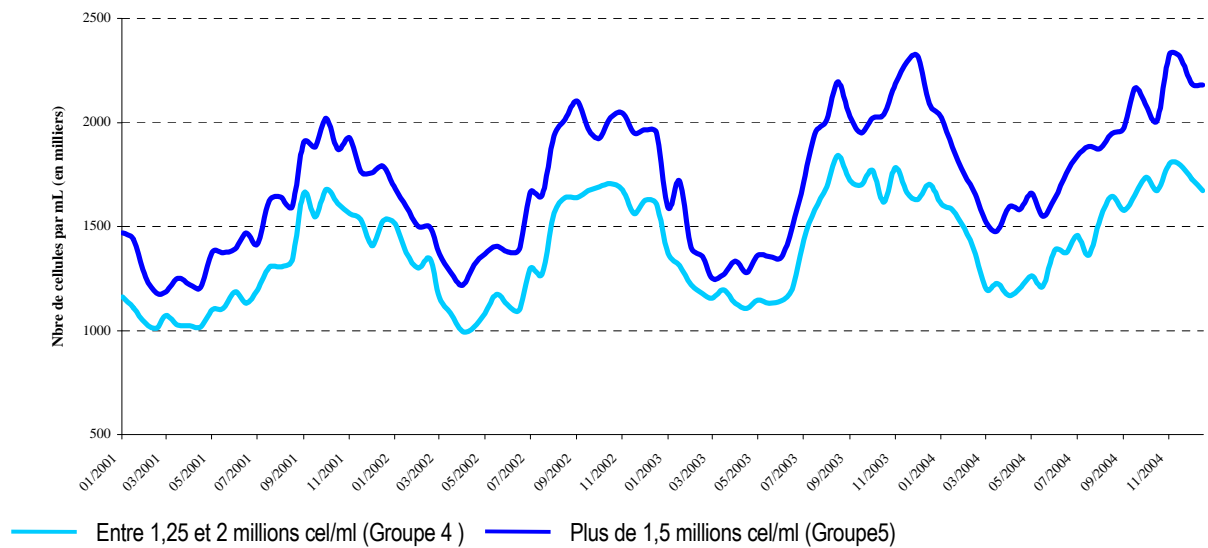


Figure 4 : Moyenne géométrique par quinzaine pour les groupes ayant des niveaux moyens de numérations cellulaires

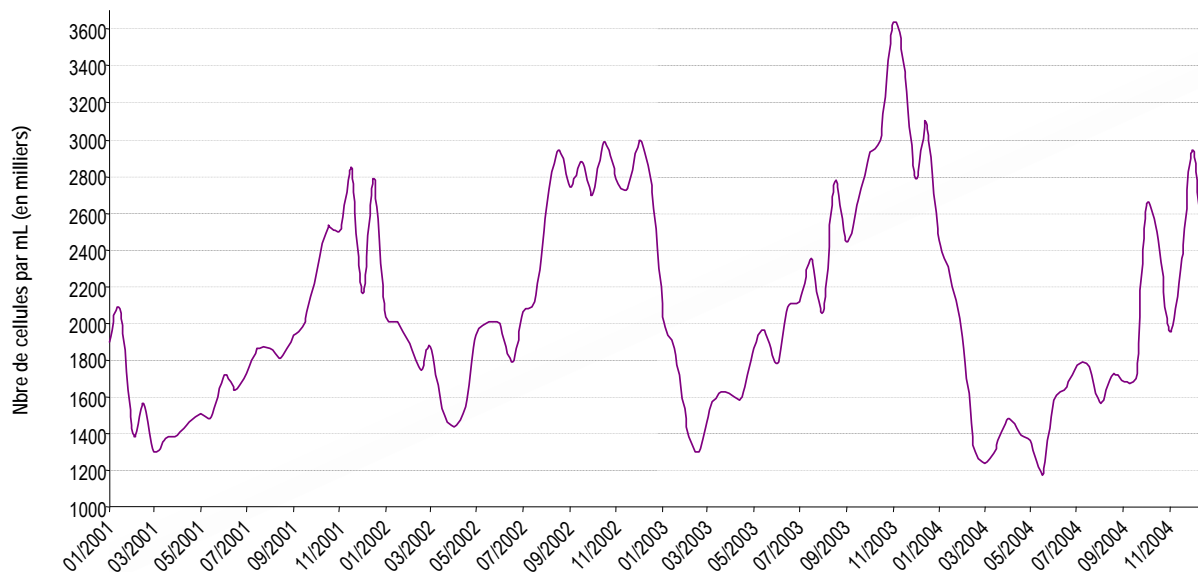


Figure 5 : Moyenne géométrique par quinzaine pour le groupe 6 (niveaux élevés de numérations cellulaires)

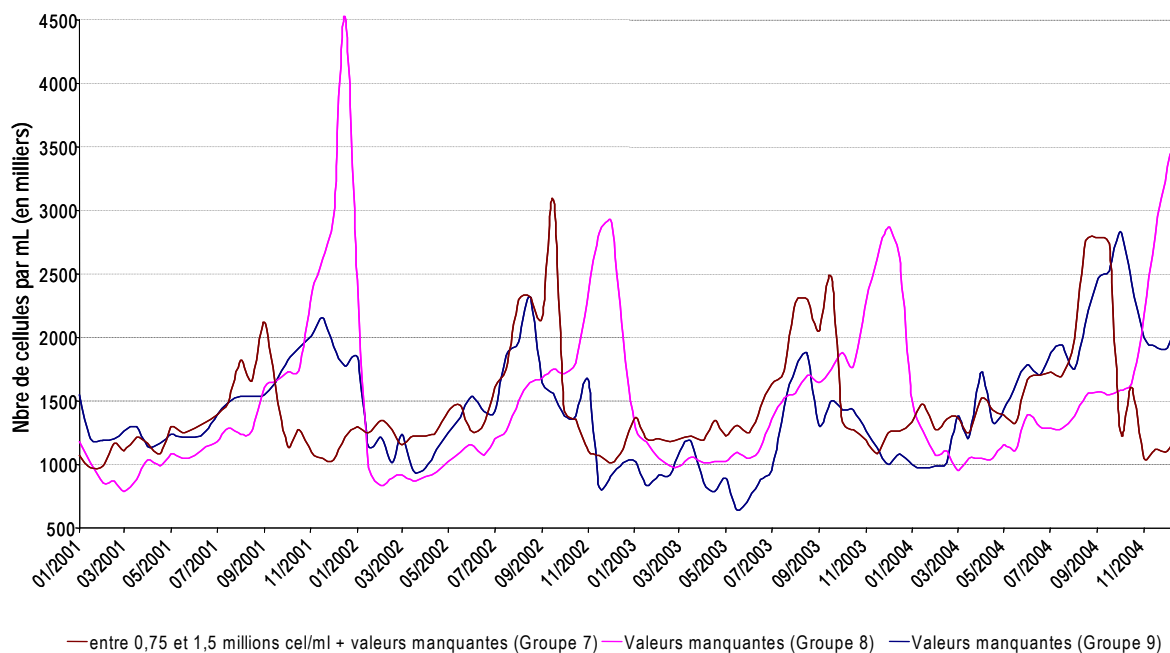


Figure 6 : Moyenne géométrique par quinzaine pour les groupes présentant un nombre important de données manquantes

Sur cinq ans de suivi, on a en général 1 à 2 changements de classes au cours du temps. Les données étant cependant très continues, ces changements ne sont pas forcément un signe d'instabilité des niveaux de numérations cellulaires.

La correspondance entre les groupes selon les profils de contamination en SCP et les profils de numérations cellulaires est synthétisée Tableau 3.

Tableau 3 : Correspondance entre les groupes selon les profils de contamination en SCP et les profils de numérations cellulaires

Groupes « Cellules »	Groupes « Contamination en SCP »						Total
	Présent une année	VM et peu de SCP	VM et peu de SCP	Faible	Elevé	Intermédiaire	
+ de 2 M et VM		1	12	2	3	3	21
Présent une année	20	1	6		1		28
VM			35	2	5	5	47
- d'1 M	1	2	6	10	1	11	31
- de 750 000	1	1	6	9		1	18
VM - 0,75 à 1,5		20					20
0,75 à 1,25 M			1	22		11	34
+ de 1,5 M		1	3	14	3	21	42
1,25 à 2 M	1	2	2	21	2	20	48
Total	23	28	71	80	15	72	289

M : million cel/ml ; VM : valeurs manquantes ; SCP : staphylocoques coagulase positive

Une analyse temporelle a été effectuée sur les moyennes géométriques des groupes d'élevages pour étudier si la quantité de cellules dans le lait était caractérisée par des autocorrélations (liaisons entre deux valeurs de la série chronologique) et/ou par des variations temporelles (variation saisonnière et tendance évolutive). Cette analyse a été réalisée pour chaque groupe (résultats non montrés) et pour l'ensemble des élevages.

Dans ce dernier cas, l'analyse de la série chronologique a montré le caractère stationnaire de la moyenne et de la variance (pas tendance évolutive marquée). Une saisonnalité a été mise en évidence et une différenciation saisonnière a été appliquée aux données brutes ($\nabla_s = 1 - B^s$ avec B l'opérateur retard tel que $BY_t = Y_{t-1}$).

Le comportement de cette série a été décrit par un modèle ARIMA(1,0,0)(1,1,0)₂₄. Ce modèle signifie que les résultats de numérations cellulaires lors d'un contrôle donné dépendent des résultats obtenus lors du prélèvement précédent (composante non saisonnière) et de ceux provenant du prélèvement réalisé l'année précédente à la même date (composante saisonnière). Le R² ajusté de ce modèle est de 87,6%.

Annexe 1.3 : Analyse typologique des germes totaux

La première analyse réalisée sur le tableau des élèves-années a permis de définir une typologie en 9 classes :

- classe 9 (160 individus) est caractérisé par un niveau en germes <10 000 ufc/mL ;
- classe 8 (106 individus) par un niveau de germe <à 20 000 ufc/mL ;
- classe 6 (169individus) par un niveau de germe compris entre 10 000 et 30 000 ufc/mL ;
- classe 5 (153 individus) par un niveau supérieur à 20 000 ufc :mL ;
- classes 4 et 7 (121 et 50 individus) par des niveaux plutôt faibles et des valeurs manquantes ;
- classes 1 et 2 (53 et 56 individus) par des niveaux élevés et des données manquantes ;
- classe 3 (89 individus) par les valeurs manquantes.

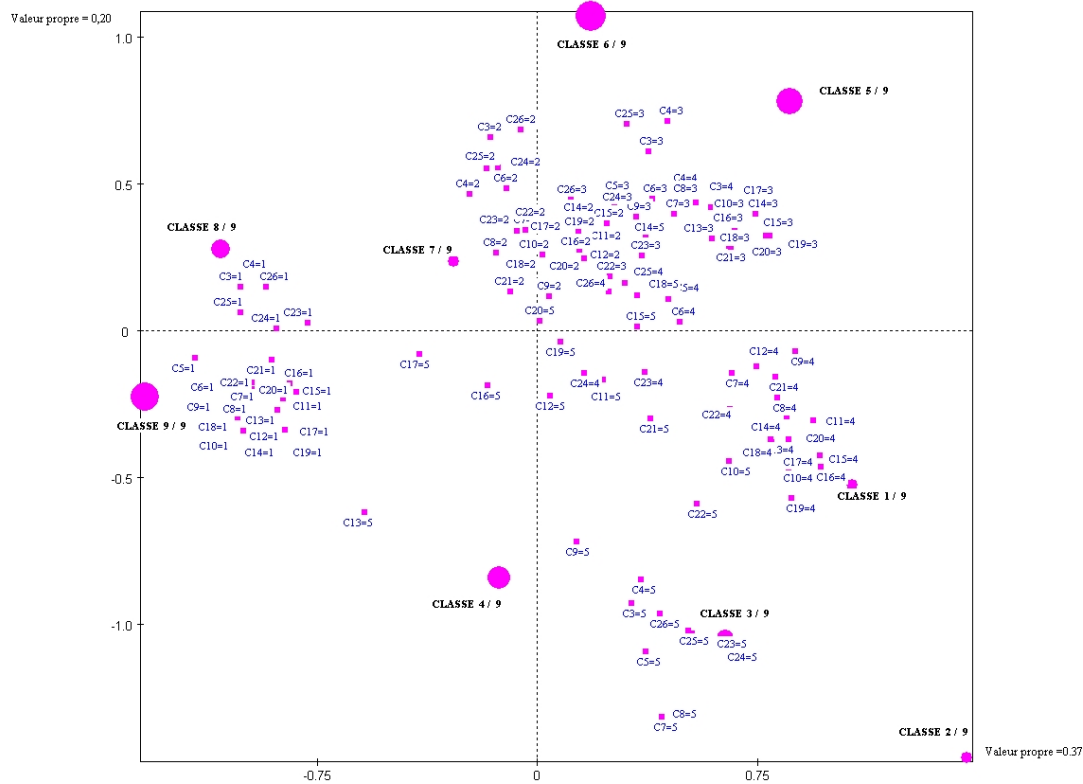


Figure 1 : Variables actives et positions relatives des classes dans le premier plan factoriel de l'ACM

L'axe 1 forme un gradient de niveaux de germe totaux, avec à gauche les niveaux faibles et à droite les niveaux élevés. Les valeurs manquantes se séparent en deux groupes.

Tableau 1. Nombre d'individus, moyenne des valeurs manquantes et moyenne géométrique en ufc/mL de germes totaux des laits de troupeaux par classe et année

Classe	2001			2002			2003			2004			Ens. des années		
	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy
1	36	7,1	31 000	11	6,0	22 000	3	7,7	16 000	3	7,7	19 000	53	7,0	27 000
2	24	6,0	56 000	17	5,6	45 000	10	5,2	46 000	5	5,4	40 000	56	5,7	49 000
3	46	7,2	21 000	31	7,7	15 000	7	6,9	23 000	5	6,8	18 000	89	7,3	19 000
4	4	5,5	16 000	37	4,9	14 000	5	5,4	13 000	29	5,6	11 000	121	5,3	13 000
5	87	1,1	24 000	33	0,6	24 000	28	1,0	22 000	5	0,6	23 000	153	1,0	24 000
6	73	1,5	18 000	44	0,7	16 000	37	0,8	14 000	15	0,6	14 000	169	1,0	16 000
7	8	5,5	18 000	15	5,2	12 000	17	6,4	13 000	10	6,1	9 000	50	5,8	12 000
8				71	0,3	10 000	6	0,8	10 000	29	0,5	8 000	106	0,4	10 000
9				4	0,0	10 000	95	1,4	9 000	61	1,6	7 000	160	1,4	8 000
Ens.	278	3,6	24 000	263	2,8	15 000	254	2,8	13 000	162	2,6	10 000	957	3,0	15 000

n : nombre d'éleveurs-année

mqt : nombre de valeurs manquantes en moyenne sur 24 prélèvements

moy. : moyenne géométrique d'ufc/mL de germes totaux

La seconde analyse réalisée sur le tableau des éleveurs a permis de définir une typologie en 6 groupes (R² de 0,46 après consolidation) :

- Le groupe 1 est caractérisé par l'appartenance aux classes 8 et 9 en tant qu'éleveur-année ;
- Le groupe 2 est caractérisé par l'appartenance aux classes 5 et 6 en tant qu'éleveur-année ;
- Le groupe 3 est caractérisé par l'appartenance à la classe 7 en tant qu'éleveur-année ;
- Le groupe 4 est caractérisé par l'appartenance aux classes 3 et 4 en tant qu'éleveur-année ;
- Le groupe 5 est caractérisé par l'appartenance à la classe 2 en tant qu'éleveur-année ;
- Le groupe 6 est caractérisé par les éleveurs présents une seule année et par l'appartenance à la classe 1 (valeurs manquantes).

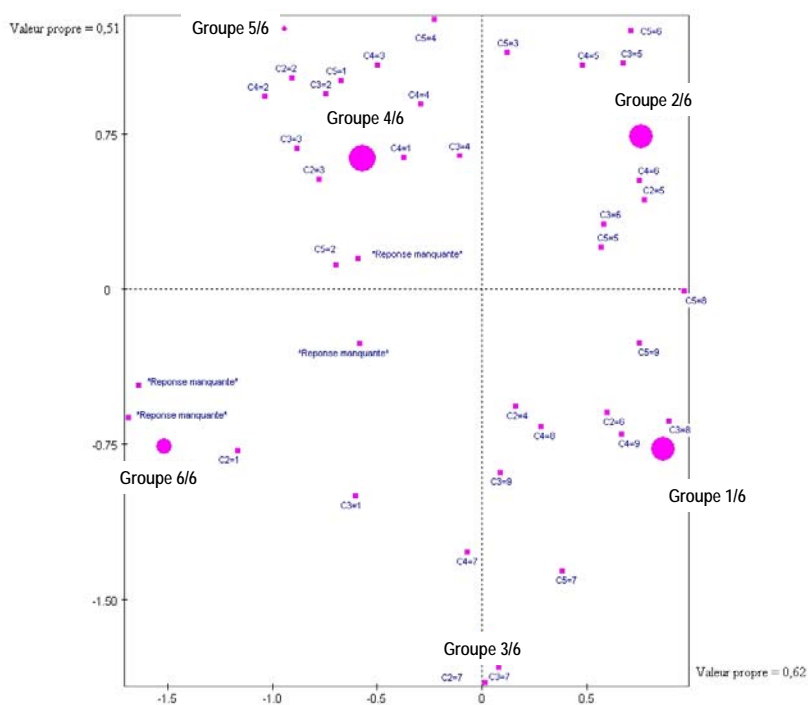


Figure 2 : Variables actives et positions relatives des classes dans le premier plan factoriel de l'ACM

L'axe 1 sépare les individus ayant surtout des valeurs manquantes (à gauche) des individus bien renseignés (à droite). L'axe 2 discrimine les niveaux de germes totaux (niveau faible en bas et élevé en haut).

Tableau 2. Nombre d'individus, moyenne des valeurs manquantes et moyenne géométrique des germes totaux (ufc/mL) des éleveurs par groupe et année

Classe	2001			2002			2003			2004		
	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy	n	mqt	moy
1	72	1,7	19 000	72	0,5	10 000	72	1,1	9 000	72	7,7	7 000
2	75	1,3	25 000	75	0,6	19 000	75	1,7	16 000	72	6,4	13 000
3	19	5,6	20 000	19	5,5	13 000	19	4,3	12 000	18	11,1	9 000
4	72	9,3	23 000	76	7,2	15 000	73	7,3	13 000	68	12,6	12 000
5	11	7,3	49 000	11	5,7	47 000	11	5,3	36 000	11	12,3	26 000
6	42	7,2	34 000	18	17,4	23 000	9	19,7	14 000	8	21,7	17 000
Ens.	291	4,9	24 000	271	5,2	15 000	259	5,9	13 000	249	11,0	11 000

n : nombre d'éleveurs

mqt : nombre de valeurs manquantes en moyenne sur 24 prélèvements

moy. : moyenne géométrique d'ufc/mL de germes totaux

La dynamique des niveaux de contamination en germes totaux est présentée Figure 3 pour les groupes 1 et 2 caractérisés respectivement à des niveaux faibles de germes et des niveaux moyens à élevés.

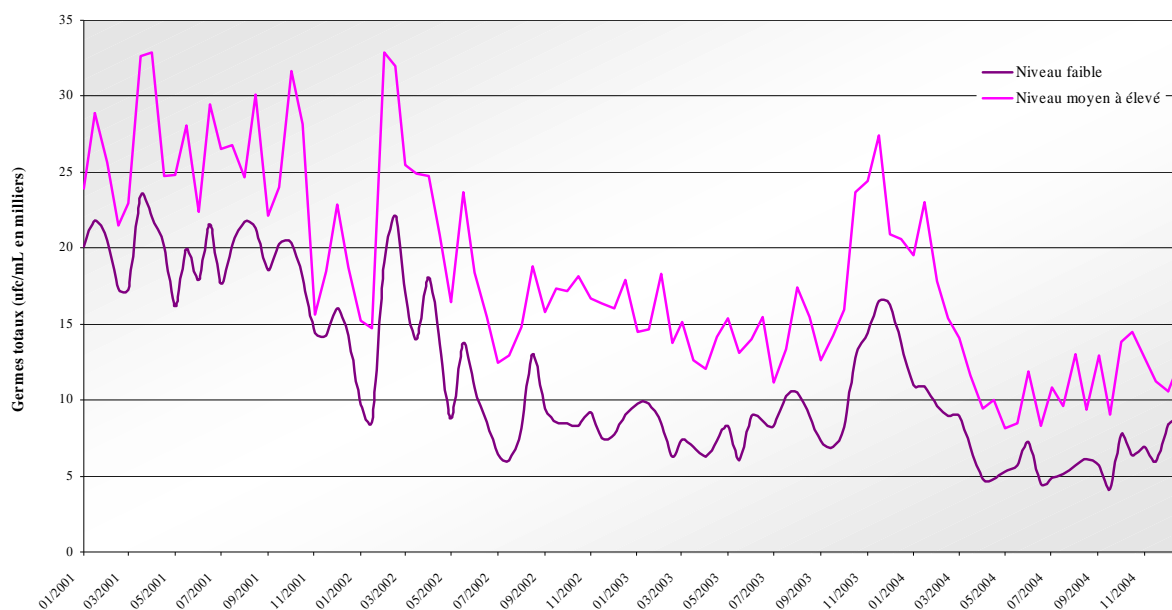


Figure 3 : Moyenne géométrique par quinze jours pour les groupes 1 et 2 caractérisés respectivement par des niveaux de germes totaux inférieurs et supérieurs à 20000/ml.

La correspondance entre les groupes selon les profils de contamination en SCP et les profils de germes totaux est synthétisée Tableau 3.

Tableau 3 : Correspondance entre les groupes selon les profils de contamination en SCP et les profils de germes totaux

Groupes « Germes totaux »	Groupes « Contamination en SCP »						Total
	Présent une année	VM et peu de SCP	VM et peu de SCP	Faible	Elevé	Intermédiaire	
VM, entre 10 000 et 30 000ufc/mL	5	2	56	4	4	10	81
VM, + de 30 000ufc/mL		1	6	1	3		11
Présent une seule année	18	6	2	3		2	31
VM, - de 20 000 ufc/mL		15	1	2		1	19
- de 20 000 ufc/mL	1	1	2	44	1	24	73
+ de 20 000 ufc/mL		3	4	26	7	35	75
Total	24	28	71	80	15	72	290

VM : valeurs manquantes ; SCP : staphylocoques coagulase positive

Annexe 1.4 : Résultats de la recherche d'entérotoxines totales dans les fromages à l'aide du kit Transia plate SET

Code échantillon fromage	Population en SCP en ufc/g	Résultats entérotoxines
4961 ^{*b}	> 1 000 000	-/-
5050 ^{*c}	> 1 000 000	-/-
7906 ^{*d}	> 1 000 000	-/-
9600 ^{*e}	530 000	-/-
6040 ^{* b}	440 000	-/-
8710 ^{*f}	320 000	-/-
7190 ^{* d}	280 000	-/-
9223 ^{* c}	270 000	-/-
7189 ^{* e}	260 000	-/-
8073 ^{* b}	170 000	-/-
7192 ^{* b}	130 000	-/-
7908 ^{*g}	130 000	-/-
8127 ^{*a}	120 000	+ / + / +
9340 ^{* b}	110 000	-/-
6039 ^{*g}	67 000	d / - / -
6035 ^{*e}	62 000	-/-
7525 ^{*g}	60 000	-/-
6034 ^{*h}	54 000	+ / - / -
7523 ^{*i}	52 000	-/-
5051 ^{* j}	51 000	-/-
4967 ^{*k}	40 000	-/-
4964 ^{*l}	30 000	+ / + / +
8934 ^{* b}	30 000	-/-
4957 ^{* o}	20 000	-/-
4959 ^{* p}	20 000	-/-
4968 ^{* q}	20 000	-/-
4969 ^{* i}	20 000	-/-
5049 ^{* r}	20 000	-/-
6044 ^{*k}	20 000	-/-
7910 ^{*f}	18 000	-/-
6032 ^{*s}	17 000	- / d
8071 ^{*e}	15 000	-/-
4963 ^{*k}	14 000	-/-
7187 ^{*s}	12 000	d / d
4958 ^{*t}	10 000	-/-
8770 ^{*c}	10 000	-/-
56614 ^{**m}	107 000	+ / + / +
72727 ^{**n}	35 800	+ / + / +
89119 ^{**n}	26 000	+ / +
64449 ^{**n}	17 100	-/-
56615 ^{**u}	12 600	+ / +

SCP : staphylocoques à coagulase positive ; * : échantillons envoyés par le laboratoire du Vaucluse ; ** : échantillons envoyés par le laboratoire de Touraine ; d (douteux) : résultat se situant au niveau du seuil de positivité ; (lettre) : échantillon provenant d'un même producteur.

Annexe 1.5 : Caractérisation du potentiel entérotoxigène des souches issues des laits des chèvres excrétrices identifiées en 2004

Eleveur	sea	seb	sec	sed	see	seg	seh	sei	sej	sek	sel	sem	tsst	sak	agr
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	ND
2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	ND
10	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	1
12	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
17	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	ND
	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	ND
18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	ND
21	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	3

Annexe 1.6 : Caractérisation du potentiel entérotoxigène des souches issues des laits des chèvres excrétrices identifiées en 2005

Eleveur	sea	seb	sec	sed	see	seg	seh	sei	sej	sek	sel	sem	tsst	sak	agr
8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
14	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3
22	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	1
	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	
	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	3
23	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	3
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3
	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	3
	24	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1

Annexe 1.7 : Fréquence des allèles pour chaque locus amplifié (*coa*, *sav*, *fnb*, *clfA*, *clfB*) dans les isolats de *S. aureus* provenant de différents sites de prélèvement

	Nombre d'isolats provenant de :						
	Lait de chèvre excrétrice	Lait de tank	Fromage	Biofilm	Peau des mamelles	Mains des producteurs	Fosses nasales des producteurs
<i>Allèles du gène Sav 1078</i>							
A1	27	22	29	0	15	0	5
A2	0	9	30	11	3	5	11
A3	13	39	106	0	0	0	0
A4	12	39	4	1	29	0	8
A5	7	46	9	0	0	0	0
<i>Allèles du gène Coa</i>							
*A1	31	90	125	1	31	0	11
A2	24	11	25	1	16	5	2
A3	0	5	7	10	0	0	0
A4	4	50	2	0	0	0	8
A5	0	0	0	0	0	0	3
<i>Allèles du gène fnb</i>							
A1	0	6	7	10	0	0	0
A2	0	2	1	1	0	0	7
A3	5	10	17	0	0	0	3
A4	2	36	1	0	0	2	11
A5	24	7	25	0	15	2	0
A6	24	76	100	1	30	1	2
A7	0	3	8	0	0	0	0
A8	0	0	0	0	2	0	0
A9	4	15	19	0	0	0	0
A10	0	0	0	0	0	0	2
<i>Allèles du gène ClfA</i>							
A1	27	90	132	12	8	3	12
A2	4	10	13	0	0	2	2
A3	21	55	33	0	39	0	8
A4	0	0	0	0	0	0	2
A5	7	0	0	0	0	0	0
<i>Allèles du gène ClfB</i>							
A1	8	0	2	0	0	0	0
A2	2	2	25	11	0	0	4
A3	22	56	18	0	6	1	8
A4	25	80	114	1	41	4	12
A5	2	17	19	0	0	0	0

Les allèles les plus fréquemment rencontrés pour *sav1078* sont :

- A1 : dans les souches issues des laits des chèvres infectées ;
- A2 : dans les souches présentes sur la peau des mamelles, sur les mains ou dans les fosses nasales des producteurs ;
- A3 : dans les souches isolées des fromages ;
- A4 : dans les souches isolées des laits de tank.

Les allèles les plus fréquemment rencontrés pour *coa* sont :

- A1 : dans les souches issues des laits des chèvres infectées, dans les souches présentes sur la peau des mamelles, ou dans les fosses nasales des producteurs, dans les souches isolées des fromages et des laits de tank ;
- A2 : dans les souches isolées sur les mains des producteurs ;
- A3 : dans les souches isolées des biofilms des installations de traite.

Les allèles les plus fréquemment rencontrés pour *fnb* sont :

- A1 : dans les souches isolées des biofilms ;
- A4 : dans les souches présentes sur les mains ou dans les fosses nasales des producteurs ;
- A5 : dans les souches issues des laits des chèvres infectées ou présentes sur les mains ;
- A6 : dans les souches issues des laits des chèvres infectées, isolées des laits de tank et des fromages ou encore présentes sur la peau des mamelles.

Pour *clfA*, l'allèle A1 est dominant dans tous les environnements exception faite de la peau des trayons (allèle A3 prédominant).

Les allèles les plus fréquemment rencontrés pour *ClfB* sont :

- A2 : dans les souches isolées des biofilms ;
- A3 : dans les souches issues des laits des chèvres infectées ;
- A4 : dans les souches issues des autres sites de prélèvement.

Annexe 1.8 : Origine des contaminations par *S. aureus* des laits et des fromages au sein de chaque exploitation

Producteur 1 :

L'analyse des profils des 6 souches isolées des fromages a révélé 4 profils MLVA différents (combinaison des 6 TRs). Au cours de la première période de prélèvement, les laits de mélange et les fromages présentaient des niveaux de contamination inférieurs aux seuils de détection, ne permettant pas d'isoler de souches de staphylocoques coagulase positive. Un profil d'une souche isolée du fromage P3 est similaire à celui obtenu pour une souche isolée du lait d'une chèvre infectée. Les 3 autres profils sont différents et uniques. Par contre, une souche issue d'un lait individuel de chèvre n'est pas retrouvée dans le fromage. Les souches isolées du fromage de la période 2 (P2) sont différentes de celles isolées du fromage de la période 3 (P3) ce qui suppose une contamination différente entre les deux périodes.

En conclusion, le fromage P3 est contaminé en *S. aureus* par une souche provenant du lait d'une chèvre excrétrice et isolée au cours de la première période de suivi (P1), ce qui suggère une persistance de l'excrétion chez l'animal infecté. Les 3 autres souches isolées de ce fromage correspondent à une source de contamination différente qui n'a pas été déterminée. Les 2 souches issues du fromage P2 témoignent d'une contamination différente qui n'a pu être mise en relation avec la présence de chèvres infectées.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
271	1	lait chèvre	P1	3	1	6	1	4	2
115	1	fromage	P2	3	1	9	2	4	2
116	1	fromage	P2	3	1	9	3	4	2
270	1	lait chèvre	P1	4	1	6	3	4	2
222	1	fromage	P3	4	1	6	3	4	2
223-225-224	3	fromage	P3	4	1	9	1	4	2

Producteur 2 :

L'analyse des 20 souches isolées des fromages a révélé 2 profils MLVA différents ce qui suppose l'existence de deux contaminations différentes.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
272	1	lait chèvre	P1	1	2	5	1	4	2
197	1	biofilm		2	2	2	1	2	1
144	1	lait tank	P2	3	1	4	1	4	2
151-152-153	3	fromage	P2	3	1	4	1	4	2
273-274	2	laits chèvre	P1	3	1	6	1	4	2
18-25-20-22-23-24-21-19	8	lait tank	P1	3	1	6	1	4	2
145	1	lait tank	P2	3	1	6	1	4	2
52-49-54-53-57-58-50-48-47-51-55-59-56	13	fromage	P1	3	1	6	1	4	2
154	1	fromage	P2	3	1	6	1	4	2
226-227-228	3	fromage	P3	3	1	6	1	4	2

Un profil, commun à 3 souches de fromage P2, est identique à celui d'une souche isolée du lait de tank P2. Le second profil, obtenu à partir de 17 souches de fromages P1, P2 et P3, est identique à celui d'une souche isolée de laits P1 et P2 (sachant que le lait P3 présentait un dénombrement inférieur à

10) et de 2 souches isolées de laits de chèvres individuels. Les contaminations en *S. aureus* dans les fromages sont dans les deux cas issues des laits de tank. Ceux-ci ont eux-mêmes été contaminés par une souche provenant des laits de chèvres infectées. Une autre souche isolée du lait d'une chèvre excrétrice n'a été retrouvée ni dans le lait de tank ni dans les fromages. De la même façon, la souche isolée du biofilm n'a été retrouvée dans aucun lait de tank ni fromage.

Dans cette exploitation, la contamination du lait de tank et des fromages semble principalement mais non exclusivement due à la présence de chèvres excrétrices, l'excrétion se maintenant pendant l'ensemble du suivi soit d'avril à juin.

Producteur 3 :

Dans cette exploitation, la faible contamination des laits de tank (moins de 10 ufc/ml) n'a pas permis d'isoler les souches de *S. aureus* présentes. L'analyse des 15 souches isolées de fromages des 3 périodes a révélé 2 profils MLVA différents. Des souches de fromages P1 et P3 ont des profils identiques et différent de celle isolée au cours de la période 2. Les souches sont, dans tous les cas, différentes des 2 souches isolées des mains.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
155	1	fromage	P2	1	2	5	1	4	2
331-332	2	main		2	2	5	2	4	1
231-230-229	3	fromage	P3	2	2	5	1	4	2
66-67-68-69-70-60-62-61-65-63-64	11	fromage	P1	2	2	5	1	4	2

Chez ce producteur, l'origine des 2 contaminations différentes en *S. aureus* n'a pas pu être identifiée. Il ne s'agit pas des mains. Les autres sources de contamination envisagées (biofilm, peau des mamelles des chèvres,...) présentent des niveaux de contamination en *S. aureus* inférieurs au seuil de détection. En particulier, aucune chèvre infectée n'a été détectée sur la foi d'analyses bactériologiques ce qui suggère soit l'absence effective d'animaux excréteurs, soit l'existence de faibles niveaux de contamination ou d'excrétion.

Producteur 4 :

L'analyse des 28 souches isolées de fromages a révélé 5 profils MLVA différents. Seul un profil (souches de fromages P3) est identique au profil de 9 souches isolées de biofilm et de 2 souches isolées de lait de tank P1. Un profil (1 souche de fromage P1) est identique à celui d'une souche isolée du lait d'une chèvre infectée. Un profil de souches de fromage P2 est identique à celui de souches isolées de lait de tank P2. Un autre profil est différent de ceux des souches isolées de biofilm, de lait de tank et de laits de chèvre individuels.

Les souches de biofilm, laits de tank et laits individuels de chèvre appartiennent à des groupes différents.

Les souches isolées du fromage de la période 1 sont différentes de celles isolées du fromage de la période 2 et de celles isolées de la période 3. Certaines souches isolées des laits de tank P1 et P3 ne sont pas retrouvées dans les fromages.

On peut conclure que la contamination en *S. aureus* dans les fromages P3 provient probablement du biofilm de l'installation de traite. Parmi les 13 souches isolées du fromage de la période 1, une seule correspond à la souche de *S. aureus* isolée du lait de la chèvre infectée détectée dans l'élevage. La contamination du fromage P2 est partiellement la même (6 souches sur les 7 isolées) que celle du lait

de mélange correspondant. Pour les 12 autres souches issues des fromages P1 ou P2, l'origine des contaminations n'est pas déterminable sur la base des souches isolées.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
214	1	biofilm		2	3	1	1	2	2
34-35	2	lait tank	P1	2	3	1	1	2	2
311	1	fromage	P3	2	3	1	1	2	2
312-313-307-308-309-310	6	fromage	P3	2	3	1	1		2
220-219-218-212-213-216-217-211	8	biofilm		2	3	1	1		2
74-76-78-80-82-84-83-81-77	9	fromage	P1	2	3	2	2		2
71	1	fromage	P1		3	2		4	2
73	1	fromage	P1	2		2	2		2
75-79	2	fromage	P1	2		2			2
146	1	lait tank	P2	2	3	3	1	2	1
156-157-158-159-160-162	6	fromage	P2	2	3	3	1		1
288	1	Lait tank	P3	3	1	6	3	4	2
72	1	fromage	P1	3	1	6	1		2
315	1	lait chèvre	P1	3	1	6	1	4	2
161	1	fromage	P2	3	3	3	1	2	2
36-39-37-38	4	lait tank	P1	4	1	6	3	4	1

Producteur 6 :

L'analyse des 31 souches isolées de fromages a révélé 3 profils MLVA différents.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
118	1	fromage	P1	1			1		2
147	1	lait tank	P2	2	1	4	1	4	2
320-321	2	fosses nasales		2	1	6	1	4	1
337-338	2	chiffonnettes		2	1	8	1	4	1
323-324	2	mains		2	2	4	1	4	1
329	1	fosses nasales		2	2	4	1		1
330	1	fosses nasales		2	2	4	1	4	1
322	1	main		2	2	6	1	3	1
314	1	lait chèvre	P1	3	1	6	1	4	2
46	1	lait tank	P1	3	1	6	1	4	2
117-119-122	3	fromage	P1	3	1	6	1	4	2
167-169-165-163-168-170	6	fromage	P2	3	1	6	1	4	2
234-235-240-243-245-237-239- 238-241-244-242-236-246-247	14	fromages	P3	3	1	6	3	4	2
120-121-123	3	fromages	P1	3	1	6	3		2
232-233	2	fromages	P3	3	1	6	3		2
164-166-	2	fromages	P2	3	1	6	3		2
148	1	lait tank	P2	3	1	7	2		2
221	1	biofilm		4	1	6	1	4	2

Seul un profil (3 souches de fromages P1, 6 souches de fromages P2) est identique au profil d'1 souche isolée de lait de chèvre individuel et de lait de tank P1. Les 2 autres profils sont différents de ceux obtenus pour les souches isolées de biofilm, de lait de tank et de laits de chèvre infectées, des mains, des fosses nasales, et des peaux des mamelles des chèvres. L'ensemble des souches isolées du fromage de la période 3 et certaines de celles isolées au cours des périodes précédentes (P1 et P2) sont identiques.

On peut conclure qu'il y a au moins trois sources de contaminations différentes dans les fromages de ce producteur. La contamination des fromages P1 (3 souches sur 7 isolées) et P2 (6 souches sur 8) provient du lait d'une chèvre excrétrice. Pour les autres souches mises en évidence dans les fromages, l'origine de la contamination ne peut être déterminée à partir des souches étudiées. Elle n'apparaît pas comme pouvant être d'origine humaine.

Producteur 10 :

L'analyse des 18 souches isolées de fromages a révélé 4 profils MLVA différents.

Un profil, commun à 4 souches de fromage P2, est identique à celui d'une souche isolée du lait de tank P3. Un profil de 2 souches de fromage P1, est identique à celui de souches isolées des laits P2 (1 souche) et P3 (3 souches). Enfin, un profil, obtenu à partir de 11 souches de fromages P2 et P3, est identique à celui de 9 souches isolées des laits de tank P2 et P3 et du lait d'une chèvre excrétrice. Une souche, isolée du fromage P2, a un profil différent des autres souches de fromages et différent des souches de lait de chèvre et lait de tank.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
173-178-179-180	4	fromage	P2	1	4	5	1	5	2
202	1	lait tank	P3	1	4	5	1	5	2
130	1	lait tank	P2	1	4	6	1	5	2
198-199-200	3	lait tank	P3	1	4	6	1	5	2
126-127	2	fromage	P1	1	4	6	1	5	2
290-291-292-289	4	lait tank	P3	1	4	9	1	5	2
448	1	lait chèvre	P1	1	4	9	1	5	2
129-131-132-133	4	lait tank	P2	1	4	9	1	5	2
174-175-177	3	fromage	P2	1	4	9	1	5	2
201	1	lait tank	P3	1	4	9	1	5	2
294-295-300-293-298-299-296-297	8	fromage	P3	1	4	9	1	5	2
176	1	fromage	P2	1	4	9	2	5	2

On peut conclure que les contaminations en *S. aureus* dans les fromages proviennent, entre autres, du lait de tank qui a servi à la transformation (3 contaminations sur 4). Dans le cas des fromages P2 et P3, certaines des souches à l'origine de la contamination sont retrouvées dans le lait de la chèvre identifiée comme excrétrice. Cependant, une contamination du fromage P2 fait apparaître l'existence d'autres origines possibles non déterminées au travers des analyses réalisées.

Producteur 12 :

L'analyse des 36 souches isolées de fromages a révélé 7 profils MLVA différents. Trois de ces différentes contaminations ont pu être déterminées. Un profil, obtenu à partir de 1 souche de fromage P1 est identique à celui de souches isolées du lait de tank P3. Un profil, commun à 23 souches de fromages des 3 périodes, est identique celui de souches isolées des laits de tank P1 (7 souches sur 8), P2 (1 souche sur 2) et P3 (1 souche sur 5) et du lait de 2 chèvres excrétrices. Un profil, obtenu à partir de 8 souches de fromages P1, P2 et P3, est identique celui d'une souche isolée du lait de tank P1 et celui du lait de 3 autres chèvre infectées. Les 4 autres profils de souches de fromage témoignent d'une diversité des profils des souches isolées des fromages P1, P2 et P3 qui sont différents de ceux des souches isolées à partir des autres prélèvements réalisés dans l'exploitation.

Aucune souche isolée des fosses nasales n'a été retrouvée ni dans le lait ni dans les fromages.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
333-334	2	fosses nasales		1	1	10	4	4	1
248	1	fromage	P3	1	2	2	1		2
249	1	fromage	P3	1					2
135	1	Lait tank	P2	3	1	4	1	3	2
283-279-281	3	3 laits chèvre	P1	3	1	6	1	3	2
27	1	lait tank	P1	3	1	6	1	3	2
87	1	fromage	P1	3	1	6	1	3	2
186	1	fromage	P2	3	1	6	1	3	2
257-255-258-250-253-254	6	fromage	P3	3	1	6	1	3	2
282-280	2	2 laits chèvre	P1	3	1	6	1	4	2
26-28-29-30-31-32-33-	7	lais tank	P1	3	1	6	1	4	2
134	1	lait tank	P2	3	1	6	1	4	2
204	1	lait tank	P3	3	1	6	1	4	2
97-93-91-92-90-88-85-89-86-94-95-96	12	fromage	P1	3	1	6	1	4	2
182-183-184-188-185-190-181-187	8	fromage	P2	3	1	6	1	4	2
251-252-256	3	fromage	P3	3	1	6	1	4	2
189	1	fromage	P2	3	1	6	1	5	2
98	1	fromage	P1	3	1	9	1	3	2
99	1	fromage	P1	3	1	9	1	4	2
205-206-207	3	lait tank	P3	3	1	9	1	4	2

On peut conclure que la contamination en *S. aureus* des fromages P1, P2 et P3 est majoritairement liée à la présence de chèvres excrétrices (31 souches sur 36 isolées), les souches issues du lait des animaux infectés se retrouvant à la fois dans le lait de tank et dans les fromages. Cependant, des profils de souches issues des fromages P1, P2 et P3 sont différents ce qui indiquerait d'autres sources de contamination (autre chèvre, biofilm ...).

Producteur 17 :

L'analyse des 21 souches isolées de fromages a révélé 4 profils MLVA différents.

Un profil, obtenu à partir de souches de fromages P2 et P3, est identique à une souche isolée du lait de tank P3. Un profil, regroupant des souches de fromages P2, est identique à celui d'une souche isolée du lait de tank P2. Un profil, commun à des souches de fromages P1, est identique à celui d'une souche isolée du lait de tank P3 et regroupe uniquement des souches staphylokinase positives. Enfin, un profil d'une souche de fromage P1 est différent de ceux de souches de lait de tank et de laits de chèvre individuels. La présence, pour cette souche, du gène codant la staphylokinase peut laisser supposer une contamination soit d'origine animale (lait d'une chèvre infectée), soit d'origine humaine. Par contre, un profil d'une souche du lait de tank P1 est identique à celui de souches isolées de deux chèvres excrétrices mais différent de ceux de souches isolées des fromages analysés. Des souches de lait P1 (staphylokinase positives) sont différentes de toutes les autres souches analysées et n'ont pas été retrouvées dans les fromages.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
109	1	fromage	P1	3	1	3	2		1
209-210	2	lait tank	P3	3	1	6	3	3	2
259-261-260-263-264-262	6	fromage	P3	3	1	6	3	3	2
191	1	fromage	P2	3	1	6	3	3	2
139-140-141	3	lais tank	P2	3	1	6	3	4	2
193	1	fromage	P2	3	1	6	3	4	2
142	1	lait tank	P2	3	1	6		4	2
136-138	1	Lait tank	P2	3	1	6	3		2
192	1	fromage	P2	3	1	6	3		2
143	1	lait tank	P2	3	1	6	3		2
137	1	lait tank	P2	3	1		3		2
1-2-3-4-5-6-8-9	8	lait tank	P1	5	1	3	1	3	1
208	1	lait tank	P3	5	1	3	1	2	1
100-101-102-103-104-105-106-107-108-110-111	11	fromage	P1	5	1	3	1	2	1
316-317-319	3	3 laits chèvre	P1	5	1	3	2	3	1
7	1	lait tank	P1	5	1	3	2	3	1

On peut conclure que la contamination des fromages par *S. aureus* prend sa source dans celle du lait de tank (3 profils de souches sur les 4 identifiées par VNTR). Dans cet élevage, l'origine des contaminations semble différer d'une période à l'autre. Une des sources de contamination (fromages P1) des fromages pourrait être d'origine humaine ou animale. Enfin, on confirme pour le lait P1 l'existence d'une contamination par le lait de chèvres infectées.

Producteur 18 :

L'analyse des 11 souches isolées de fromages des 3 périodes a révélé 2 profils MLVA différents qui laissent supposer deux origines de contamination différentes.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	staphylo
42-43-45	3	lait tank	P1	2	1	1	2	4	1
44	1	lait tank	P1	2	1	1	2		1
40	1	lait tank	P1	2	1	2	2	4	1
112	1	fromage	P1	2	1	2	2		2
114	1	fromage	P1	2		2	2		2
149-150	2	lait tank	P2		1	7	2	4	2
113	1	fromage	P1	3	1	7		4	2
194-195-196	3	fromage	P2	3	1	7	2	4	2
268-267-266-269-265	5	fromage	P3	3	1	7	2	4	2
318	1	lait chèvre	P1	5	1	3	2	3	1
41	1	lait tank	P1	5	4	4		4	2

Ces 2 profils sont différents de ceux de souches isolées des laits individuels de chèvres. Par conséquent, les 2 contaminations différentes ne proviendraient pas du lait des chèvres excrétrices. Un profil de souches isolées des fromages P1, P2 et P3 est identique à celui d'une souche de lait de tank P2. L'origine de cette contamination, non déterminée, est apparemment commune à des fromages des 3 périodes. L'autre profil des souches de fromages P1 est retrouvé dans le lait de tank P1. Par contre, deux profils de souches staphylokinase positives également présentes dans le lait P1 n'ont pas été isolés dans les fromages. De même, une autre souche issue du lait de tank P1 présente un profil

différent également absent dans les fromages. La souche isolée du lait de la chèvre identifiée comme excrétrice n'a pas été retrouvée dans les laits et les fromages analysés.

Chez ce producteur, on peut seulement affirmer que la contamination du lait de tank est à l'origine de celle des fromages qui en sont issus.

Producteur 8 :

1) Origine des contaminations dans les fromages (2004 et 2005)

L'analyse des 10 souches isolées de fromages en 2004 a révélé 7 profils MLVA différents. Six contaminations différentes ont pu être mises en évidence. Une seule peut être imputée à la présence de chèvres excrétrices. En effet, le profil défini sur une des souches isolées dans le fromage P2 est similaire à celui d'une souche provenant des laits des chèvres excrétrices (présentes en 2004 et / ou en 2005). Un profil d'une souche isolée du fromage P3 est identique à celui de 4 souches isolées sur la peau des mamelles en 2004 (chiffonnettes). Les souches correspondant aux quatre autres profils trouvent leur source dans le lait de mélange. Parmi ces profils de souches, l'un d'eux est commun aux fromages P1, P2 et P3 et similaire à un profil de souche de lait de tank P1. Un profil de souches de fromage P1 distinct du précédent est identique à un profil de souche de lait de tank P1, et deux profils différents de souches de fromage P3 sont identiques à deux autres profils de souches de lait de tank P1. Dans ce dernier cas, on peut noter que le profil des souches de fromage et de lait prélevés en 2004 est également commun à des souches isolées de chiffonnettes en 2005. On peut alors conclure que les souches présentes sur la peau en 2005 étaient au moins pour partie déjà présentes en 2004 et sont, de fait, retrouvées dans des laits et des fromages de 2004. L'origine de la septième contamination (1 souche isolée du fromage P3) n'a pu être déterminée car la souche de *S. aureus* présente un profil complètement différent de ceux obtenus pour les diverses souches analysées.

Les 2 souches des laits de chèvres excrétrices isolées en 2004 présentent un profil identique à celui des 4 souches isolées de laits de chèvres excrétrices en 2005 ce qui traduit dans le cas présent que les souches des animaux infectés sont les mêmes d'une année à l'autre.

Aucune souche isolée des fosses nasales n'a été retrouvée dans les laits ni les fromages. Par ailleurs, les souches isolées des fosses nasales en 2004 sont différentes des souches isolées en 2005 ce qui exclurait une infection chronique.

2) Origine de contamination des laits de mélange 2005

L'analyse des 20 souches isolées du lait de mélange prélevé en 2005 a mis en évidence 5 origines de contaminations différentes dont une seulement a pu être déterminée par similitude des profils des souches de lait avec le profil de souches de chiffonnettes (2 souches sur les 20 isolées dans le lait). Les 4 autres profils sont différents de ceux des souches de laits individuels de chèvre, des chiffonnettes ou des fosses nasales mais se caractérisent par la présence du gène staphylokinase ce qui présume d'une contamination d'origine humaine ou animale.

N° souches	Total	Origine	Période	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
341-339-340-342-	4	chiffonnette	2004	1	2	5	1	3	2
306	1	fromage	P3 (2004)	1	2	5	1	3	2
10-13-14	3	lait tank	P1 (2004)	1	2	5	1	4	2
124	1	fromage	P1 (2004)	1	2	5	1	4	2
172	1	fromage	P2 (2004)	1	2	5	1	4	2
303-304	2	fromage	P3 (2004)	1	2	5	1	4	2
398	1	chiffonnette	2005		2	5		4	2
441-443-442-444-	4	laits chèvre	2005	1	2	5	3	3	1
445-446	2	laits chèvre	2004	1	2	5	3	3	1
171	1	fromage	P2 (2004)	1	2	5	3	3	1
16	1	lait tank	P1 (2004)	1	2	5	3	4	2
390-391	2	lait tank	2005	1	2	5	3	4	2
392-393-395-396-399-400-403-402-394	9	chiffonnette	2005	1	2	5	3	4	2
305	1	fromage	P3 (2004)	1	2	5	3	4	2
125	1	fromage	P1 (2004)	1	2	6	1	3	2
17	1	lait tank	P1 (2004)	1	2	6	1	3	2
397	1	chiffonnette	2005		2	6			2
15	1	lait tank	P1 (2004)	1	2	6	1	4	2
11-12	2	lais tank	P1 (2004)	1	2	9	1	4	2
302	1	fromage	P3 (2004)	1	2	9	1	4	2
128	1	lait tank	P2 (2004)	1	4	9	1	5	2
404-405-406	3	nez apprenti	2005	1	5	3	1	2	1
407	1	nez apprenti	2005	2	1	2	1	4	1
409-408-410-411	4	nez mme	2005	2	1	2	1	4	1
325-326	2	fosses nasales	2004	2	1	2	2	4	1
401	1	chiffonnette	2005	2	2	5	3	4	2
301	1	fromage	P3 (2004)	3	4	9	1	1	2
502-504	2	lais tank	2005	4	1	6	1	2	1
490-491-492-493-494-503-500	7	lait tank	2005	4	1	6	1	4	1
495-496-497-498-499-501	6	lait tank	2005	5	4	4	3	3	1
505-506-507	3	lait tank	2005	5	4	4	1	3	1

Producteur 21 :

L'analyse des 45 souches isolées de laits de mélange a révélé 6 profils MLVA différents qui dénotent des contaminations d'origine diverse. Trois contaminations ont pu être identifiées. Deux profils sont identiques à ceux de 2 souches différentes isolées des laits de chèvres excrétrices. Un de ces deux profils est similaire à ceux des écouvillons de nez (15 souches sur les 45 analysées). Un profil est identique à celui d'une souche isolée de chiffonnettes (6 souches sur 45). 17 souches de lait de mélange correspondent à 3 profils distincts, également différents de ceux des souches isolées et testées dans les prélèvements conduits sur l'exploitation ce qui témoigne de l'existence d'autres sources de contamination.

Des souches isolées de chiffonnettes ou de laits de chèvres excrétrices ne sont pas retrouvées dans les laits de mélange.

Sur l'échantillon de souches isolées, les souches présentes sur la peau des animaux différent de celles incriminées dans les infections. La présence de souches identiques dans les fosses nasales et dans le lait de chèvres excrétrices traduit la possibilité d'une contamination entre l'homme et l'animal et inversement, laquelle peut participer à la contamination du lait de tank.

Dans cette exploitation, moins de la moitié des souches isolées dans le lait de tank semblent provenir de l'animal malade mais, en incluant la contamination par la peau des trayons, la majorité (28 sur 45) ont une origine animale avérée.

N° souches	Total	Origine	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
415-418	2	2 laits chèvre	4	1	6	1	2	1
475-476-482-472-478-481-477	7	lait tank	4	1	6	1	2	1
373	1	chiffonnette	4	1	6	1	3	1
459-462-486-473-480-471	6	lait tank	4	1	6	1	3	1
414-416-417	3	3 laits chèvre	4	1	6	1	4	1
364-368-371-375-379-381-380-378-374-363-360-372-376-377-357-358-359-361-369-362-366-367-365-370	24	chiffonnette	4	1	6	3	4	1
350-352-354-351-355-353-356	7	lait tank	4	1	6	3	2	1
	8	écouvillons						
385-384-388-386-382-383-387-389		nez	5	4	4	3	3	1
412-413	2	2 laits chèvre	5	4	4	3	3	1
451-454-455-457-460-461-479-483-484-485-487-466-469-456-474	15	lait tank	5	4	4	3	3	1
463-452-453-464-468-470-450-458-465-467	9	lait tank	5	4	4	3	4	1
	1	lait tank	5	4	4	3		1

Producteur 22 :

En 2004, les 4 souches isolées des chèvres excrétrices ont été identifiées et typées. Leur analyse montre l'existence de 2 profils de souches différents négatifs pour le gène codant la staphylokinase. Ces profils diffèrent également de celui de la chèvre infectée dépistée en 2005 ce qui suggère, pour cette exploitation, une différence des souches ayant occasionné des infections mammaires d'une campagne à l'autre.

N° souches	Origine	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
287	1 lait chèvre	1	4	9	3	5	2
284-285-286	3 lait chèvre	3	1	6	3	4	2

En 2005, l'analyse des 5 souches isolées de laits de mélange a révélé 2 profils MLVA différents d'où deux sources de contamination différentes. Ces profils sont différents de ceux obtenus pour les souches isolées des laits de chèvre individuels et des chiffonnettes. L'origine de ces deux contaminations n'a pas pu être mise en évidence sur la base des souches étudiées mais les contaminations sont dues à des souches staphylokinase positives ce qui laisse supposer une contamination d'origine humaine ou animale. A l'inverse de ce qui avait été observé dans l'élevage précédent, la souche isolée du lait de la chèvre excrétrice dépistée dans le troupeau est identique à celles isolées sur les chiffonnettes.

N° souches	total	origine	sav	coa	fnb	clfA	clfB	sak
488-489	2	lait tank 2005	4	1	6	2	4	1
438	1	lait chèvre 2005	4	1	6	3	4	1
346-347-348-349	4	Chiffonnettes 2005	4	1	6	3	4	1
343-344-345	3	laits tank 2005	4	1	6	1	4	1

Annexe 2

Evaluation de l'ELISA en vue du dépistage spécifique des chèvres infectées
par *S. aureus*

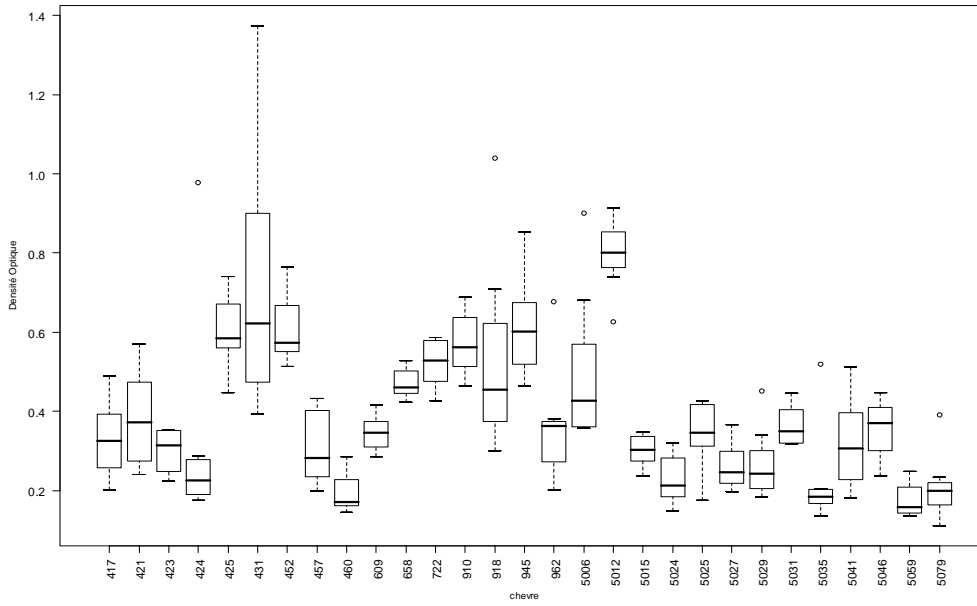
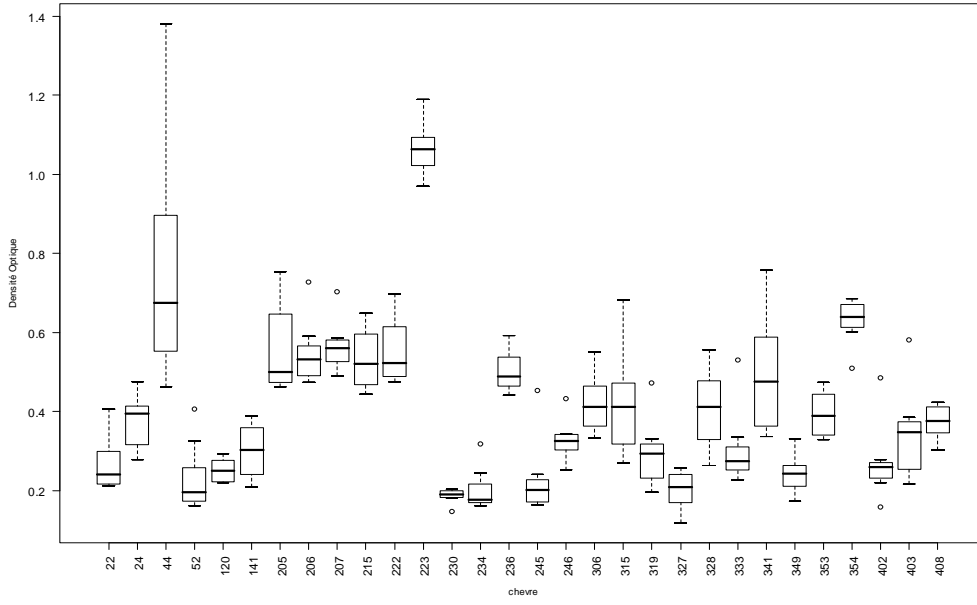
Annexe 2.1 : Evaluation de la concordance entre les résultats obtenus par analyse bactériologique et par ELISA selon la préparation antigénique employée et les seuils de densité optique retenus : détermination des effectifs pour chacune des 8 exploitations suivies

			Codes des élevages suivis																	
			1		2		6		7		12		14		17		18		total	
Antigène	Laits	Elisa Bact	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+	SC+	Non SC+
			2	28	2	42	1	63	2	10	4	36	3	7	3	68	1	8	18	262
			E + b +	E – b -	E + b +	E – b -	E + b +	E – b -	E + b +	E – b -	E + b +	E – b -	E + b +	E – b -	E + b +	E – b -	E + b +	E – b -	E + b +	E – b -
Ag2	1/1	M	2	19	2	27	0	44	2	6	3	26	2	6	0	46	1	6	12	180
		M+Sd	2	25	1	39	0	54	1	9	2	31	1	7	0	59	1	6	8	230
		-3ch M	2	13			0	41	2	6	4	22	3	4	0		1	4		
		M+Sd	2	21	2	33	0	50	2	6	3	21	2	4	0	56	1	5	12	196
	1/10	M	2	17	2	28	0	47	1	7	4	26	2	5	0	50	1	6	12	186
		M+Sd	1	24	2	40	0	56	0	9	3	33	2	7	0	66	0	7	8	242
		-3ch M	2	16	2	20	0	38	2	6			3	4	1	39	1	3		
		M+Sd	2	19	2	33	0	54	2	7	4	31	2	5	0	54	1	4	13	207
Ag3	1/1	M	1	18	2	30	1	36	1	5	4	23	3	7	3	40	1	4	16	163
		M+Sd	1	24	1	36	1	56	1	9	3	34	2	7	2	56	0	4	11	226
		-3ch M	1	16	2	27	1	30	2	4	4	22	3	4	3	36	1	3	17	142
		M+Sd	1	21	2	35	1	50	1	6	4	27	3	6	2	53	1	4	15	202
	1/10	M	1	21	2	29	1	38	2	7	4	27	3	7	3	42	1	5	17	176
		M+Sd	1	26	1	38	1	53	1	10	4	34	3	7	2	60	0	7	13	235
		-3ch M	1	17	2	26	1	38	2	5	4	26	3	5	3	43	1	4	17	164
		M+Sd	1	21	2	34	1	50	2	7	4	32	3	5	3	56	1	5	17	210
Ag4	1/1	M	1	18	2	22	1	40	2	6	4	23			2	37	1	3	13	149
		M+Sd	1	26	1	38	1	54	1	9	4	33			2	57	1	8	11	225
		-3ch M	1	11	2	25	1	33	2	5	4	19			2	34	1	6	13	133
		M+Sd	1	23	2	31	1	56	2	8	4	32			2	56	1	7	13	213

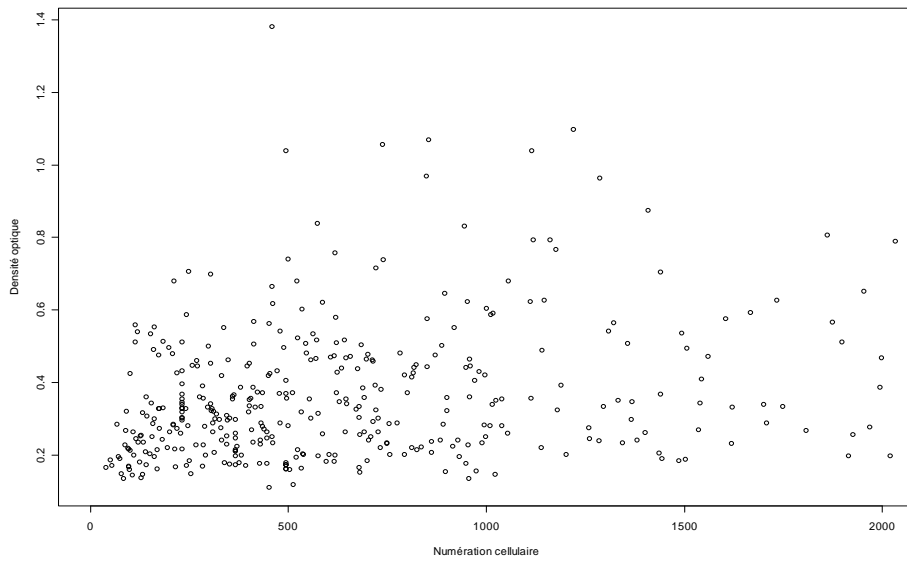
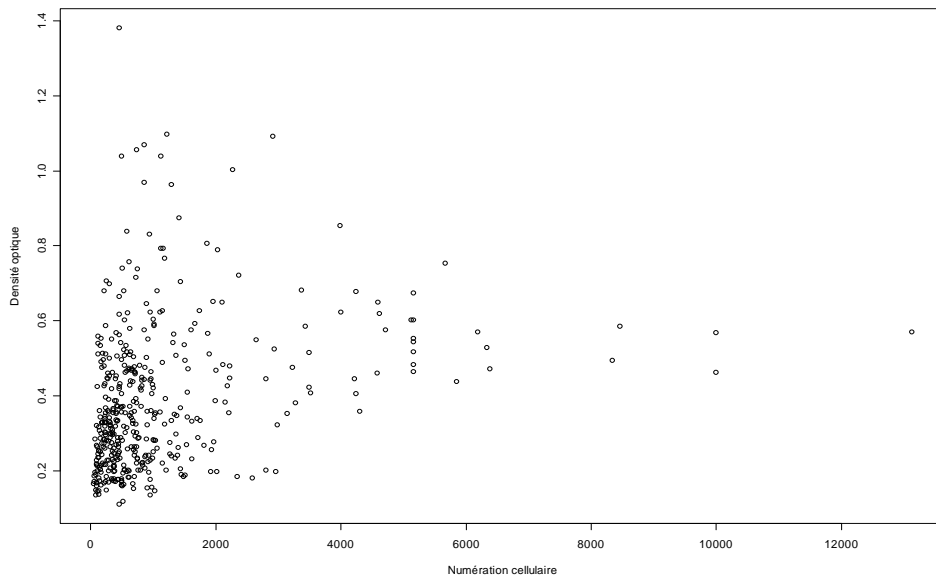
Ag : antigène; laits 1/1 : laits purs ; laits 1/10 : laits dilués au dixième ; -3 ch : exclusion des 3 chèvres présentant les valeurs de DO les plus fortes ;

M: moyenne; Sd : écart type ; E+ : animaux considérés comme infectés par S. aureus par la technique ELISA ; E- animaux considérés comme non infectés par S. aureus par la technique ELISA

b+ : animaux considérés comme infectés par S. aureus après analyse bactériologique de leur lait ; b - : animaux considérés comme non infectés par S. aureus après analyse bactériologique de leur lait



Annexe 2.2 : Box plots (médiane et quartiles) de la densité optique pour chaque chèvre suivie



Annexe 2.3 : Corrélations entre numérations cellulaires (milliers/ml) et densités optiques

Annexe 3

Dynamique des écosystèmes

Annexe 3.1 Laits de mélange collectés et analysés en 2005

Les laits correspondant aux numéros des cases grisées du tableau 1 ont été analysés à la fois en microbiologie conventionnelle et en analyse SSCP. Les laits 45, 46, 47, 49, 53, 54, 55 n'ont été analysés qu'en microbiologie conventionnelle.

Identification des laits de mélange collectés et analysés au cours de la campagne 2005.

Semaine	lundi	mardi	mercredi	jeudi	vendredi	samedi	dimanche
0						1	2
1	3	4	5	6	7	8	9
2	10	11	12	13	14	15	16
3	17	18	19	20	21	22	23
4	24	25	26	27	28	29	30
5	31	32	33	34	35	36	37
6	38	39	40	41	42	43	44
7	45	46	47	48	49	50	51
8	52	53	54	55	56	57	58
9	59	60	61	62	63	64	65
10	66	67	68	69	70	71	72
11	73	74	75	76	77	78	79
12	80	81	82	83	84	85	86
13	87	88	89	90	91	92	93
14	94	95	96	97	98	99	100
15	101	102	103	104	105	106	107
16	108	109	110	111	112	113	114
17	115	116	117	118	119	120	121
18	122	123	124	125	126	127	128
19	129	130	131	132	133	134	135
20	136	137	138	139	140	141	142
21	143	144	145	146	147	148	149
22	150	151	152	153	154	155	156
23	157	158	159	160	161	162	163
24	164	165	166	167	168	169	170
25	171	172	173	174	175	176	177
26	178	179	180	181	182	183	184
27	185	186	187	188	189	190	191
28	192	193	194	195	196	197	198
29	199	200	201	202	203	204	205
30	206	207	208	209	210	211	212
31	213	214	215	216	217	218	219
32	220	221	222	223	224	225	226
33	227	228	229	230	231	232	233
34	234	235	236	237	238	239	240
35	241	242	243	244	245	246	247
36	248	249	250	251	252	253	254
37	255	256	257	258	259	260	261
38	262	263	264	265	266	267	268
39	269	270	271	272	273	274	275
40	276	277	278	279	280	281	282
41	283	284	285	286	287	288	289
42	290	291	292	293	294	295	296
43	297	298	299	300	301	302	303
44	304	305	306	307	308	309	310
45	311	312	313	314	315	316	317
46	318	319	320	321	322	323	324
47	325	326	327	328	329	330	331
48	332	333	334	335	336	337	338
49	339	340	341	342	343	344	345
50	346	347	348	349	350	351	352
51	353	354	355	356	357	358	359

Annexe 3.2 Analyse microbiologique des laits

Les flores microbiennes ont été dénombrées sur 12 milieux différents

Conditions d'incubation et flore dénombrée sur différents milieux de dénombrement.

Milieux	Références	Incubation		Flore présumée
		Temps (jours)	Température (°C)	
Milieu 17 (M17)	Terzaghi <i>et al.</i> , 1975	3	30	Microorganismes mésophiles
Milieu 17 (M17)	Terzaghi <i>et al.</i> , 1975	2	42	Microorganismes thermophiles
Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF)	De Buyser <i>et al.</i> , 2003	1	37	Staphylocoques coagulase +
Slanetz Bartley (SB)	Slanetz <i>et al.</i> , 1957	2	42	Entérocoques
Oxytetracycline Glucose Agar (OGA)	FIL-IDF 94B, 1991	3 à 4	25	Levures et moisissures
Cephalosporin Fucidine Cetrimide (CFC)	NFV 04-504, 1988	2 à 3	30	<i>Pseudomonas spp.</i> et bactéries Gram -
Facultative Heterofermentative agar (FH)	Isolini <i>et al.</i> , 1990	3	30	Lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatives
Turner + acide nalidixique (T+a.n.)	Turner <i>et al.</i> , 1963	3	30	Lactocoques
PCA+L+ inhibiteur Gram+ (PCAI)	FIL-IDF 100B, 1991	3	30	Bactéries à Gram -
Mayeux Sandine Eliker (MSE)	Mayeux <i>et al.</i> , 1962	3	30	Leuconostocs dextranes positifs
Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM)	Denis <i>et al.</i> , 2001	5 et 10	25	Bactéries d'affinage
Violet red Bile Glucose (VRBG) agar	NFV 08-021, 1985	1	42	Entérobactérie

Annexe 3.3 Description des communautés microbiennes

1. Identification des isolats

Bactéries

L'identification des isolats d'origine bactérienne a nécessité d'avoir recours à une méthode de génétique moléculaire, la Polymerase Chain Reaction (PCR) dont la mise en œuvre a reposé sur les étapes suivantes :

Extraction ADN total :

L'ADN total des bactéries a été extrait à partir de 5 ml de culture de 24 h par utilisation du Kit Easy DNA Kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon le protocole indiqué par le fabricant. Le culot a été re-suspendu dans 50 μ L de tampon Tris-EDTA (TE).

Amplification des fragments d'ADNr 16S:

Les 450 paires de bases de l'extrémité 5' de L'ADNr 16S ont été amplifiées avec les amorces universelles W02 et W18. Pour ce faire, l'ADN génomique contenu dans 2 μ l d'échantillon a été amplifié dans le mélange réactionnel suivant : 0,25 μ M de chacune des amorces (W02 : 5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3' ; W18 : 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 200 μ M de chaque dNTP et une unité de *Taq* DNA polymérase en tampon 1X *Taq* avec $MgCl_2$ dans un volume final de 50 μ l. Le programme d'amplification a été le suivant : la dénaturation initiale a été réalisée à 94 °C pendant 3 min ; elle a été suivie de 30 cycles d'amplification de 30s à 94 °C, de 30s à 50 °C et de 1,3 min à 72 °C, puis d'une étape d'élongation de 10 min à 72 °C. Les produits d'amplification ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% en tampon TBE 0,5X et BET (Bromure d'éthidium).

Criblage des ADNr 16S par analyse RFLP:

Tous les ADNr 16S ont été analysés par la méthode de Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) à l'aide de deux enzymes de restriction EcoR1 et HaeIII selon le protocole suivant : 5 μ L de produit d'amplification PCR 16S ont été ajoutés à 0,5 μ L d'enzymes EcoR1 et Hae III (MP Biochemical, Vannes, France), 1,5 μ L de tampon (100 mM de KCl, 10 mM de tris-HCl, 0,1 mM d'EDTA, 10 mM de 2-mercaptoethanol, 500 μ g/mL de BSA, 50% de glycérol) et 7,5 μ L d'eau, dans un volume final de 15 μ L. Les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur, programmé 1 h à 37°C. Les produits de digestion ont ensuite été déposés avec des standards de migration (DNA step ladder 50 pb) sur un gel d'agarose à 2% dans du TBE 0,5X avec une migration de 2h à 120V.

Les profils RFLP générés ont été analysés avec le logiciel BioNumerics puis comparés entre eux par la méthode UGPMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) en calculant l'indice de Dice. Un dendrogramme a ainsi été généré à partir des matrices de similarité. Les ADN ayant un profil RFLP identique à 90% de similarité et plus ont été groupés et les ADNr 16S d'un ou plusieurs représentants de chaque groupe ont été séquencés.

Les différents profils obtenus ont été comparés aux profils d'une banque de référence RFLP constituée de souches de référence et de souches isolées à la suite de divers projets de recherche et appartenant aux principales espèces identifiées dans des laits et fromages.

Amplifications spécifiques de genres et d'espèces :

Les ADN des isolats Gram positif et catalase négatif ont été amplifiés avec des amorces spécifiques des genres *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Lactococcus* et des amorces spécifiques des espèces *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis lactis/cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei/paracasei* et *Lactococcus garviae*. Les différentes amorces utilisées sont décrites dans le tableau 3. Les PCR spécifiques ont été réalisées selon les protocoles décrits par Callon *et al.* (2004).

Liste des amorces pour amplifications spécifiques de genre et d'espèces.

Genre-espèces	Amorces	Séquences	Références
<i>Lactococcus lactis lactis/cremoris</i>	Lhis5F	5'-CTTCGTTATGATTTTACA-3'	Beimfohr <i>et al.</i> , 1997
	Lhis6R	5'-AATACCGCGGCTGCTGGC-3'	
<i>Lactococcus garviae</i>	pLG-1	5'-CATAACAATGAGAATCGC-3'	Zlotkin <i>et al.</i> , 1998
	pLG-2	5'-GCACCCTCGCGGGTTG-	
<i>Enterococcus</i>	E1	5'TCAACCGGGGAGGGT-3'	Deasy <i>et al.</i> , 2000
	E2	5'-ATTACTAGCGATTCCGG-3'	
<i>E. faecalis</i>	ddlE ₁	5'-ATCAAGTACAGTTAGTCT-3'	Dutka-Malen <i>et al.</i> 1995
	ddlE ₂	5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'	
<i>Ln mesenteroides</i>	Lnm1	5'-TGTCGCATGACACAAAAGTTA-3'	Cibik <i>et al.</i> , 2000
	Lnm2	5'-ATCATTTCTATTCTAGCTG-3'	
<i>Lactobacillus</i>	LbLMA1	5'-CTCAAACTAAACAAAGTTTC-3'	Dubernet <i>et al.</i> , 2002
	R16-1	5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3'	
<i>Lb casei</i>	Paracasei 16S	5'-CACCGAGATTCAACATGG-3'	Berthier <i>et al.</i> , 2001
	16reverse	5'-GAAAGGAGGTGATCCAGC-3'	

Séquençage de l'ADNr 16S:

50 μ L d'ADNr 16S ont été purifiés sur colonne et séquencés avec l'amorce W34 par la société GeneCust (Evry, France). Les 450 paires de base de l'extrémité 5' de l'ADNr 16S obtenues ont été comparées par des blasts avec les séquences d'ADNr 16S disponibles dans la database GeneBank. Les séquences ayant un pourcentage de similarité supérieur à 97% ont été considérées appartenant à la même espèce.

Levures

Tests phénotypiques :

Les levures ont été identifiées par l'analyse des tests morphologiques (aspect des colonies), biochimiques (assimilation des composés carbonés par méthode API ID32C, assimilation des composés azotés par méthode auxanographique, fermentation des sucres) et physiologiques (cultures à différentes températures, résistance aux antibiotiques) de Kurtzman et Fell, 1998. Les isolats ont été assignés à une espèce grâce à l'utilisation des clés dichotomiques de Barnett et al, 1990.

Identification moléculaire :

Le domaine D1/D2 de l'ADNr 26S de chaque isolat a été amplifié en utilisant les amorces NL1-NL4 selon le protocole suivant : l'ADN extrait contenu dans 2 µl d'échantillon a été placé dans un mélange réactionnel comportant 0,5 µM de chacune des amorces (NL1 : 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' ; NL4 : 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), 250 µM mélange dNTP, et une unité de *Taq* DNA polymérase en tampon 1X *Taq* avec MgCl₂, dans un volume final de 50 µl. Le programme d'amplification a comporté une dénaturation initiale réalisée à 94 °C pendant 3 min, suivie de 30 cycles d'amplification de 30s à 94 °C, de 30s à 50 °C et de 1,3 min à 72 °C puis d'une étape d'élongation de 10 min à 72 °C. Les produits d'amplification ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% en tampon TBE 0,5X et BET (Bromure d'éthidium). Les ADNr 26S obtenus ont été séquencés par la société GeneCust avec l'amorce NL4 et chaque séquence partielle d'ADNr 26S a ensuite été comparée par des blasts avec les séquences 26S déposées dans la database GenBank.

2. Identification des clones

Clonage de l'ADNr 16S :

Des banques de clones d'ADNr 16S ont été réalisées à partir de différents échantillons de lait (lait de tank 116, 188, 95, 103 et 90 et 151). L'ADN total du lait a été extrait par méthode phénol/chloroforme à partir de 10 ml de lait. Le protocole adopté a comporté les étapes suivantes :

- réalisation d'une PCR 16S avec les amorces WO2 et W18 (procédure identique à celle adoptée pour les isolats) ;
- vérification des produits de l'amplification sur gel d'agarose 1,5% en tampon TBE 0,5X + BET ;
- insertion des produits de l'amplification dans le vecteur PCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen).

Après transformation de cellules One Shot®, les clones ont été sélectionnés sur un milieu LB gélosé contenant 50µg/ml d'ampicilline. 340 clones ont ainsi été obtenus.

Analyses des inserts clonés par RFLP :

Une PCR 16S des inserts clonés a été effectuée avec les amorces M13F et M13R selon le protocole suivant : 2 µl ADN extrait ont été mis en mélange avec 0.25 µM de chacune des amorces (M13F : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' ; M13R : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), 200 µM mélange dNTP et une unité de *Taq* DNA polymérase en tampon 1X *Taq* avec MgCl₂, dans un volume final de 25 µl. Le programme d'amplification a comporté une phase de dénaturation de 3 min à 94 °C, suivie de 30 cycles d'amplification de 30s à 94 °C, de 30s à 50 °C et de 1,3 min à 72 °C, puis d'une étape d'élongation de 10 min à 72 °C. Une deuxième PCR 16S a été effectuée avec les amorces WO2 et W18 pour analyser les séquences 16S par RFLP. Le tri des clones par RFLP a été effectué d'une manière identique à celle décrite pour les isolats.

Séquençage des ADNr 16S :

Les ADNr 16S de 86 clones ont été séquencés selon le protocole décrit pour l'identification des isolats et les séquences obtenues ont été comparées à celles présentes dans les bases de données.

Annexe 3.4 Description des équilibres microbiens

1. Extraction et purification de l'ADN des laits

Les laits ont été décongelés au bain-marie à 25°C. Dix ml de lait ont été incubés à 37°C pendant 2h30 avec 150µl de pronase à 10mg/ml. Un millilitre de SDS 20% a été rajouté, et l'incubation a été poursuivie 1 h à 37°C. Le tout a été centrifugé 20 min à 8500g à 4°C.

La matière grasse figée a été retirée, l'échantillon a ensuite été incubé 10 min à 30°C afin de re-solubiliser le SDS précipité. L'échantillon a de nouveau été centrifugé 10 min à 8500g à température ambiante.

Le culot contenant les micro-organismes a alors été repris dans 150 µl de thiocyanate de guanidium 4M-Tris-Cl pH7.5 0,1M, N-Lauroyl sarcosine 1%. 200 µl de tampon phosphate pH 7,5 0,1M, 200 µl d'une solution d'acétate de sodium -EDTA 3M, 200 µl de phénol-chloroforme-ialcool isoamylique (25/24/1) pH 8,0 et 200 mg de billes de zirconium ont été rajoutés.

Deux cycles de broyage (2 min au vibro-broyeur, fréquence maximale, 2 min à 80 °C) ont été réalisés. Après une centrifugation de 20 min, 13000g à 4°C, la phase aqueuse a été récupérée. Une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1) pH 8,0 et une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24/1) ont été réalisées. L'ADN a ensuite été précipité par addition de 50µl d'acétate de sodium 3M et 1ml d'éthanol absolu. Après centrifugation 20 min, 13000g à 4°C et lavage à l'éthanol 70%, l'ADN a été repris dans 40 µl d'eau.

2. Amplification de la région variable V3 (bactéries)

Les ADN totaux de 118 laits ont été analysés en SSCP. La région V3 de l'ADNr 16S a été amplifiée avec les amorces W34 et W49 (Duthoit et al, 2003). Le mélange réactionnel contenait : du Tampon Pfu 1X, 0,2mM de dNTP, 0,3µM de chaque amorce W34 et W49, 0,5U de polymérase Pfu, 1µl d'ADN extrait des laits et de l'eau de manière à parvenir à un volume total de 25µl. Après une étape de dénaturation d'une durée de 3 min à 96°C, 25 cycles de 30 sec à 96°C, 30 sec à 61°C, 30 sec à 72°C, suivis d'une étape d'élongation de 10 min à 72°C ont été appliqués. La taille des produits d'amplification a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5%.

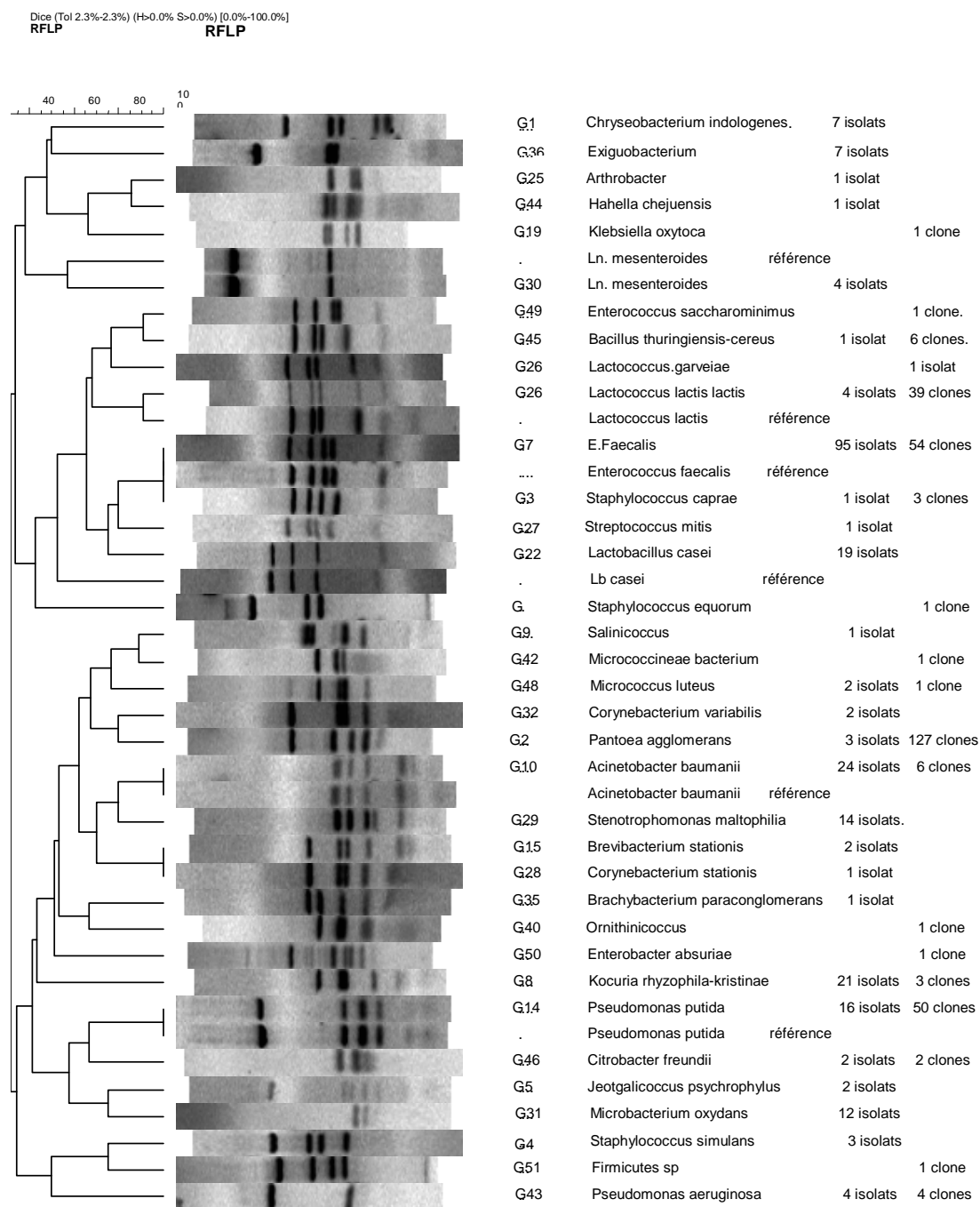
Les produits d'amplification V3 ont été analysés par SSCP sur séquenceur ABIPRISM 310 selon le protocole décrit par Duthoit et al, 2003.

Les régions V3 des ADNr 16S clonés et des ADNr 16S des isolats ont été amplifiées selon le même protocole et leur migration a été comparée aux profils SSCP des laits. Les pics ont été assignés à des clones ou des isolats. Ainsi, les pics des profils SSCP V3 des laits ont pu être assignés à des séquences de bactéries.

3. Amplification de la région variable V4 (levures)

Les ADN totaux de 49 laits (1 ou 2 par semaine de suivi) ont été analysés en SSCP. La région V4 de l'ADNr 18S a été amplifiée avec les amorces Lev1 et Lev2 (Callon et al, 2006). Le mélange réactionnel contenait : du Tampon Pfu 1X, 0,2mM de dNTP, 0,5µM de chaque amorce Lev1 (5'-AGT TGT TGC AGT TAA AAA G-3') et Lev2 (5'-CCT ATT AAT CAT TAC GA-3'), 0,5 unité de polymérase Pfu, 1µl d'ADN extrait des laits, et de l'eau de manière à parvenir à un volume total de 25µl. Après une étape de dénaturation d'une durée de 3 min à 95°C, 30 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 47°C, 1 min à 72°C, suivis d'une étape d'élongation de 10 min à 72°C ont été appliqués. La taille des produits d'amplification a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5%. La migration de la région V4 des ADNr des isolats a été comparée aux profils SSCP V4 des laits, et les pics ont été assignés à des isolats. Ainsi, les pics des profils SSCP V4 des laits ont pu être assignés à des séquences de levures.

Annexe 3.5 Diversité bactérienne des laits de chèvre : dendrogramme des profils RFLP des différentes espèces



Annexe 3.6. Affiliations phylogéniques des 281 isolats isolés de 2 laits (151 et 49): screening des ADNr 16S par méthode RFLP suivi du séquençage des ADNr 16S différents.

Groupes RFLP ¹	nombre d'isolats	Coélution Pic SSCP	Nbre Seq *	Accession	Séquence 16S la plus proche ⁴					
G6	28	25	5	EF627518 à EF627522	Gram + catalase + <i>Staphylococcus epidermidis</i>					
G8	21	3	10	EF611783 à EF611792	<i>Kocuria rhizophila -kristinae-carniphila</i>					
G31	12	21	3	EF611797 à EF611799	<i>Microbacterium oxydans</i>					
G36	7	21	5	EF588266 EF611800 à EF611803	<i>Exiguobacterium</i>					
G4	3	28	3	EF611804 à EF611806	<i>Staphylococcus simulans</i>					
G32	2	5	1	EF611796	<i>Corynebacterium variabilis</i>					
G15	2	5	1	EF611760	<i>Brevibacterium stationis</i>					
G35	2	1	1	EF588264	<i>Brachybacterium paraconglomerans</i>					
G9	2	23	1	EF588265	<i>Salinicoccus sp</i>					
G5	2	31	1	EF588263	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i>					
G48	2	2	2	EF621471- EF621472	<i>Micrococcus luteus</i>					
G28	1	5	1	EF611758	<i>Corynebacterium stationis</i>					
G3	1	23	1	EF633693	<i>Staphylococcus caprae</i>					
G25	1	1	1	EF611751	<i>Arthrobacter sp</i>					
G45	1	nd	1	EF627518 à EF627522	<i>Bacillus cereus- thuringiensis</i>					
Amplifications spécifiques d'espèce ³										
		pa	lnm	ddlE	Lhis	Lg				
G7	92	nd	nd	+	-	nd	23	8	EF621444 à EF621451	Gram + catalase - <i>Enterococcus faecalis</i>
G22	19	+	nd	nd	nd	nd	29	5	EF611813 à EF611817	<i>Lactobacillus casei</i>
G26	4	nd	nd	-	+	-	33	1	EF611761	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
G30	4	nd	+	nd	nd	nd	33	4	EF611809 à EF611812	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
G26	1	nd	nd	-	-	+	35	1	EF611807	<i>Lactococcus garvieae</i>
G27	1	nd	-	-	-	-	33	1	EF611808	<i>Streptococcus mitis</i>
Gram -										
G10	24	32	5	EF621423 à EF621427	<i>Acinetobacter baumannii</i>					
G14	16	28	1	EF621473	<i>Pseudomonas putida</i>					
G29	14	25	8	EF588267 EF621429 à EF621435	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					
G1	7	19	4	EF588268 EF611793 à EF611795	<i>Chryseobacterium indologenes</i>					
G43	4	31	1	EF621439	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
G2	3	18-14	1	EF588271	<i>Pantoea agglomerans</i>					
G33	2	25	1	EF588269	<i>Delftia acidovorans</i>					
G46	2	nd	1	EF621469	<i>Citrobacter freundii</i>					
TOTAL	281									

Nbre seq : nombre séquencés

¹ Les profils RFLP ont été analysés avec le logiciel BioNumerics par analyse UPGMA. Les isolats présentant un profil similaire ont été groupés et quelques représentant de chaque groupe ont été séquencés.

² La région V3 de l'ADNr 16S a été analysée par la méthode SSCP et les pics obtenus ont été comparés à ceux des profils V3 SSCP des laits.

Nd= non déterminé

⁴ Les espèces en gras sont communes aux isolats et aux clones.

Annexe 3.7. Affiliations phylogéniques des 340 OTUs des laits (banque d'ADNr 16S de 6 laits: screening des ADNr 16S par méthode RFLP suivi du séquençage de quelques représentant de chaque groupe).

Groupes RFLP ¹	Nombre De clones	Coelution ² Pics SSCP	Nombre séquencés	Assignation	Affiliation phylogénétique après séquençage ³
G45	8	24	4	EF611752 à EF611755	Gram+ catalase+ <i>Bacillus cereus- thuringiensis</i>
G6	6	25	3	EF621464 à EF621466	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
G3	4	23		EF611757	<i>Staphylococcus caprae</i>
G8	3	3	3	EF611780 à EF611782	<i>Kocuria rhizophila -kristinae-carniphila</i>
G9	1	25	1	EF621462	<i>Staphylococcus equorum</i>
G42	1	1	1	EF621461	<i>Micrococccineae bacterium</i>
G16	1	24	1	EF611756	<i>Macrococcus caseolyticus</i>
G15	1	5	1	EF611759	<i>Brevibacterium stationis</i>
G40	1	3	1	EF588270	<i>Ornithinococcus</i>
G19	1	4	1	EF588274	<i>Dietza maris</i>
G48	1	2	1	EF621470	<i>Micrococcus luteus</i>
G12	1	3	1	EF621467	<i>Rothia sp</i>
G13	1	nd	1	EF621463	<i>Clostridium</i>
G51	1	nd	1	EF621443	<i>Firmicutes sp</i>
<hr/>					
G7	54	23	9	EF621452 à EF621460	Gram + catalase - <i>Enterococcus faecalis</i>
G26	48	33	20	EF611762 à EF611779	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
G49	1	35	1	EF627486	<i>Enterococcus saccharominimus</i>
<hr/>					
G2	134	18- 14	10	EF611741 à EF611750	Gram- <i>Pantoea agglomerans</i>
G14	51	28	10	EF627478 à EF627485	<i>Pseudomonas putida</i>
G10	7	32	2	EF6588272- EF621428	<i>Acinetobacter baumannii</i>
G44	1	25	1	EF588273	<i>Hahella chejuinsis</i>
G43	5	31	3	EF621436 à EF621438	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
G19	3	20	2	EF613318- EF613319	<i>Klebsiella milletis- oxytoca</i>
G46	2	nd	1	EF621468	<i>Citrobacter freundii</i>
G	2	nd	2	EF621440- EF621441	<i>Pseudomonas fulgida</i>
G50	1	23	1	EF621442	<i>Enterobacter absuria</i>
TOTAL	340				

¹ Les profils RFLP ont été analysés avec le logiciel BioNumerics par analyse UPGMA. Les clones présentant un profil similaire ont été groupés et quelques représentant de chaque groupe ont été séquencés.

² La région V3 de l'ADNr 16S a été analysée par la méthode SSCP et les pics obtenus ont été comparés à ceux des profils V3 SSCP des laits.

³ Les espèces en gras sont communes aux isolats et aux clones.

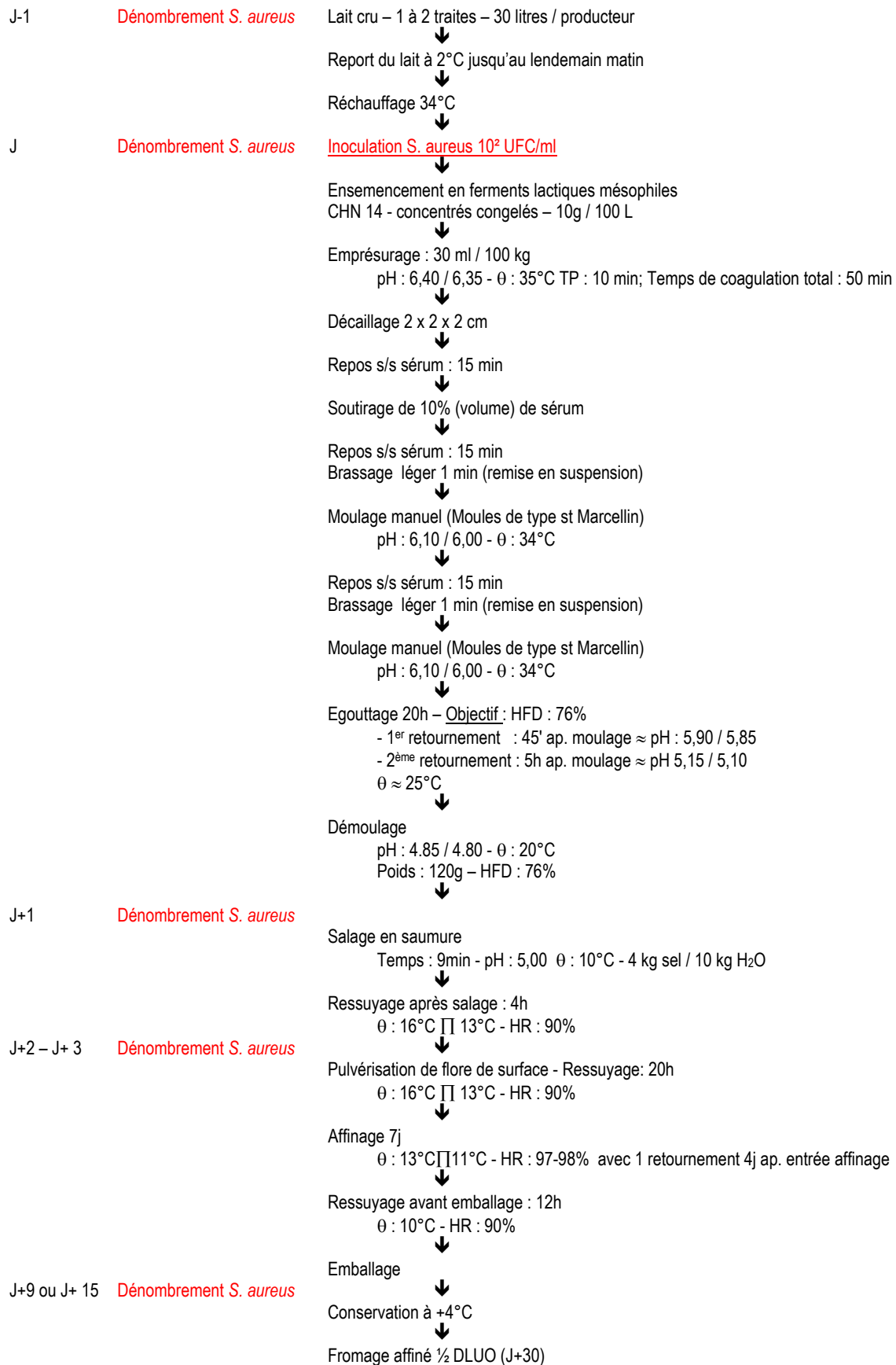
Annexe 3.8 Diversité des levures des laits de chèvre : identification des levures isolées de 6 laits différents (72, 81, 168, 181, 209 et 280): identification phénotypique et affiliation phylogénétique par séquençage ADNr 26S.

Nombre d' isolats	Identification phénotypique	Séquence d'ADNr 26S la plus proche	Coélution avec les pics SSCP V3 ² des laits
10	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	s
7	<i>Trichosporon beigelii</i>	<i>Trichosporon sp</i>	r
6	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	s
5	<i>Cryptococcus ater/Cr. magnus</i>	<i>Cryptococcus magnus</i>	m
5	<i>Cryptococcus curvatus</i>	<i>Cryptococcus curvatus</i>	m
4	<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>	f
4	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida intermedia</i>	b
2	<i>Candida pararugosa</i>	<i>Candida pararugosa</i>	t
1	<i>Candida inconspicua</i>	<i>Candida inconspicua</i>	c
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	k
Total 46			

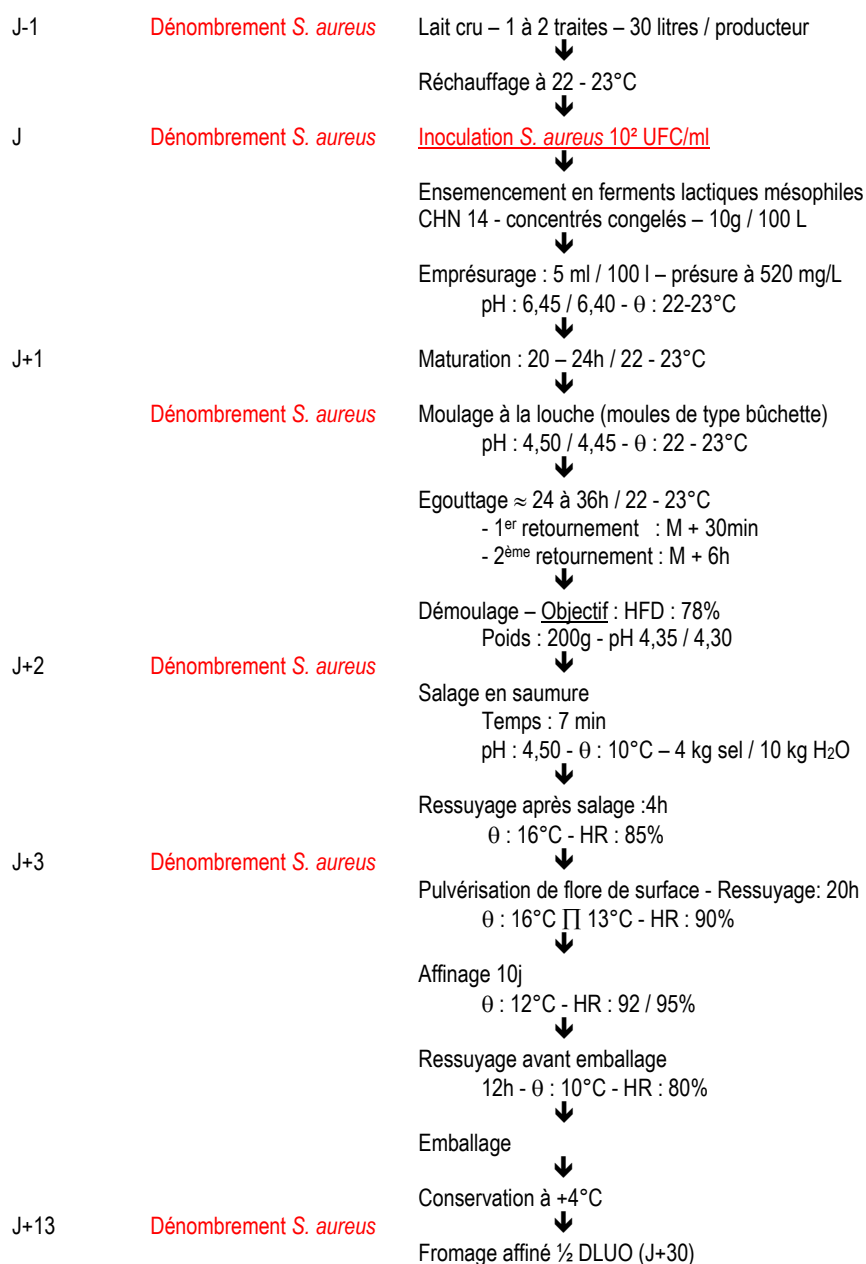
²La région V4 des ADNr 18S des isolats a été analysée par SSCP et les pics ont été comparés avec ceux des profils V4 SSCP des laits.

Annexe 4 : Recherche et robustesse des écosystèmes des laits de chèvre

Annexe 4.1: Schéma technologique de type présure (Pâte molle type caillé doux)

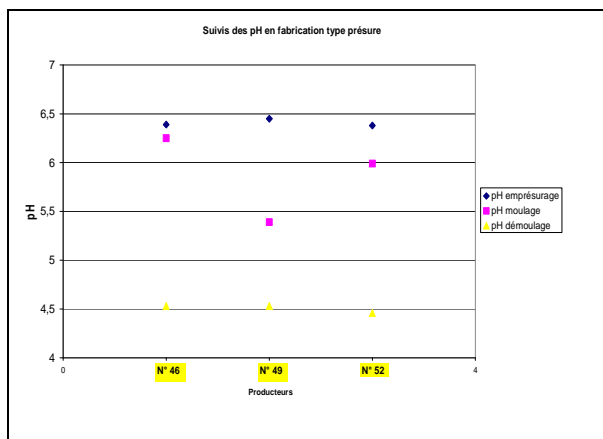


Annexe 4.2 : Schéma technologique de type lactique

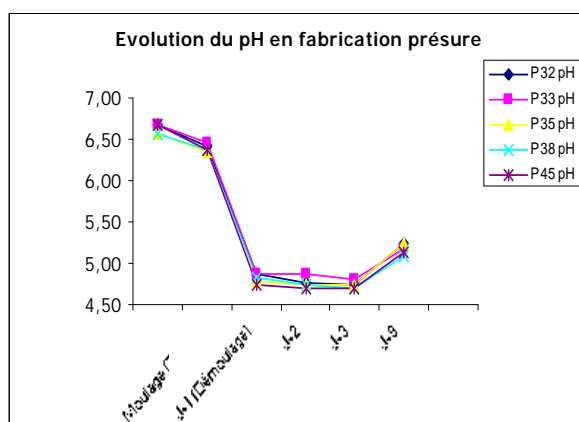


Annexe 4.3 : Historique des laits inhibiteurs (I) et non inhibiteurs (NI) en 2004

I		2003	2004	2005	Observation
9	Moy Géométrique	10	9	12	Idem malgré 1 accident
	Nb > 200	0	0	1	
	Nb > 500	0	0	1 (à 1500)	
15	Moy Géométrique	52	68	?	
	Nb > 200	0	0		
	Nb > 500	0	0		
17	Moy Géométrique	11	14	?	
	Nb > 200	0	0		
	Nb > 500	0	0		
20	Moy Géométrique	9	11	10	Idem
	Nb > 200	0	0	0	
	Nb > 500	0	0	0	
21	Moy Géométrique	16	30	82	Augmentation
	Nb > 200	1	0	3	
	Nb > 500	0	0	2 (max à 1600)	
35	Moy Géométrique	59	41	26	Diminution progressive
	Nb > 200	1	0	0	
	Nb > 500	1 (610)	0	0	
38	Moy Géométrique	20	19	16	Idem malgré 1 accident
	Nb > 200	0	0	1	
	Nb > 500	0	0	1 (1600)	
45	Moy Géométrique	9	10	181	Forte augmentation en 2005
	Nb > 200	0	0	6	
	Nb > 500	0	0	3 (max à 1600)	
49	Moy Géométrique	14	9	9	stable
	Nb > 200	0	0	0	
	Nb > 500	0	0	0	
52	Moy Géométrique	30	13	9	stable
	Nb > 200	0	0	0	
	Nb > 500	0	0	0	
53	Moy Géométrique	23	25	21	« accidents » survenus à l'automne
	Nb > 200	0	0	2	
	Nb > 500	0	0	2	
27	Moy Géométrique	58	82	119	Augmentation
	Nb > 200	0	3	5	
	Nb > 500	0	0	1 (à 1600)	
28	Moy Géométrique	56	64	78	Aussi mauvais
	Nb > 200	3	4	2	
	Nb > 500	0	0	1 (à 1600)	
32	Moy Géométrique	18	80	101	Aussi mauvais (que 3 valeurs en 2003)
	Nb > 200	0	2	3	
	Nb > 500	0	1 (630)	0	
33	Moy Géométrique	18	16	11	Stable
	Nb > 200	0	0	0	
	Nb > 500	0	0	0	
46	Moy Géométrique	27	9	11	Stable
	Nb > 200	0	0	0	
	Nb > 500	0	0	0	
48	Moy Géométrique	37	10	12	Stable voire amélioration
	Nb > 200	1	0	0	
	Nb > 500	0	0	0	

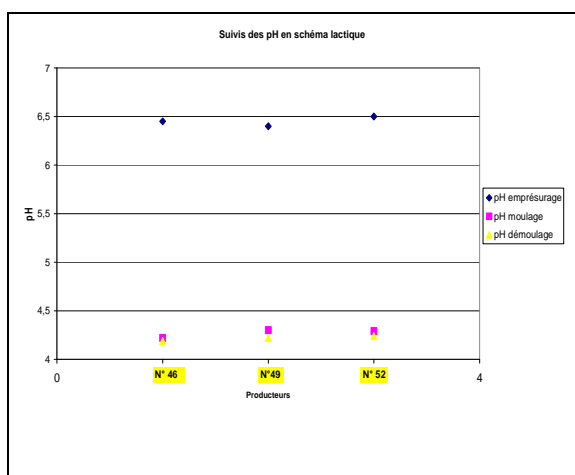


(a)

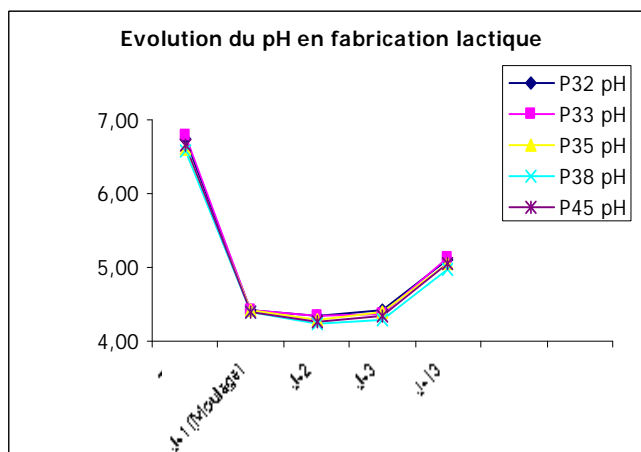


(b)

Annexe 4.4: Evolution du pH en transformation présure pour les laits testés à Carmejane (a) et l'ITPLC (b)

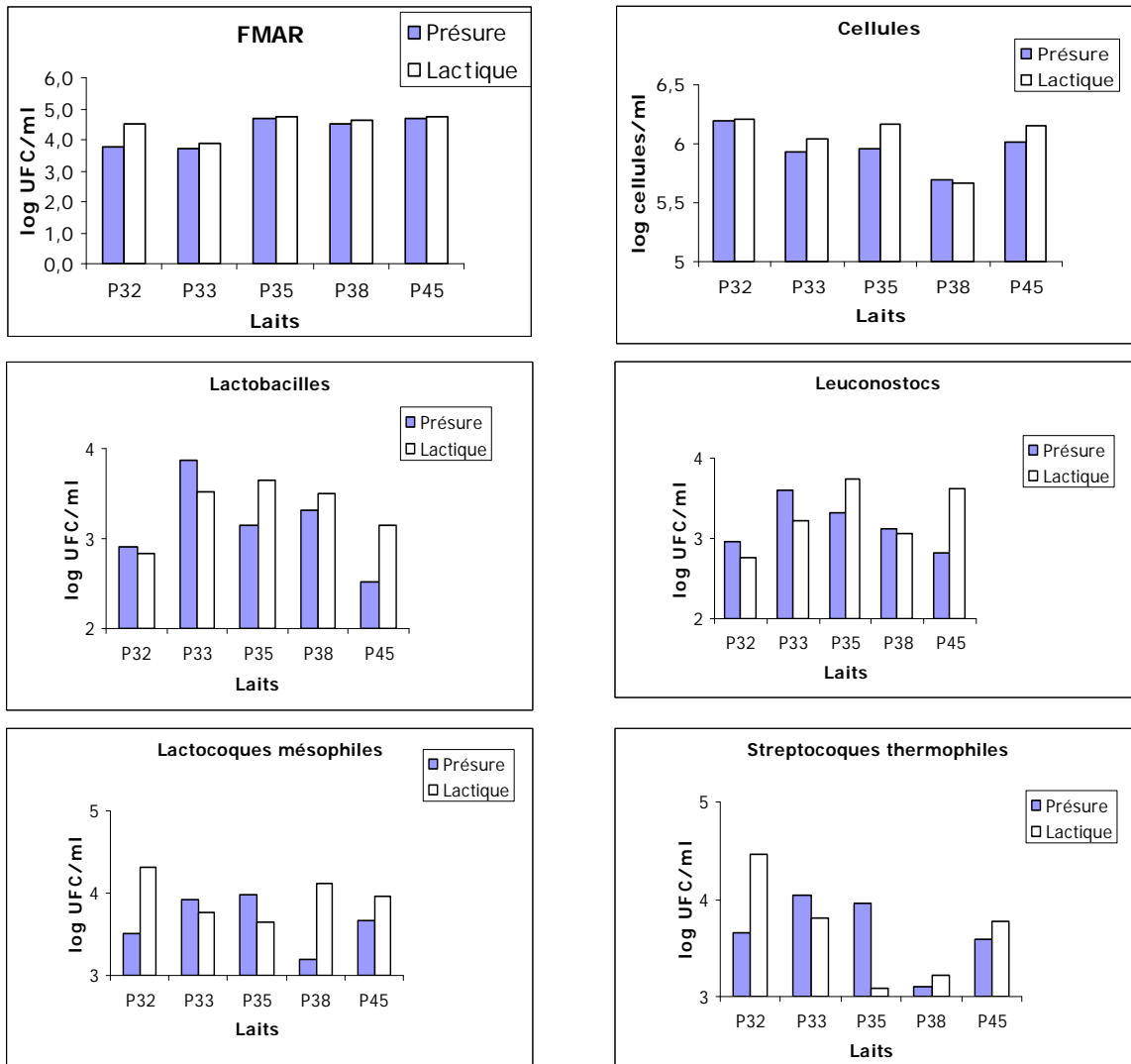


(a)

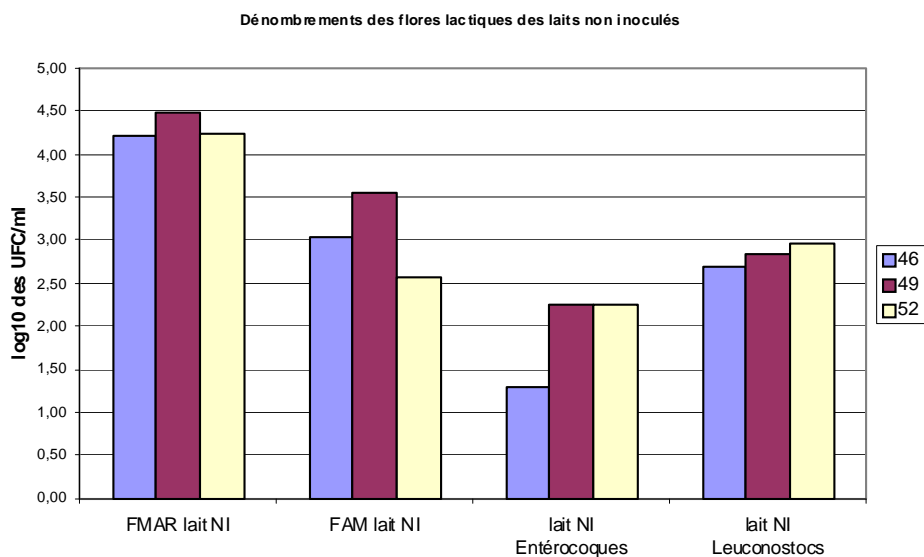


(b)

Annexe 4.5 : Evolution du pH en transformation lactique pour les laits testés à Carmejane (a) et l'ITPLC (b)



Annexe 4.6 : Composition microbiologique des laits mis en œuvre à l'ITPLC

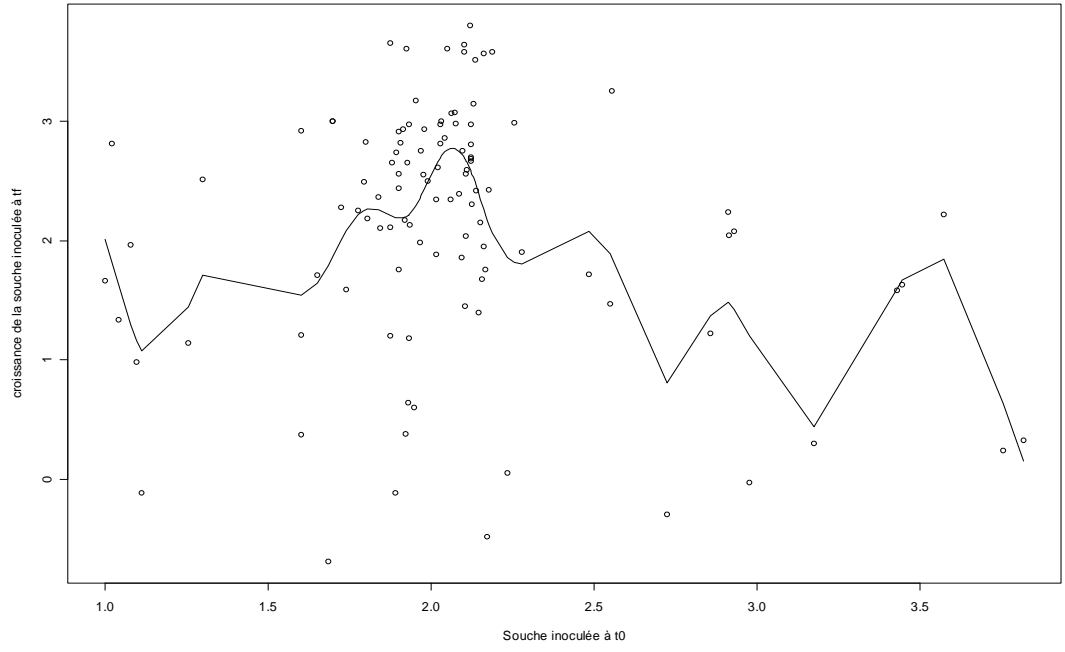


Annexe 4.7 : Composition microbiologique des laits mis en œuvre à Carmejane

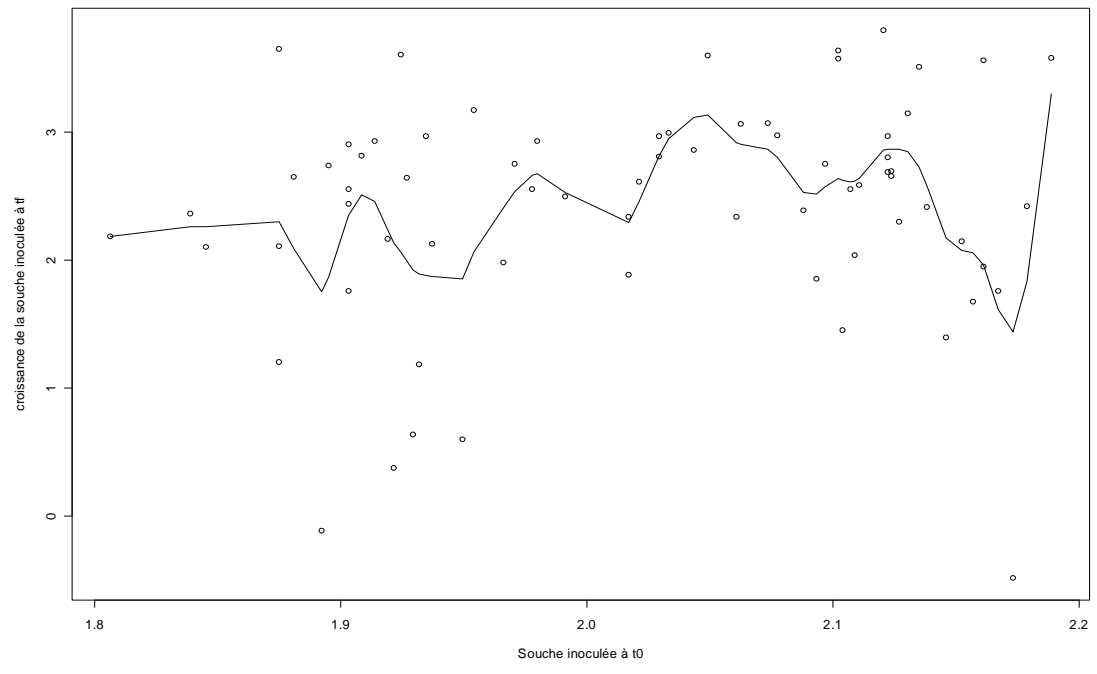
Annexe 4.8 : Composition biochimique des produits au cours des transformations fromagères

Fromages lactiques	ITPLC					Carmejane		
	32 NI	33 I	35 I	38 I	45 I	46 NI	49 I	52 I
Matière Grasse Fromage démoulé (g/100g)	18,5	16,5	18	14	14	19,5	10,3	14,3
Extrait Sec fromage démoulé (g/100g)	35,3	33,6	30,5	33,4	31,2	31,5	33,5	29,5
HFD Fromage démoulé (%)	79	81	85	77	80	84	73,5	81,5
Chlorures fromage démoulé salé (g/100g)	1,44	1,60	1,18	1,24	2	0,83	0,44	0,63
Fromage de type présure	32	33	35	38	45	46	49	52
Matière Grasse fromage démoulé (g/100g)	24	23	23,5	18	19,5	23,5	23,8	22
Extrait Sec fromage démoulé (g/100g)	45,4	49,3	43,3	40,1	41,9	49	44	45
HFD fromage démoulé (%)	72	66	74	73	72	66,5	73,5	70
Chlorures fromage démoulé salé (g/100g)	0,98	0,96	0,98	1,11	1,20	0,83	0,69	1

NI : non inhibiteur ; I : Inhibiteur



Annexe 4.9 : Dose inoculée à t_0 (\log_{10}) vs croissance de la souche inoculée à T_{final} ($\Delta\log_{10}$) avec ajustement d'une courbe non paramétrique



Annexe 4.10 : Dose inoculée à t_0 (\log_{10}) vs croissance de la souche inoculée à T_{final} ($\Delta\log_{10}$) avec ajustement d'une courbe non paramétrique (plage restreinte à 1,8-2,2 log pour l'inoculum)

Annexe 4.11 : Caractéristiques des laits caractérisés par l'INRA d'Aurillac

Comportement	Provenance	Exploitation	Année	Code Aurillac		
Inhibiteurs	ITPLC	9	2004	I7		
		15	2004	I12		
		17	2004	I20		
		20	2004	I21		
		21	2004	I11		
		33	2005	I4		
		35	2004	I1		
			2005	I9		
		38	2004	I2		
			2005	I5		
		41	2004	I13		
		45	2004	I22		
			2005	I17		
			Carnejane	47	2004	C1
				48	2004	C5
					2005	C7
				49	2004	C10
					2005	C11
				52	2004	C12
		2005		C3		
		53	2004	C9		
Non Inhibiteurs	ITPLC	9	2005	I10		
		15	2005	I27		
		17	2005	I18		
		20	2005	I28		
		21	2005	I6		
		22	2004	I25		
		27	2004	I8		
			2005	I29		
		28	2004	I14		
			2005	I19		
		30	2004	I24		
		32	2004	I23		
			2005	I30		
		33	2004	I3		
		42	2004	I15		
		43	2004	I16		
		44	2004	I26		
			Carnejane	46	2004	C2
					2005	C4
				53	2005	C8
	55	2004		C6		

Annexe 4.12 : Dénombrements (Log ufc/ml) des laits sur différents milieux de culture.

inhib/non inhib	2004 /2005	laits	M17L 42°C	M17L 30°C	T 30°C rouge	T 30°C rose	SB	PCAI	CRBM	OGA	FH
inhibiteur	2004	C1	3,36	3,42	3,46	3,05	0,31	2,55	3,94	3,08	1,60
inhibiteur	2004	c10	3,65	3,75	3,58	4,28	2,15	3,76	3,59	2,69	0,88
inhibiteur	2004	C12	3,65	3,88	2,88	2,63	2,01	3,63	3,87	3,04	2,47
inhibiteur	2004	C5	2,97	3,17	2,12	1,48	1,48	3,44	3,53	1,31	1,79
inhibiteur	2004	C9	3,54	3,60	3,50	2,51	3,46	2,97	3,16	2,12	1,98
Moy inhib 2004 Carmejjane			3,43	3,56	3,11	2,79	1,88	3,27	3,62	2,45	1,74
inhibiteur	2005	c11	3,26	3,54	2,89	3,04	2,37	2,05	3,27	2,39	0,74
inhibiteur	2005	C3	3,51	3,39	3,39	0,31	2,50	3,06	3,41	2,73	2,60
inhibiteur	2005	C7	2,97	3,05	2,62	1,71	2,53	2,76	3,06	2,01	1,10
Moy inhib 2005 Carmejjane			3,25	3,33	2,97	1,68	2,46	2,62	3,25	2,38	1,48
Moy inhib Carmejjane			3,34	3,45	3,04	2,24	2,17	2,95	3,43	2,41	1,61
non inhibiteur	2004	C2	3,30	3,65	3,20	1,71	1,48	2,68	3,76	1,31	2,27
non inhibiteur	2004	C6	2,79	3,25	2,26	0,31	2,53	3,25	3,17	1,79	1,04
Moy non inhib 2004 carmejjane			3,04	3,45	2,73	1,01	2,00	2,96	3,46	1,55	1,66
non inhibiteur	2005	C4	3,40	3,50	2,99	1,31	2,21	2,97	3,26	2,72	0,88
non inhibiteur	2005	C8	2,84	3,17	1,85	2,09	2,44	2,98	3,03	1,05	2,04
Moy non inhib 2005 Carmejjane			3,12	3,33	2,42	1,70	2,32	2,97	3,14	1,89	1,46
Moy non inhib Carmejjane			3,08	3,39	2,58	1,35	2,16	2,97	3,30	1,72	1,56
inhibiteur	2004	I1	3,46	3,59	3,44	2,33	1,31	3,12	3,47	2,61	2,29
inhibiteur	2004	I11	2,93	2,89	1,05	0,31	1,05	2,60	3,23	0,31	0,00
inhibiteur	2004	I12	2,48	3,33	1,91	1,48	0,31	2,66	3,61	2,05	1,75
inhibiteur	2004	I13	3,38	3,34	2,15	2,42	0,31	2,58	3,46	1,85	2,51
inhibiteur	2004	I20	3,44	3,44	1,85	1,91	0,31	2,99	3,44	2,01	1,97
inhibiteur	2004	I21	3,46	3,29	2,31	2,54	1,05	2,50	3,37	2,18	2,28
inhibiteur	2004	I22	3,63	3,90	2,42	1,48	1,05	2,05	3,74	2,63	1,86
inhibiteur	2004	I7	3,89	4,22	3,73	3,23	1,03	2,88	3,21	2,85	0,98
Moy inhib 2004 ITPLC			3,33	3,50	2,36	1,96	0,80	2,67	3,44	2,06	1,71
inhibiteur	2005	I17	3,28	4,70	2,86	3,04	2,09	2,05	3,58	3,39	1,45
inhibiteur	2005	I4	3,12	3,09	2,37	1,71	1,71	2,7	2,71	1,31	2,24
inhibiteur	2005	I5	3,37	3,62	3,46	2,59	3,11	3,98	3,72	3,6	2,37
Moy inhib 2005 ITPLC			3,26	3,80	2,90	2,45	2,30	2,91	3,34	2,77	2,02
Moy inhib ITPLC			3,30	3,65	2,63	2,20	1,55	2,79	3,39	2,41	1,86
non inhibiteur	2004	I14	3,73	3,80	3,06	0,31	2,65	3,55	3,80	2,31	2,28
non inhibiteur	2004	I15	3,08	3,44	2,29	1,85	2,54	3,62	3,52	1,31	1,69
non inhibiteur	2004	I16	3,48	3,55	3,31	3,14	3,30	2,56	3,82	2,71	INC
non inhibiteur	2004	I2	3,06	3,52	3,43	2,78	2,12	2,51	3,31	1,48	2,03
non inhibiteur	2004	I23	3,52	3,35	2,39	1,79	2,09	3,05	3,76	1,48	2,11
non inhibiteur	2004	I24	3,55	3,56	2,99	2,48	1,50	3,19	3,53	2,39	2,28
non inhibiteur	2004	I25	3,68	3,52	2,21	2,01	0,31	2,75	3,66	1,05	1,74
non inhibiteur	2004	I26	3,44	3,25	2,33	2,21	2,26	3,45	3,49	1,31	1,80
non inhibiteur	2004	I3	3,13	3,08	2,93	1,31	1,71	2,45	3,36	1,96	2,05
non inhibiteur	2004	I8	3,16	3,00	0,31	1,31	0,31	3,43	2,85	0,31	0,30
Moy non inhib 2004 ITPLC			3,38	3,41	2,52	1,92	1,88	3,06	3,51	1,63	1,81
non inhibiteur	2005	I10	3,63	4,35	3,97	2,94	2,56		3,60	4,31	2,54
non inhibiteur	2005	I18	2,91	4,59	5,05		2,05	5,02	3,39	3,97	2,10
non inhibiteur	2005	I19	3,48	3,24	2,55	2,77	2,09	3,09	3,73	2,67	2,38
non inhibiteur	2005	I27	3,18	4,66	2,80	2,55	2,92		3,16	3,17	2,42
non inhibiteur	2005	I28	3,98	5,02			1,33	4,34	3,38		2,63
non inhibiteur	2005	I29	3,42	3,37	2,51	1,71	1,71	2,93	3,42	2,35	1,53
non inhibiteur	2005	I30	3,39	3,45	2,33	2,45	1,96	2,47	3,47	2,33	2,26
non inhibiteur	2005	I6	3,43	3,71	3,14	3,26	2,05	4,1	3,15	3,65	1,08
non inhibiteur	2005	I9	3,48	3,76	2,54	3,19	1,05	3,49	3,53	2,74	1,02
Moy non inhib 2005 ITPLC			3,43	4,01	3,11	2,70	1,97	3,63	3,43	3,15	2,00
Moy non inhib ITPLC			3,41	3,71	2,82	2,31	1,92	3,34	3,47	2,39	1,90

Annexe 4.13 : Mise au point de la méthode de PCR en temps réel pour la quantification des lactocoques dans les produits laitiers : application à la quantification de *Lactococcus garvieae*

1. Mise au point des amorces et de la méthode

Les résultats de cette partie ont été obtenus pour les 3 couples d'amorces : *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus lactis cremoris* mais ne sont présentés que dans le cas de *Lactococcus garvieae*.

Amorces : les 3 couples d'amorces ont montré une bonne spécificité vis-à-vis des 3 espèces ciblées. Aucune amplification des ADN des autres espèces de bactéries lactiques n'a été observée.

Courbes standards : la courbe standard obtenue par l'analyse en PCR quantitative des dilutions de l'ADN extrait d'une culture pure de *Lactococcus garvieae* est présentée Figure 1.

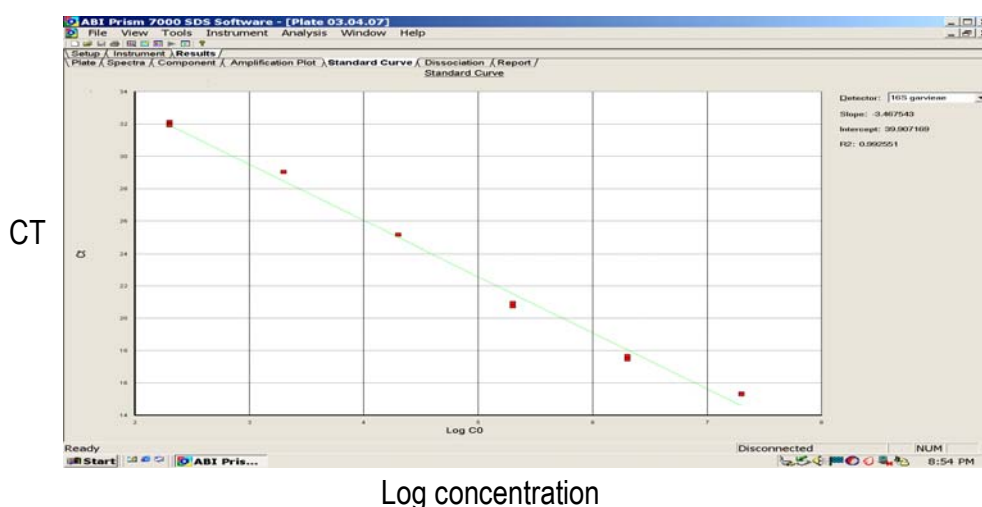


Figure 1 : Courbe standard obtenue par l'analyse d'une série de dilutions au 1/10^{ème} d'un ADN standard extrait d'une culture pure de concentration connue en *Lc. garvieae*. Les ADN ont été dilués 10 fois pour l'analyse.

Les résultats montrent une bonne linéarité entre le Ct (cycle seuil : nombre de cycles de PCR à partir duquel la valeur de l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond) et le nombre de cellules (Log C) dans l'échantillon d'ADN. Les résultats étaient reproductibles entre les deux répétitions effectuées pour chaque dilution d'ADN.

La courbe étalon indique une bonne linéarité pour une concentration des ADN entre 10² et 10⁷ ufc/ml. Du fait que les ADN aient été dilués 10 fois pour l'analyse en PCR quantitative, un seuil de détection de 10³ ufc/ml dans le lait peut être défini.

La spécificité des amorces a été confirmée par l'analyse des amplicons en fin de PCR par chauffage à 60°C (température de fusion) puis refroidissement et mesure de la fluorescence qui permet la mise en évidence d'amplification non spécifique. Un seul pic de dissociation (Figure 2) a été obtenu pour tous les échantillons d'ADN analysés, traduisant la présence d'un seul type d'amplicon.

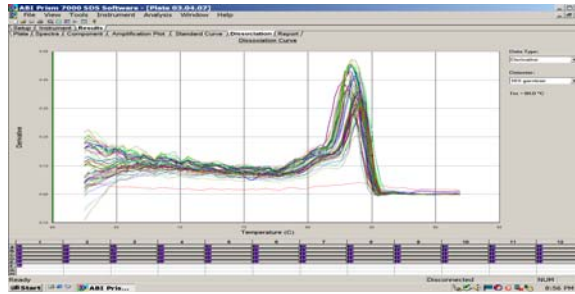


Figure 2 : courbe de dissociation obtenue par chauffage à 60°C en fin de PCR des dilutions d'ADN de *Lc. garvieae*.

Les courbes standard et les courbes de dissociations obtenues pour l'analyse en PCR quantitative des ADN extraits de cultures de *Lactococcus lactis lactis* et *Lactococcus lactis cremoris* ont montré la même efficacité et spécificité et les mêmes seuils de détection (10^3 ufc/ml) que celles obtenues avec les ADN de *Lactococcus garvieae*.

2. Quantification de *Lactococcus garvieae*

2.1 Quantification de laitsensemencés

Les résultats de quantification par PCR quantitative des ADN extraits de laits microfiltrésensemencés à différentes concentrations de *Lc. garvieae* sont représentés dans la figure 3.

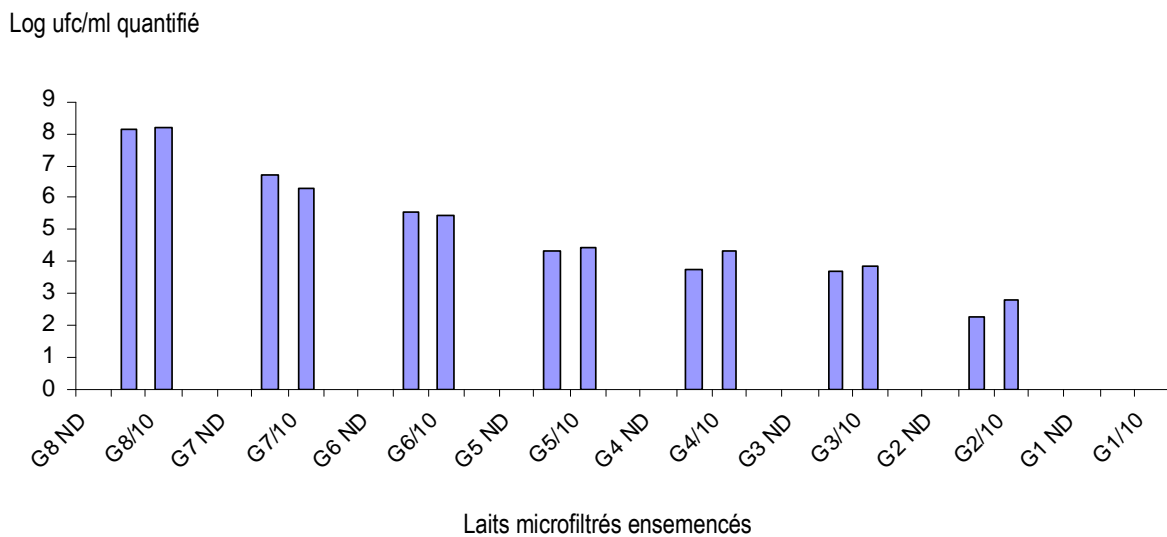


Figure 3 : Log ufc/ml quantifié par PCR quantitative dans les ADN extraits de laits microfiltrésensemencés en différentes concentrations de *Lc. garvieae* : G8= laitensemencé à 10^8 ufc/ml G1= laitensemencé à 10^1 ufc/ml ; ND : analyse des ADN non dilués ; G/10 : analyse des ADN dilués au 1/10ème

Une bonne corrélation entre les quantités théoriques de *Lc. garvieae* dans les laits microfiltrésensemencés et les quantités quantifiées par PCR quantitative a été observée pour les ADN dilués au 1/10ème et pour des concentrations comprises entre 10^2 à 10^8 ufc/ml. Ces résultats confirment le seuil de détection de 10^3 ufc/ml dans des échantillons de lait.

2.2 Quantification de *Lactococcus garvieae* en mélange

Les résultats de quantification de l'ADN de *Lactococcus garvieae* seul ou en mélange avec des ADN d'autres espèces (Figure 4) montrent une amplification de l'ADNr 16S de *Lactococcus garvieae* similaire quels que soient les équilibres avec les ADNr 16S des autres espèces en mélange. Ces résultats confirment l'efficacité de la méthode pour détecter spécifiquement et quantitativement l'ADN de *Lactococcus garvieae* en présence de fortes quantités d'ADN d'autres espèces.

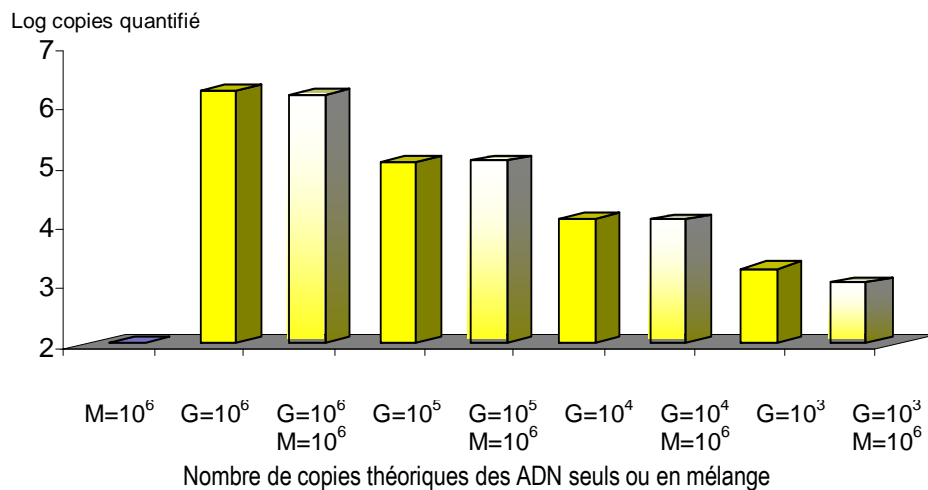


Figure 4: Quantification par PCR quantitative de l'ADNr 16S de *Lactococcus garvieae* seul ou en mélange avec des quantités variables d'ADNr 16S d'autres espèces.

M = mélange d'ADNr 16S de 7 espèces différentes (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus aureus*, *Arthrobacter nicotianae*, *Enterobacter amnigenus*, *Chryseobacterium* sp.)

G = ADNr 16S de *Lactococcus garvieae* seul

Annexe 4.14 : Résultats de quantification (ufc/ml) de *Lactococcus garvieae* et *Lactococcus lactis* Lactis dans les gels inhibiteurs et non inhibiteurs de *Staphylococcus aureus* (2 répétitions) et dénombrements des lactocoques (ufc/ml) sur milieu de Turner de ces mêmes gels.

Provenance	Exploitation	gels inhibiteurs	Quantification <i>Lc garvieae</i>		Quantification <i>Lc lactis lactis</i>		Dénombrements sur milieu de Turner
			Répétition1	Répétition 2	Répétition 1	Répétition 2	
ITPLC	9	I7	nd	nd	5,0.10 ⁸	6,0.10 ⁸	1,2.10 ⁸
	15	I12	nd	nd	1,0.10 ⁶	2,6.10 ⁶	
	17	I20	nd	nd	3,2.10 ⁷	1,9.10 ⁷	9,0.10 ⁶
	20	I21	1,7. 10 ⁴	1,1. 10 ⁴	2,3.10 ⁹	1,6.10 ⁹	
	21	I11	nd	nd	nd	nd	
	33	I4	nd	nd	4,82.10 ⁹	4,5.10 ⁹	
	35 (2004)	I1	nd	nd	nd	nd	
	35 (2005)	I9	nd	nd	nd	nd	
	38 (2004)	I2	nd	nd	nd	nd	
	38 (2005)	I5	nd	nd	2,7.10 ⁵	4,1.10 ⁵	
	41	I13	nd	nd	4,4.10 ⁷	6,5.10 ⁷	1,2.10 ⁷
	45 (2004)	I22	nd	nd	7,5.10 ⁶	3,1.10 ⁵	3,0.10 ⁵
	45 (2005)	I17	nd	nd	2,0.10 ⁹	1,9.10 ⁹	
	Carnejane	47	C1	nd	nd	2,3.10 ⁷	1,6.10 ⁷
48 (2004)		C5	nd	nd	3,5.10 ⁷	8,5.10 ⁶	
48 (2005)		C7	1,3. 10 ³	nd	5,0.10 ⁹	3,9.10 ⁹	
49 (2004)		C10	nd	nd	5,9.10 ⁵	8,1.10 ⁵	
49 (2005)		C11	nd	nd	nd	nd	
52 (2004)		C12	1,6. 10 ⁵	1,8. 10 ⁵	1,9.10 ⁸	4,3.10 ⁸	
52 (2005)		C9	nd	nd	nd	nd	
53		C3	1,1.10 ⁴	nd	5.10 ⁸	2,6.10 ⁸	
gels non inhibiteurs							
ITPLC	9	I10	nd	nd	nd	nd	
	15	I27	nd	nd	8,2.10 ⁷	5,5.10 ⁷	
	17	I18	nd	nd	2,6.10 ⁹	1,4.10 ⁹	
	21	I6	nd	nd	nd	nd	
	22	I25	nd	nd	6,5.10 ⁸	8,0.10 ⁸	1,7.10 ⁸
	27 (2004)	I8	nd	nd	5,8.10 ⁷	nd	
	27 (2005)	I29	nd	nd	8,0.10 ⁹	1,5.10 ⁹	
	28 (2004)	I14	nd	nd	2,3.10 ⁹	4,0.10 ⁹	1,0.10 ⁹
	28 (2005)	I19	nd	nd	4,5.10 ⁸	6,9.10 ⁸	
	30	I24	nd	nd	4,4.10 ⁶	3,1.10 ⁵	
	32 (2004)	I23	nd	nd	9,4.10 ⁵	1,6.10 ⁶	1,0.10 ⁶
	32 (2005)	I30	nd	nd	4,8.10 ⁷	2,5.10 ⁷	
	33	I3	nd	nd	1,1.10 ⁵	nd	
	43	I16	nd	nd	nd	nd	
44	I26	nd	nd	nd	nd		
Carnejane	46 (2004)	C2	nd	nd	4,1.10 ⁶	8,9.10 ⁶	
	46 (2005)	C4	nd	nd	4,5.10 ⁵	5,6.10 ⁵	
	53	C8	nd	nd	2,3.10 ⁵	nd	

nd= non détecté

Septembre 2008

Compte rendu n° 150838016

Département Techniques d'Élevage et Qualité

Service Bien-être animal, Santé, Hygiène et Traçabilité

R. de Cremoux

Caractérisation et entérotoxigénicité des souches de *S. aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation - Rapport final

La maîtrise de la contamination des produits laitiers par *Staphylococcus aureus*, agent pathogène incriminé dans les toxi-infections alimentaires, responsable de défauts de conformité des fromages, constitue encore aujourd'hui un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble des filières au lait cru. Une étude a été conduite afin de répondre aux préoccupations de la filière caprine dans ce domaine. Le projet visait à objectiver les risques de contamination par *S. aureus* du lait et des fromages, identifier les principales sources de contamination, et caractériser le potentiel entérotoxigène des souches de *S. aureus* isolées. Il s'agissait en outre d'explorer de nouveaux outils de maîtrise susceptibles d'être employés au niveau de la production (amélioration du dépistage des animaux excréteurs par le développement d'un ELISA spécifique) ou de la transformation (identification d'écosystèmes microbiens inhibiteurs de la croissance de *S. aureus*).

Le travail réalisé ouvre de nombreuses perspectives en matière de maîtrise de la contamination par *S. aureus*. À l'échelle de l'élevage, le repérage des animaux excréteurs peut être optimisé en recourant à l'ELISA. Les différentes stratégies d'utilisation envisagées demandent néanmoins une validation préalable à grande échelle. De façon complémentaire, l'identification des sources de contamination pourrait permettre à terme la construction d'une démarche diagnostique visant à définir, selon les exploitations, les axes prioritaires de maîtrise des niveaux de contamination du lait ou des produits (hygiène mammaire, entretien du matériel de traite,...).

À l'échelle de la transformation, la présence de laits inhibiteurs a été mise en évidence. Cependant la variabilité de l'expression de leur potentiel et la difficulté à définir les facteurs de variation impliqués rendent nécessaires la poursuite de travaux de recherche pour identifier les flores ou composants à activité antimicrobienne et mieux appréhender les mécanismes présidant à l'inhibition.

collection résultats



ITPLC - ACTILAIT Pôle Caprin
Route de La Rochelle - BP 49
17700 SURGERES



INRA - Rue de Versailles - BP 20089 - 39801 POLIGNY cedex 1
INRA - 37380 NOUZILLY
INRA - 20 Côte Reyne - 15000 AURILLAC



Centre Fromager de Carmejane
Membre d'ACTILAIT
04510 LE CHAFAUT ST JURSON



Station Expérimentale Caprine
Domaine du Pradel
07170 MIRABEL



Touraine Avenir Lait
38 rue Augustin Fresnel - BP 139
37171 CHAMBRAY LES TOURS CEDEX



Institut de l'Élevage
149, rue de Bercy
75595 Paris CEDEX 12
www.inst-elevage.asso.fr

ISSN : 1773-4738

