



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI DE CONSTANTINE
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**

12/DS/2015
02/vet/2015

**THESE PRESENTEE EN VUE
DE L'OBTENTION DU DOCTORAT EN SCIENCES
Option : Hygiène des denrées alimentaires d'origines animales**

**DETECTION ET QUANTIFICATION DES RESIDUS DE TERRAMYCINE
ET DE PENICILLINE DANS LE LAIT DE VACHE
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)
- OPTIMISATION DES PARAMETRES D'ANALYSE – ADAPTATION DES METHODES
D'EXTRACTION DES MOLECULES D'ANTIBIOTIQUES- COMPARAISON DE
QUELQUES RESULTATS OBTENUS SUR LE LAIT DE LA REGION DE CONSTANTINE
ET LE LAIT IMPORTE (RECONSTITUE)**

Présentée par

BOULTIF Latifa

Membres du jury :

EL GROUD Rachid	Président	M . C. A	Univ. Des frères Mentouri Const
HAMDI TAHA Moussadak	Examineur	Professeur	ENSV Alger
BENLATRECHE Cherifa	Examineur	Professeur	Univ. Constantine 3
TLIDJANE Abdelmadjid	Examineur	Professeur	Univ. Batna
MEKROUD Abdeslam	Dir. de thèse	Professeur	Univ. Des frères Mentouri Const

Année universitaire 2014-2015

Remerciements

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma reconnaissance et ma gratitude au directeur de cette thèse Pr Mekroud Abdessalem pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au Dr EL GROUD. R pour avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur HAMDI TAHA. M qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur TLIDJANE. A qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Je lui adresse mes sentiments les plus respectueux.

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur BENLATRECHE. C qui a accepté de juger ce travail en tant qu'examineur. Que vous soyez assuré de mon entière reconnaissance.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers tous les membres de notre laboratoire *PADESCA* et particulièrement les membres de mon équipe, à commencer par mon collègue et ami Mr Chebira Bassem, à Mm Chouder et à Mr Agabou qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Je tiens à remercier le service technique des laiteries « SARL NUMEDIA-groupe GIPLAIT » et « SAFILAIT » pour leurs collaborations. Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance et mes profonds respects.

Un très grand merci tout particulier à Dr Mabrak. S « chercheur permanent au centre de recherche de biotechnologie-Constantine » pour son aide, son sérieux, son amabilité et ses précieux conseils apportés sur l'ELISA, avec mes meilleurs souhaits pour la suite de sa carrière.

Je voudrai adresser ma reconnaissance à Dr Djenna « inspecteur vétérinaires à la direction des services agricoles de Constantine », pour sa

contribution précieuse lors de la récolte des échantillons, pour ses qualités humaines et ses encouragements illimités.

Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi à tout le cadre professoral et administratif de l'ISV Constantine.

À tous ces intervenants, je vous présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

Dédicaces

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie cette thèse :

À mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi, « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fier ».

À mon mari pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.

À ma petite chérie adorée Alaa, que dieu te garde pour moi.

À tous les membres de ma famille et belle famille sans aucune exception.

Boultif Latifa

Dédicace spécial

C'est avec une immense gratitude et reconnaissance que je dédie ce travail à mon ex-encadreur et directeur de thèse le défunt Pr EL HADJ EL OKKI Saadoune, qui nous a quitté très tôt. Il a toujours cru en nous, nous a encouragé, et considéré comme une relève dont il a toujours été fier, si ce travail a aboutit aujourd'hui c'est pour une unique raison : Vous rendre hommage à travers cette thèse.

Boultif Latifa

SOMMAIRE

Introduction	01
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Pathologies dominantes et antibiothérapies	04
1. Rappels sur les antibiotiques	04
1.2. Définitions	04
1.3. Les pénicillines	04
1.3.1. Mode d'action	04
1.3.2. Pharmacocinétique des β -lactamines	05
1.4. Les tétracyclines	06
1.4.1. Composition et mode d'action	06
1.4.2. Pharmacocinétique des tétracyclines	06
2. Pathologies dominantes en élevage bovin	07
2.1. Pathologie de la mamelle	07
2.1.1. Rappels anatomophysiologique sur la mamelle et la sécrétion lactée	07
2.1.2. Pharmacocinétique des antibiotiques dans la mamelle	08
2.1.2.1. Facteurs de variation de l'excrétion des antibiotiques dans le lait	08
2.1.2.1.1. Principe actif	08
2.1.2.1.2. Rôle de l'excipient	08
2.1.2.1.3. Effet de la dose	09
2.1.2.1.4. Voie d'administration	09
2.1.2.1.5. Durée de traitement	09
2.1.2.1.6. Facteurs liés à l'animal	09
2.1.3. Les mammites	10
2.1.3.1. Définitions	10
2.1.3.1.1. Les mammites cliniques	10
2.1.3.1.2. Les mammites subcliniques	10
2.1.3.2. Importances des mammites	11
2.1.3.2.1. Importance médicale	11
2.1.3.2.2. Importance sanitaire	11
2.1.3.2.3. Importance économique	11
2.1.3.3. Etiologies	11
2.1.3.4. Diagnostic	12
2.1.3.5. Traitements des mammites	12
2.1.3.5.1. Traitement antibiotiques	12
2.1.3.5.2. La corticothérapie et la vaccinothérapie	13
2.2. Les affections respiratoires	14
2.2.1. Etiologies des affections respiratoires	14
2.2.2. Les broncho-pneumonies infectieuses enzootiques (BPIE)	14
2.2.2.1. Traitement des broncho-pneumonies infectieuses enzootiques	15
2.2.3. Les affections dues au virus respiratoire syncytial	15
2.2.3.1. Traitement des affections dues au virus respiratoire syncytial	15
2.2.4. Les pasteurelloses primaires et les mycoplasmes	15
2.2.4.1. Traitement des pasteurelloses et des mycoplasmes	16
Chapitre II : lait et modalités de contamination par les résidus d'antibiotiques	17
1. Le lait	17
1.1. Définition	17
1.2. Composition et caractéristiques physicochimiques du lait	17

1.3. Valeurs nutritives du lait	18
1.3.1. Apports en protéines	18
1.3.2. Apports en lipides	18
1.3.3. Apports en glucides	18
1.3.4. Apports en minéraux et oligo-éléments	19
1.3.5. Apports en vitamines	19
1.3.6. Autres valeurs nutritives	19
1.4. Importance de la consommation du lait	19
1.4.1. Dans le monde	19
1.4.2. En Algérie	21
1.5. Filière lait en Algérie	21
1.6. La poudre de lait	22
1.6.1. Qualité de la poudre de lait	22
1.6.2. Méthodes de préparation de la poudre de lait	23
1.6.2.1. Traitements thermiques et évaporation	23
1.6.2.2. Séchage	23
1.6.2.2.1. Séchage sur cylindres	23
1.6.2.2.2. Séchage par atomisation	24
1.6.2.3. Emballages et stockage	24
1.6.3. Le lait reconstitué et le lait recombinaison	24
1.6.3.1. Définitions	24
1.6.3.2. Méthodes de reconstitution et de recombinaison	25
2. Les causes de contamination du lait par les résidus d'antibiotiques	26
2.1. Les erreurs commises par l'éleveur	26
2.2. La mauvaise utilisation du médicament	26
2.3. Le non respect du délai d'attente	26
2.4. La contamination par le matériel de traite	26
2.5. L'absence d'identification des animaux	26
2.6. La mauvaise hygiène lors de la traite	26
2.7. L'adjonction volontaire d'antibiotiques dans le lait	27
3. Les mesures destinées à prévenir la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait	27
3.1. L'identification des animaux traités	27
3.2. Le respect des mesures hygiéniques au cours de la traite	27
3.3. Le respect du délai d'attente	27
3.4. Le respect de la réglementation et des exigences de l'AMM	27
3.5. Limiter la surmédication des élevages et favoriser les actions sanitaires et hygiéniques	28
4. Mesures destinées à éliminer les résidus d'antibiotiques dans le lait	28
4.1. Le traitement thermique	28
4.2. Le traitement enzymatique	28
4.3. L'utilisation de bactéries sélectionnées pour leur antibiorésistance	28
Chapitre III : Les résidus d'antibiotiques « notions & risques »	29
1. Les résidus d'antibiotiques	29
1.1. Origine des résidus d'antibiotiques	29
1.2. Définition des résidus	30
1.3. Évaluation de la toxicité des résidus	30
1.3.1. Méthode d'évaluation de la dose sans effet d'un principe actif	30
1.3.2. Dose sans effet et « toxicité de relais »	30

1.3.3. La dose journalière acceptable (DJA)	30
2. La limite maximale des résidus (LMR)	31
2.1. Définition	31
2.2. Réglementation	31
2.2.1. La législation européenne	31
2.2.2. La législation algérienne	32
3. Le délai d'attente	32
3.1. Définition	32
3.2. Méthodes de calcul du temps d'attente dans le lait	33
3.2.1. Les méthodes simples de calcul	33
3.2.2. Les méthodes européennes de calcul	33
3.3. Expression du délai d'attente	33
4. Les problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait	34
4.1. Les problèmes sanitaires	34
4.1.1. Problèmes d'allergie	34
4.1.2. Problèmes toxiques	35
4.1.2.1. Toxicité directe	35
4.1.2.2. Risques cancérigènes	35
4.1.2.3. Risques bactériologiques	35
4.1.2.3.1. Modifications de la flore digestive du consommateur	36
4.1.2.3.2. Risques d'antibiorésistances	36
4.2. Les problèmes technologiques	37
Chapitre IV : Méthodes de recherche et de confirmation des résidus	39
d'antibiotiques dans le lait	
1. Historique et évolution des méthodes de détection	39
2. Les tests de dépistage	39
2.1. Le Delvotest	39
3. Les méthodes de confirmation	41
3.1. Méthode immuno-enzymatique « ELISA »	41
3.1.1. Historique	41
3.1.2. Principe de la méthode	41
3.1.3. Les variantes de la technique ELISA	41
3.1.3.1. Protocole général de la méthode ELISA type sandwich	42
3.1.3.2. Protocole général de la méthode ELISA compétitive	42
3.1.4. Calculs des résultats	43
3.1.4.1. Tests semi-quantitatifs	43
3.1.4.2. Tests quantitatifs	44
3.2. Méthodes physico-chimiques	44
3.2.1. Les méthodes chromatographiques « La chromatographie liquide haute performance (HPLC) »	44
3.2.1.1. Principe	45
3.2.1.2. Instrumentation	45
3.2.1.2.1. Réservoirs des solvants	46
3.2.1.2.2. Pompes	46
3.2.1.2.3. Injecteur ou vanne d'injection	47
3.2.1.2.4. Colonne	47
3.2.1.2.5. Détecteurs	48
3.2.1.3. Analyses des chromatogrammes	48
3.2.1.3.1. Analyse qualitative	49

3.2.1.3.2. Analyse quantitative	49
3.2.1.4. Les avantages de la chromatographie liquide haute performance	50
3.2.1.5. Domaines d'application de la chromatographie liquide haute performance	50

Partie expérimentale

Buts et objectifs de l'étude	51
1. Site d'étude	51
2. Méthode d'échantillonnage	52
2.1. Lait de vache	52
2.2. Poudre de lait	53
3. Caractéristiques des antibiotiques à rechercher	54
3.1. Choix des antibiotiques	54
3.2. Stabilité des antibiotiques	55
Chapitre I : Enquêtes prospectives sur la pratique rurale et les industries laitières dans la région de Constantine	56
1. Enquête auprès des vétérinaires praticiens	56
1.1. Description du questionnaire	56
1.2. Résultats et discussion	57
1.2.1. Pathologies rencontrées et types de traitements	57
1.2.2. Critère de choix des antibiothérapies	58
1.2.3. Traitements antibiotiques	59
1.2.3.1. Traitement des mammites	59
1.2.3.2. Traitement des pathologies respiratoires	60
1.2.4. Respect du délai d'attente par les éleveurs	61
1.2.5. Antibiorésistances	62
2. Enquête au près des laiteries siégeant dans la région de Constantine	62
2.1. Description du questionnaire	63
2.2. Résultats et discussion	63
2.2.1. Types de production	63
2.2.2. Capacités de production (quantités)	63
2.2.3. Approvisionnement en matière première (poudre et lait de vache)	64
2.2.4. Les problèmes rencontrés en production	64
3. Conclusion	65
Chapitre II : Analyse qualitative des résidus d'antibiotique par test d'inhibition microbiologique « Delvotest® »	66
1. Matériel et méthode	66
1.1. Matériel utilisé :	66
1.1.1. Le kit Delvotest®	66
1.1.2. Incubateur Delvotest®	66
1.1.3. Echantillonnage	66
1.2. Méthode	66
1.2.1. Protocole d'analyse	66
1.2.2. Lecture et expression des résultats	67
2. Résultats et discussion	67
2.1. Expression des résultats	67
2.1.1. Lait de vache	67
2.1.2. Lait en poudre	69
2.1.3. Comparaison des résultats entre le lait de vache et le lait en poudre	69
2.2. Discussion	70

3. Conclusion	73
Chapitre III : Analyse immuno-enzymatique des résidus d'antibiotique par méthode « ELISA »	74
1. Matériel et méthode	74
1.1. Matériel utilisé	74
1.1.1. Le kit ELISA pour tétracycline	74
1.1.2. Echantillons	74
1.2. Méthode	74
1.2.1. Principe du test	74
1.2.2. Etapes de l'analyse	75
1.2.2.1. Préparation des standards et solutions	75
1.2.2.2. Préparation des échantillons	76
1.2.2.2.1. Lait de vache	76
1.2.2.2.2. Lait en poudre	76
1.2.2.3. Mode opératoire	76
1.2.2.4. Lecture et expression des résultats	77
2. Résultats et discussion	78
3. Conclusion	81
Chapitre IV : Analyse quantitative des résidus pénicilline G et d'oxytétracycline par HPLC	82
1. Matériel et méthodes	82
1.1. Matériel utilisé	82
1.1.1. Description de l'HPLC de l'étude	82
1.1.2. Autres matériel	82
1.1.3. Produits chimiques	83
1.1.3.1. Standards d'antibiotiques	83
1.1.3.2. Autres produits chimiques	83
1.1.4. Échantillonnage	83
1.2. Méthodes	84
1.2.1. Optimisation des paramètres d'analyse	84
1.2.2. Examens de fiabilité de la méthode	84
1.2.2.1. La répétabilité	84
1.2.2.2. La reproductibilité	85
1.2.2.3. La linéarité de la courbe d'étalonnage	85
1.2.3. Méthode d'extraction des antibiotiques dans le lait	85
1.2.4. Essai d'étude de la cinétique des antibiotiques après injection par voie parentérale	86
1.2.5. Analyse des échantillons de lait de vache commercialisés à Constantine	86
1.2.6. Protocole général d'analyse HPLC	87
1.2.6.1. Préparation des solutions	87
1.2.6.2. Opération de filtration	87
1.2.6.3. L'analyse HPLC	87
1.2.6.3.1. Démarrages des modules HPLC	87
1.2.6.3.2. Etapes de l'analyse	88
1.2.7. Expression des résultats	88
1.2.7.1. Les tests statistiques	89
2. Résultats et discussion	89
2.1 Résultat de l'étape d'optimisation	89
2.1.1. La phase stationnaire	89
2.1.2. Optimisation de la phase mobile	90
2.1.3. Optimisation de la longueur d'onde	91

2.1.4. Optimisation du débit	92
2.1.5. Optimisation du volume d'injection	93
2.2. Paramètres retenus pour détecter et quantifier les résidus de pénicilline G et d'oxytétracycline	94
2.2.1. Pour la pénicilline G	94
2.2.2 Pour l'oxytétracycline	94
2.3. Fiabilité des méthodes d'analyse optimisées	95
2.3.1. La répétabilité	95
2.3.2. La reproductibilité	96
2.3.3. La linéarité de la courbe d'étalonnage	97
2.4. Résultats des essais de l'extraction des antibiotiques dans le lait	99
2.5. Résultats de l'étude de la cinétique des antibiotiques après injection par voie parentérale	102
2.6. Résultats de l'analyse quantitative des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache commercialisé à Constantine	103
2.6.1. Analyse d'oxytétracycline	103
2.6.1.1. Lait de vache	103
2.6.1.1.1. Comparaison entre les résultats obtenus par HPLC et par méthode ELISA	105
2.6.1.2. Lait en poudre	107
2.6.2. Analyse de la pénicilline G	109
2.6.2.1. Lait de vache	109
2.6.2.2. Lait en poudre	110
3. Conclusion	112
Conclusion et perspectives	113
Références bibliographiques	

Liste des figures, graphes, schéma et cartes

Figures	Pages
Figure n° 1 : Origine globale des constituants du lait í .	7
Figure n° 2 : expression des résultats de Delvotest®í ..	40
Figure n° 3 : ELISA type "sandwich"í í	42
Figure n° 4 : ELISA type "compétition"í .	43
Figure n° 5 : l'analyse qualitative d'un chromatogrammeí ...	48
Figure n° 6 : critères de choix des antibiotiques à administrerí ..	58
Figure n° 7 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites par voie intra-mammaireí í í ...	59
Figure n° 8 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites par voie généraleí í í í í í ..	60
Figure n° 9 : antibiotiques utilisés pour le traitement des affections respiratoiresí í í í í í í í í	61
Figure n° 10 : exemples de résultats positifs, négatifs et douteux après analyse par le Delvotest®í í .	67
Figure n° 11 : pourcentages de contamination du lait de vache révélés par le Delvotest®í í í í í í ..	68
Figure n° 12 : pourcentages de contamination du lait en poudre révélés par le Delvotest®í í í í í í .	69
Figure n° 13 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus de l'oxytétracyclineí í í í í í .	95
Figure n° 14 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus de la pénicillineí í í í í í í .	95
Figure n° 15 : courbe d'étalonnage de la pénicilline Gí .	98
Figure n° 16 : courbe d'étalonnage de l'oxytétracyclineí ..	98
Figure n° 17 : échantillon de lait dopé avec le standard de pénicilline Gí í í í í í í í í í í í í í í í ..	99
Figure n° 18 : échantillon de lait dopé avec le standard d'oxytétracyclineí í í í í í í í í í í í í í í í ...	99
Figure n° 19 : échantillon de lait témoiní í	100
Figure n° 20 : échantillon de lait prélevé à J4í í	102
Figure n° 21 : échantillon de lait prélevé à J7í ..	102
Figure n° 22 : échantillon de lait prélevé à J 12í í	102
Figure n° 23 : exemples d'échantillons de lait de vache positifs à l'oxytétracyclineí í í í í í í í í	104
Figure n° 24 : exemples d'échantillons de lait en poudre négatifs à l'oxytétracyclineí í í í í í í í .	107

Figure n° 25 : exemples d'échantillons de lait de vache négatifs à la pénicilline Gí í í í í í í í .. 110

Figure n° 26 : exemples d'échantillons de lait en poudre négatifs à la pénicilline Gí í í í í í í í 110

Graphes

Grphe n° 1 : courbe d'étalonnage de la méthode ELISA pour le kit 1, représentant les concentrations des standards ($\mu\text{g/L}$) en fonction des pourcentages d'absorbanceí í í í í í í í í í í í í í í í .. 79

Grphe n° 2 : courbe d'étalonnage de la méthode ELISA pour le kit 2, représentant les concentrations des standards ($\mu\text{g/L}$) en fonction des pourcentages d'absorbanceí í í í í í í í í í í í í í í í . 79

Schéma

Schéma n° 1 : instrumentation de l'HPLCí .. 46

Cartes

Carte n° 1 : Niveau de consommation apparente de produits laitiers en 2010 (kg par habitant)í í í .. 20

Carte n° 2 : Répartition géographique de la production mondiale en 2010 (millions de tonnes)í í í . 20

Carte n° 3 : site de l'étude représenté par les 12 communes de la wilaya de Constantineí í í í í í 52

Liste des abréviations

3-G-P = 3-glycérol-phosphate ;

AA = acides aminés ;

AcylCoA (C18, C12, C16) = Acyl-coenzyme A ;

AG = acides gras ;

AGCC = acides gras à chaîne courte ;

AGLC = acides gras à chaîne longue

AGNE = acides gras non estérifiés ;

AMM : Autorisation de la Mise sur Marché

BPIE : broncho-pneumonies infectieuses enzootiques

CEE : Communauté économique européenne

Ch = chylomicron ;

CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière

DJA : Dose journalière acceptable

DSE : dose sans effet

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EMA : Agence Européenne de l'Évaluation du Médicament

FAO : (Food and Agriculture Organization) Organisation des Nations unies pour
l'alimentation et l'agriculture,

FDA : Food and Drug Administration

FSA : Food Standard Agency of UK

HPLC : chromatographie liquide haute performance

LMR : Limite Maximales des Résidus

MG = monoglycérides ;

MGLA : matière grasse laitière anhydre

nm : nanomètre

NOEL : No Effect Level

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ONIL : Office National Interprofessionnel du Lait et Produits Laitiers

ppb : partie par billion

ppm : partie par million

RSV : virus respiratoire syncytial

SCLR : Safe Concentration based on Linear Regression

SCPM: Safe Concentration per Milking

SPE : Solid Phase Extraction

TG = triglycérides ;

t_M : temps mort

t_R : temps de rétention

TTSC : Time to Safe concentration

UI : Unité internationale

VLDL = very low density lipoprotein ;

Introduction

Les antibiotiques, utilisés en clinique depuis les années 1940, constituent une étape importante dans l'histoire de la médecine. Leur usage en médecine humaine et vétérinaire dans un but thérapeutique a constitué, pendant longtemps, un remède efficace contre de nombreux germes pathogènes. Cependant cette utilisation doit obéir à certains critères (les conditions et voies d'administration, posologie, durée du traitement, etc.). Ces critères sont liés directement à la durée de l'élimination du médicament appelée « délai d'attente » qui doit impérativement être respecté. Faute de quoi, elle conduit à l'apparition de résidus d'antibiotiques dans différentes denrées alimentaires d'origine animales (lait, viande, etc.).

En Algérie, les antibiotiques restent parmi les molécules les plus utilisées en élevage bovin. Leur usage, en traitement curatif, préventif ou en complémentation dans l'alimentation animale, conduit inévitablement à la présence de résidus dans les denrées alimentaires issus de ces animaux.

Parallèlement, le lait est un aliment complet dont l'intérêt nutritionnel est incontestable chez le jeune en croissance et chez l'adulte. En Algérie, cette denrée, largement consommée, occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire. Comme le prix subventionné est à la portée du consommateur, elle représente, de ce fait, la principale source de protéine d'origine animale.

Par ailleurs, la production locale du lait étant insuffisante, l'Algérie se voit contrainte d'importer de grandes quantités de poudre pour subvenir aux besoins de la population. Par conséquent, elle s'est retrouvée comme le deuxième importateur de poudre à travers le monde.

Bien qu'étant un aliment nutritif, le lait peut être impliqué dans plusieurs problèmes sanitaires, notamment la contamination chimique, due aux résidus de médicaments vétérinaires, qui peut détériorer sa qualité et avoir de sérieuses conséquences sur le consommateur, ainsi que sur la technologie laitière.

Chez le consommateur, la consommation des résidus d'antibiotiques conduisent à l'émergence d'une multitude de désagréments, aboutissant à titre d'exemple au développement de populations de microbes antibiorésistants, rendant inefficaces certains traitements en médecine humaine et vétérinaire, à l'apparition et au développement de certains problèmes allergiques « pour la pénicilline notamment », au développement de

certains cas de cancers et au déséquilibre de la flore intestinale qui peut conduire à un déséquilibre immunitaire.

Sur les industries laitières, les conséquences peuvent être désastreuses ; Les résidus entravent toute maturation de ferments lactiques, au cours de la transformation, engendrant ainsi des pertes économiques énormes.

Parallèlement, on assiste aujourd'hui à une utilisation irrationnelle et de manière totalement abusive et anarchique des antibiotiques en pratique rurale en Algérie. Le contrôle des résidus d'antibiotique n'étant pas réglementé. A ce jour, notre pays ne possède pas de limite maximale de résidus dans le lait, et autres produits issus des animaux, propres aux antibiotiques utilisés. De ce fait aucun contrôle n'est fait ni au niveau des fermes, ni sur les tanks après la collecte.

Afin d'évaluer la contamination du lait en résidus de médicaments vétérinaires, cette étude a pour objectif principal la recherche de résidus d'antibiotiques sur les laits consommés : Le lait de vache produit localement et le lait en poudre importé.

Ainsi une méthodologie pour l'identification, la confirmation et la détermination qualitative et quantitative des résidus des antibiotiques, les plus utilisés en productions animales, sera mise au point.

La recherche des résidus sera axée sur deux antibiotiques : la pénicilline et l'oxytétracycline. Le choix des antibiotiques est justifié ; la pénicilline étant l'antibiotique le plus utilisé, par voie diathélique, pour le traitement de pathologies mammaire. Et l'oxytétracycline est l'antibiotique phare, utilisé pour prévenir ou guérir une multitude de pathologie en élevage bovin.

Une enquête auprès des praticiens et officines vétérinaires sur les antibiotiques les plus utilisés chez les bovins sera réalisée, les résultats issus de cette dernière confirmeront les choix des antibiotiques à étudier.

En parallèle, une autre enquête sera réalisée au niveau des industries laitières de la région de Constantine, afin de cerner la situation de la filière lait dans la région.

Par la suite, l'évaluation des résidus d'antibiotiques sera tout d'abord qualitative par le biais de test d'inhibition microbiologique « Delvotest® », ensuite semi quantitative par méthode immuno-enzymatique « ELISA », et enfin une analyse quantitative par HPLC.

Cette dernière commencera, d'abord, par une optimisation des différents paramètres d'analyse HPLC pour la recherche des ces deux antibiotiques, ensuite une adaptation d'une technique d'extraction et de purification des échantillons de lait, et enfin une quantification,

par « HPLC », des échantillons révélés positifs ou douteux par les tests d'inhibition microbiologiques ou immuno-enzymatiques.

La validation de la méthodologie de détection contribuera ainsi à l'amélioration et la protection de la santé du consommateur algérien.

À côté de ce travail pratique, une synthèse bibliographique sera rédigée sur les inhibiteurs et les moyens de leur détection au sens large. Cette synthèse comprend d'abord des rappels sur l'antibiothérapie en pratique rurale ainsi que la cinétique des résidus dans la mamelle. Ensuite, elle est suivie de généralités sur le lait et les modalités de contamination par les résidus d'antibiotiques. Un second chapitre sera consacré à la problématique des résidus ; commençant par des rappels sur les notions de résidus, de délai d'attente ainsi que l'exposition de problèmes que peuvent engendrer ces derniers sur le consommateur et sur la technologie de transformation laitière.

Enfin, un dernier chapitre sera consacré, aux méthodes appliquées, pour la recherche et l'identification des résidus d'antibiotiques dans le lait.

Chapitre I : Pathologies dominantes et antibiothérapies

La maladie bactérienne est considérée comme le dépassement des défenses immunitaires de l'organisme par une atteinte infectieuse. Malgré la mise en place de mesures sanitaires, vaccinales, ou la sélection génétique d'animaux plus résistants, il faut parfois avoir recours à un traitement antibiotique pour vaincre l'infection. Le traitement antibactérien est ainsi une aide à apporter lorsque le système immunitaire est trop faible ou la souche infectieuse particulièrement virulente (Chatellet, 2007).

1. Rappels sur les antibiotiques

Les antibiotiques, sont des médicaments d'utilisation courante en médecine, ils sont cependant de découverte relativement récente et ont permis de sauver de nombreuses vies. En 1897, Ernest Duchesne met en évidence les propriétés de certaines moisissures (*Penicillium glaucum*) (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999 ; Doucet, 1998), mais ce n'est qu'en 1928 qu'Alexandre Fleming découvre "officiellement" la pénicilline, et ce n'est qu'en 1943, qu'elle sera produite industriellement (Milhaud *et al.*, 1982).

1.2. Définitions

Les antibiotiques se définissent comme des molécules antibactériennes synthétiques ou naturelles (d'origine biologique) capables d'inhiber la croissance des bactéries ou les détruire (Helali, 1999). Ils ont une toxicité sélective ; ils sont toxiques pour les bactéries mais pas pour l'organisme cible (Merad et Merad, 2001).

Les sources principales des antibiotiques sont les champignons, mais aussi les bactéries. Il existe également des antibiotiques entièrement synthétiques (Ziadi, 2010 ; Guillemot *et al.*, 2006 ; Merad et Merad, 2001 ; Yala *et al.*, 2001).

D'après les mêmes auteurs, les antibiotiques sont définis aussi par leur spectre d'activité, leur toxicité sélective, leur mode d'action, et leurs propriétés pharmacocinétiques.

1.3. Les pénicillines

1.3.1. Mode d'action

Les pénicillines sont des antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne agissant essentiellement comme inhibiteurs de la synthèse de peptidoglycane. Ils opèrent sur les dernières étapes de la synthèse du peptidoglycane, (Allain, 2006 ; Yala *et al.*, 2001 ; Ziadi, 2010).

Les β -lactamines exercent leur effet antibiotique sur les germes possédant une paroi riche en peptidoglycane et sont sans effet sur les organismes dépourvus de paroi (mycoplasmes). Les β -lactamines, de par leur structure chimique, inhibent les transpeptidases extracytoplasmiques à condition d'entrer en contact avec elles.

Dans les bactéries Gram positif, les différentes β -lactamines atteignent les transpeptidases à travers la paroi de peptidoglycane déjà constituée ou en cours de constitution. Par contre, dans les bactéries Gram négatif, elles n'atteignent ces enzymes qu'après pénétration à travers les canaux porines de la membrane externe (Allain, 2006 ; Hennel, 2006).

1.3.2. Pharmacocinétique des β -lactamines

Sur le plan pharmacocinétique, l'absorption digestive de la pénicilline G est médiocre, (inférieure à 30%) car elle est détruite par le suc gastrique acide. Les pénicillines diffusent facilement dans les espaces extracellulaires mais ne se concentrent pas dans les tissus (Allain, 2006 ; Milhaud *et al.*, 1982).

Dans les deux ou trois premières heures qui suivent une injection intramusculaire de la pénicilline, la concentration dans le lait est environ 100 fois inférieure à la concentration sanguine, ensuite la concentration dans le lait augmente légèrement alors que la concentration sanguine diminue. A la 6^{ème} ou à la 12^{ème} heure, le rapport entre les deux concentrations est de l'ordre de 10 (Milhaud *et al.*, 1982).

Les pénicillines sont liées à 50% aux protéines plasmatiques mais ceci n'a guère de conséquences cliniques. Sa demi-vie plasmatique est courte, de l'ordre de 30 minutes (Allain, 2006 ; Milhaud *et al.*, 1982), les paramètres pharmacocinétiques des principales pénicillines sont sur le tableau n° 1 ; annexe II.

Les pénicillines subissent peu de biotransformations et sont éliminées sous forme active (Hennel, 2006). Le pourcentage de dégradation n'excède pas 20% (Milhaud *et al.*, 1982).

L'élimination des pénicillines s'opère au niveau rénal par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire (Allain, 2006 ; Milhaud *et al.*, 1982).

Le lait n'élimine qu'une petite quantité de pénicilline administrée par voie générale. Mais suite à une administration par voie galactophore, lors du traitement des mammites, les résidus de pénicilline existent non seulement dans le lait du quartier traité, mais encore dans celui des quartiers voisins et ceci pendant plusieurs jours (Milhaud *et al.*, 1982).

1.4. Les tétracyclines

1.4.1. Composition et mode d'action

Comme leur nom l'indique, les tétracyclines (TC) possèdent une structure chimique commune composée de quatre cycles hexacarbonés fusionnés en ligne, elles ont été découvertes pour la première fois en 1945 par Duggar. B (Chopra et Roberts 2001 cité par Ziadi, 2010), et depuis elles sont utilisées dans le contrôle des infections bactériennes chez les animaux et chez les humains (Samanidou 2005 cité par Ziadi, 2010). Les tétracyclines sont utilisées de façon importante depuis les années 50, les mécanismes responsables de leur action inhibitrice ne sont pas entièrement connus.

Cependant, il semble établi qu'une fois dans le cytoplasme, elles inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la structure cible, un site localisé sur la sous-unité 30S des ribosomes pour lequel elles présentent une grande affinité. Elles perturbent ainsi l'interaction codon-anticodon entre l'ARNt et l'ARNm ce qui bloque la phase d'élongation. Les tétracyclines agissent donc au stade de la traduction protéique. (Allain, 2006 ; Hennel, 2006 ; Yala *et al.*, 2001 ; Helali, 1999 ; Ziadi, 2010).

Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre, couvrant des bactéries à Gram positive et d'autres à Gram-négative, tels que les atypiques Chlamydiae, les mycoplasmes, les rickettsies, les parasites et les protozoaires.

On distingue des cyclines naturelles tels les Chlortétracyclines et les Tétracyclines, et les cyclines semi-synthétiques comme : Oxytétracycline, Doxycycline et Minocycline.

1.4.2. Pharmacocinétique des tétracyclines

La biodisponibilité orale varie fortement selon la forme galénique et le type de molécule, leur forte liposolubilité leur permet de bien diffuser à travers les barrières biologiques et atteindre des concentrations efficaces, y compris dans les milieux intracellulaires ; notamment dans le placenta, les glandes mammaires, les sécrétions bronchiques et les liquides d'ascite. La liaison aux protéines de ces molécules limite par contre leur diffusion dans le liquide céphalo-rachidien.

Ce sont des amphotères pouvant former des sels avec des acides ou des bases. Cette propriété permet d'améliorer de façon importante leur solubilité dans l'eau en vue d'une administration par voie intraveineuse. Elles peuvent également former des chélates avec des cations (tels que Al^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}), ce qui risque de diminuer l'absorption digestive ou d'entraîner la formation de précipités insolubles avec des solutés pour perfusion (Ziadi, 2010).

L'Oxytétracycline est éliminée par filtration glomérulaire sous forme active et accessoirement par la bile. Le cycle entéro-hépatique prolonge la demi-vie d'élimination, il peut aussi être à l'origine d'une dérive de la flore intestinale.

2. Pathologies dominantes en élevage bovin

2.1. Pathologie de la mamelle

2.1.1. Rappels anatomophysiologique sur la mamelle et la sécrétion lactée

Le lait est sécrété sur un mode exocrine par les glandes mammaires, au nombre de quatre chez la vache (une glande par quartier). Chaque glande est composée de cellules lactogènes constituant la couche interne des acini mesurant entre 0,1 et 0,3 mm de diamètre, à l'intérieur desquels est produit le lait. Ils sont abondamment irrigués grâce à un riche réseau de capillaires sanguins qui les entoure (Mathieu, 1998 cité par Cazet, 2007). Ainsi le lait est principalement synthétisé dans la mamelle à partir de précurseurs prélevés dans le sang (glucose, acides gras, acides aminés et minéraux) (figure n° 1) (Larson et Smith, 1974 cité par Cazet, 2007). La production peut varier avec le débit sanguin qui, de 20 à 27 mL/100g de tissu mammaire par minute avant parturition, s'accroît jusqu'à atteindre 60 mL/100 g de tissu mammaire par minute en pleine lactation puis diminue à nouveau et de façon progressive au cours de l'avancement de la lactation.

Après sa production au sein des acini, le lait est éjecté dans des canalicules intra-lobulaires pour se retrouver dans des canaux galactophores puis dans le sinus lactifère dont une partie se situe dans le trayon. Pour sortir de la mamelle, le lait traverse le canal du trayon qui se trouve à l'extrémité de ce dernier (Dosogne *et al.*, 2000).

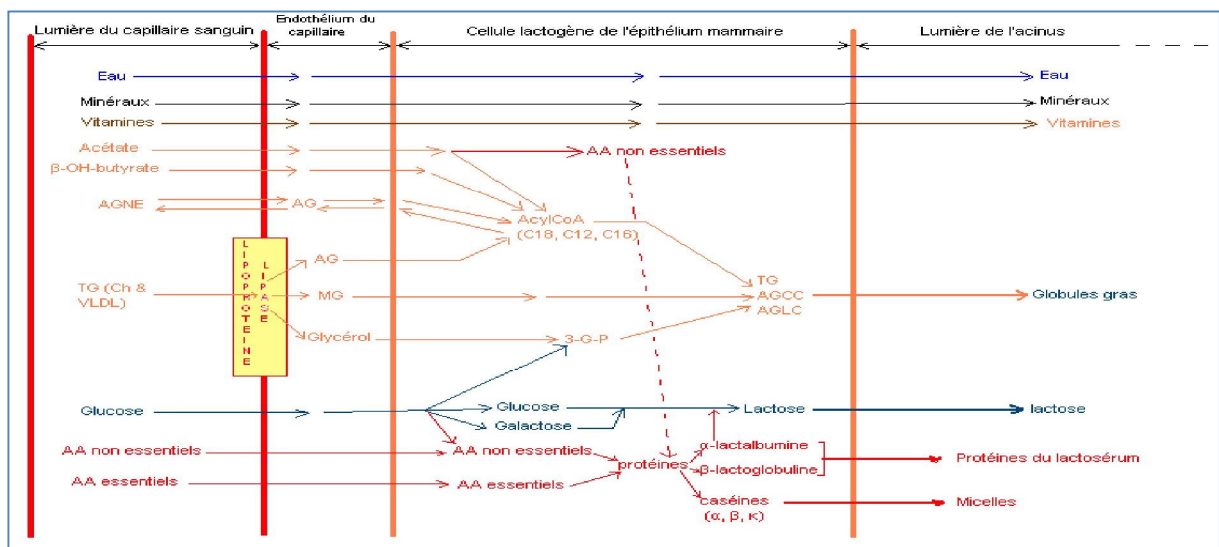


Figure n° 1 : Origine globale des constituants du lait (Wattiaux, 1997 cité par Cazet, 2007).

2.1.2. Pharmacocinétique des antibiotiques dans la mamelle

Les études de la pharmacocinétique classiques comprennent des dosages du principe actif dans le sang et/ou dans le lait sans tenir compte des concentrations atteintes au sein du parenchyme mammaire. **Des études plus récentes réalisées sur des mamelles isolées ont montré une certaine diffusion des antibiotiques dans le parenchyme mammaire**, de nombreux facteurs peuvent modifier le comportement pharmacocinétique des substances administrées (**Gehring et Smith, 2006**).

2.1.2.1. Facteurs de variation de l'excrétion des antibiotiques dans le lait

2.1.2.1.1. Principe actif

Le passage dans le lait d'une molécule administrée par voie parentérale est très variable, cela dépend de sa disponibilité dans le sang, de son état d'ionisation et de la liposolubilité (**Brouillet, 1994 ; Bories, 1998**). **Quelques exemples de rapports de concentration lait/sérum des antibiotiques en fonction de leur pKa sont retrouvés sur le tableau n° 2 ; annexe II.**

Les antibiotiques bases faibles seront moins ionisés au pH du lait (6,6-6,8) et diffuseront beaucoup mieux que les acides faibles (Faroult *et al.*, 2004 ; **Sérieys, 2004 ; Brouillet, 1994**).

Les antibiotiques qui ont une forme non ionisée avec une grande liposolubilité, seront mieux absorbés que les acides faibles. Selon, Gedilaghine (2005), **Sérieys (2004), Brouillet (1994), Bouchot (1985)** ; après une injection parentérale on retrouvera donc plus facilement dans le lait, les macrolides (spiramycine, érythromycine, tylosine), les tétracyclines et le chloramphénicol.

2.1.2.1.2. Rôle de l'excipient

Pour les produits injectés par voie parentérale, les excipients huileux entraînent une élimination beaucoup plus longue qu'un excipient aqueux. Une pénicilline procaïne en excipient huileux par exemple aura sa durée d'excrétion majorée de 125% par rapport à la même pénicilline en milieu aqueux (**Brouillet, 1994**).

Pour les produits injectés dans la mamelle, le rôle de l'excipient est essentiel. Dans la plupart des cas, c'est lui qui détermine le délai d'attente (**Fabre et al., 2006 ; Bouchot, 1981**) ; ce sont les excipients qui entraînent donc la longue rémanence des produits de traitement hors lactation (**Brouillet, 1994**).

Selon Guerin et Guerin-Fauble (2007), les formes de plus en plus retard par ordre croissant sont les suivantes : la solution aqueuse, la suspension aqueuse, la solution huileuse, la suspension huileuse, la suspension huileuse + adsorbant, la suspension huileuse + adsorbant + épaississant, lester retard + suspension huileuse + adsorbant + épaississant.

2.1.2.1.3. Effet de la dose

L'effet de la dose est important, l'augmentation de celle-ci semble entraîner un allongement systématique de la durée d'excrétion pour les antibiotiques injectés par voie parentérale. Exemple, lorsque la dose de procaine pénicilline injectée par voie intramusculaire passe de 3.000.000 à 6.000.000 UI, la durée d'excrétion moyenne dans le lait est majorée de 33 % (Brouillet, 1994).

Pour les produits injectés dans la mamelle, une augmentation de la dose peut aussi augmenter la durée d'excrétion mais cela n'est pas systématique (Brouillet, 1994 ; Bouchot, 1981).

2.1.2.1.4. Voie d'administration

Le changement de la voie d'administration peut modifier la concentration d'antibiotique retrouvée dans le lait et la durée de son élimination. D'une manière générale, on remarque que la voie mammaire entraîne une durée d'excrétion beaucoup plus longue que la voie intramusculaire pour un même produit et sa concentration dans le lait est beaucoup plus importante (Fabre *et al.*, 2006 ; Brouillet, 1994). Cependant, les voies parentérales sont également sources de contamination du lait et ne doivent pas être négligées en raison des hautes doses habituellement utilisées (Labie, 1981).

2.1.2.1.5. Durée de traitement

Elle n'entraîne aucune modification dans la durée d'élimination. Le délai d'attente sera donc le même après la dernière injection d'un traitement multiple qu'après une injection unique du même produit (Brouillet, 1994 ; Bouchot, 1981).

2.1.2.1.6. Facteurs liés à l'animal

L'inflammation du tissu mammaire est responsable de modifications physiques et chimiques à l'origine de variations de la pharmacocinétique des produits administrés. Ainsi, les canaux galactophores peuvent être comprimés par l'inflammation (Sérieys, 2004). La perméabilité vasculaire est également modifiée et on suppose que les principes actifs pénètrent plus aisément en profondeur dans le parenchyme lors des mammites, en raison

d'une rupture des jonctions cellulaires de l'épithélium. La composition chimique du lait varie également avec une augmentation du pH, de l'albumine et des leucocytes et une diminution des caséines et des matières grasses (Stoltz, 2008 ; Gehring et Smith, 2006 ; Brouillet, 1994).

2.1.3. Les mammites

2.1.3.1. Définition

Une mammite désigne, par définition, une inflammation d'un ou de plusieurs quartiers de la mamelle due généralement à une infection bactérienne (Hanzen, 2008 ; Craplet *et al.*, 1973). Elles peuvent être dues à des désordres physiologiques ou à des traumatismes locaux. Les infections mammaires peuvent être ou non associées à des signes cliniques, on distingue alors les mammites cliniques des mammites subcliniques (Poutrel, 1985 et Seegers *et al.*, 1997 cité par Gedilaghine, 2005).

2.1.3.1.1. Les mammites cliniques

Les mammites cliniques sont caractérisées par la présence de symptômes fonctionnels représentés surtout par des modifications macroscopiquement visibles de la quantité, de la qualité et de l'aspect du lait, de symptômes locaux inflammatoires observés au niveau de la mamelle ; douleur, chaleur, tuméfaction, etc. et de symptômes généraux comme l'hyperthermie, l'anorexie, l'arumination.

En pratique, on considère qu'il y a une mammite clinique dès qu'il y a une modification de l'aspect du lait ou de la sécrétion de la mamelle qui est le critère le plus précoce et le plus constant. Enfin, selon la gravité et la simultanéité des symptômes, on distingue, par ordre décroissant de gravité, les mammites cliniques suraiguës, aiguës et subaiguës (Hanzen, 2008 ; Gedilaghine, 2005).

2.1.3.1.2. Les mammites subcliniques

Elle ne présente aucun des signes précédemment évoqués : l'état général est parfaitement normal, la mamelle cliniquement saine et le lait ne présente aucune modification macroscopique. Par contre, l'examen cytologique du lait met en évidence une augmentation parfois considérable du nombre de polynucléaires. Ce type de mammite résulte de l'évolution de foyers infectieux au sein du parenchyme, créés par des germes dont l'organisme n'arrive pas à se débarrasser. Elle peut évoluer pendant très longtemps parfois sur plusieurs lactations et aboutir à une fibrose plus ou moins importante des quartiers atteints (Hanzen, 2008; Hulsen et Lam, 2007; Poutrel, 1985 Cite Par Gedilaghine 2005).

2.1.3.2. Importances des mammites

Les mammites chez la vache sont une dominante pathologique en élevage laitier (Chatellet, 2007) présentant ainsi une importance à la fois médicale, sanitaire et économique.

2.1.3.2.1. Importance médicale

Toute mammité porte préjudice au bien être de l'animal. De plus, certaines mammites sont mortelles, c'est le cas des mammites gangréneuses, à *Nocardia*, ou les mammites colibacillaires (Poutrel, 1985 cité par Gedilaghine, 2005).

2.1.3.2.2 Importance sanitaire

Les mammites portent atteinte à l'hygiène animale et potentiellement à la santé publique. En effet, le lait mammité peut être vecteur d'agents responsables de toxico-infections alimentaires (salmonellose, listériose, par exemple) (Gedilaghine, 2005).

2.1.3.2.3. Importance économique

Les mammites constituent le trouble sanitaire le plus fréquent et aux plus fortes répercussions économiques au sein de l'élevage de bovins laitiers (Shrick *et al.* 2001 ; Kelto *et al.* 2001). L'impact économique est représenté par la somme des coûts des actions de maîtrise (traitements et préventions) et des pertes (réductions de production, lait non commercialisé, pénalités sur le prix de vente, mortalités et réformes anticipées) (Gedilaghine, 2005).

2.1.3.3. Etiologies

De très nombreux micro-organismes sont susceptibles de franchir la barrière constituée par le canal du trayon et de se multiplier dans la mamelle. Bactéries, virus, levures, algues peuvent être la cause d'infections mammaires et de mammites. Cependant, ce sont les bactéries qui sont responsables de la très grande majorité des cas (Poutrel, 1985 cité par Gedilaghine 2005). Ces bactéries à l'origine d'infections mammaires peuvent avoir deux réservoirs différents : environnemental ou mammaire (Chatellet, 2007). Se sont par ordre décroissant de gravité :

- Trois espèces de Streptocoques qui peuvent être impliquées lors de mammité *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, et à moindre degré *S. uberis*.
- *Staphylococcus aureus* est le second pathogène le plus isolé, derrière *Streptococcus uberis*. Certaines souches, caractérisées coagulase positives, induisent des mammites généralement subcliniques, tandis que les coagulase

négligentes entraînent des taux cellulaires élevés dans le lait, dépréciant sa qualité (Bendali *et al.*, 2008 ; Chatellet, 2007 ; Gedilaghine, 2005).-

- Les mycoplasmes, particulièrement *Mycoplasma bovis*, sont des pathogènes très importants car pouvant provoquer de graves mammites pendant la lactation, ils sont également capables d'infecter la vache lorsque celle-ci est tarie (Sylvester *et al.*, 2008 ; Chatellet, 2007). Les mammites à mycoplasmes sont principalement causées par *M. bovis*. Ces mammites sont hautement contagieuses à l'intérieur d'un troupeau (Bendali *et al.*, 2008 ; Sylvester *et al.*, 2008).

2.1.3.4. Diagnostic

L'examen clinique de la mamelle et des sécrétions mammaires constitue le pilier de la démarche de diagnostic des mammites. C'est le moyen le plus simple et le moins onéreux disponible. Cet examen doit être réalisé en trois temps :

É Examen visuel de la mamelle É Palpation de la mamelle É Examen visuel des sécrétions mammaires.

Cependant, la mise en évidence des modifications tant au niveau de la mamelle que du lait n'est pas toujours aisée. Dans le cas des mammites subcliniques, elle peut même être impossible (pas de modification du lait et de la mamelle). L'utilisation régulière d'un bol à fond noir peut faciliter la tâche (Lepage, 2003 cité par Bouaziz, 2005).

2.1.3.5. Traitements des mammites

2.1.3.5.1. Traitement antibiotiques

Les mammites chez la vache sont une dominante pathologique en élevage laitier (Chatellet, 2007). Le vétérinaire a souvent recours aux antibiotiques pour ses traitements.

Les spécialités antibiotiques constituent ainsi la base du traitement (Bendali *et al.*, 2008). Les produits utilisables pendant la lactation doivent permettre une bonne pénétration du principe actif dans le tissu. Or les formulations des produits de tarissement doivent permettre un bon maintien des concentrations en principe actif dans le tissu mammaire, en utilisant des suspensions huileuses qui libèrent lentement le principe actif (Gehring et Smith, 2006).

Le traitement des mammites comprend donc :

- **le traitement en lactation** qui concerne les infections cliniques (Guerin et Guerin-Fauble, 2007), ce traitement se doit d'être aussi précoce que possible et dépendra des symptômes présentés par l'animal (Bendali *et al.*, 2008). Les spécialités contiennent un antibiotique ou une association d'antibiotiques. Elles sont avant tout actives sur les bactéries Gram + (*sta-*

phylocoques, streptocoques) responsables de la majorité des infections : les antibiotiques de la famille des bêtalactamines sont les plus utilisés (pénicillines, céphalosporines), seuls ou en association (aminosides, colistine...). Les tétracyclines sont également très utilisées (Airieau *et al.*, 2000).

Ainsi, lors d'infection par *Staphylococcus aureus*, des pénicillines (associées ou non aux aminosides), des céphalosporines et des macrolides sont recommandés. Pour le traitement des mammites à *Streptococcus uberis*, on retrouve les pénicillines et les associations pénicilline+novobiocine et néomycine+bacitracine.

Le recours aux bêta-lactamines, aux aminosides, aux polypeptides ou aux fluoroquinolones est indiqué lors de colibacillose. Enfin, en seconde intention, l'utilisation des bêta-lactamines par voie générale est recommandée en cas d'échec du traitement, probablement due à une infection par une bactérie Gram + (Gaudin, 1999).

Les mammites font appel à de nombreux antibiotiques notamment ceux rapportés sur le tableau n° 3 ; annexe II.

- **Le traitement hors lactation** appelé traitement de tarissement, qui vise à éliminer les infections subcliniques et à prévenir les nouvelles infections pendant la période sèche (Lescoeur, 2003), cette prévention est obtenue par l'emploi d'antibiotiques à effet retard (Guerin et Guerin-Fauble, 2007), les antibiotiques utilisés doivent être dirigés principalement contre les staphylocoques et les streptocoques. L'excipient huileux joue un rôle essentiel. Il assure une persistance du médicament à dose thérapeutique durant plusieurs semaines et permet une dispersion de l'antibiotique dans tout le quartier (Bendali *et al.*, 2008). La persistance des antibiotiques après le traitement de tarissement est ainsi assez longue : 21 jours dans 30% à 90% des quartiers et 49 jours dans 0 à 30% des quartiers.

2.1.3.5.2. La corticothérapie et la vaccinothérapie

La corticothérapie par voie générale est indiquée lors de mammite suraiguë afin de lutter contre le choc toxique. Elle doit néanmoins être mise en place très rapidement. Cependant, les doses le plus souvent préconisées (30 mg de dexaméthasone en IV ou IM pour une vache) sont trop faibles pour traiter le choc mais suffisantes pour exercer un effet anti-inflammatoire. Cela explique pourquoi les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent être utilisés lors de mammite grave survenant avant le vêlage (sans risque de provoquer la mise bas) (Hanzen, 2008).

La vaccinothérapie (ou antigénothérapie), à l'aide de vaccins du commerce ou d'autovaccins préparés avec une souche isolée de l'exploitation, a longtemps été préconisée.

L'efficacité d'une telle thérapeutique est aujourd'hui fortement contestée. La stimulation des moyens de défense spécifique par l'utilisation de vaccins est rendue difficile par la grande variabilité des souches de germe responsable de mammites et la difficulté de stimuler correctement l'immunité locale (IgA) ou générale (IgM) des animaux atteints (Hanzen, 2008).

2.2. Les affections respiratoires

Les bovins sont très sensibles aux pathologies respiratoires du fait de leur faible capacité respiratoire, de leurs voies respiratoires étroites et de leurs poumons très compartimentés. Les pertes économiques (mortalité, retards de croissance, baisses de performance, coûts de traitement et surcroît de travail) peuvent donc être majeures notamment lorsque les veaux sont atteints (Marignan, 2011).

Les maladies respiratoires sont souvent des pathologies de groupe, dues à de multiples facteurs.

Le système respiratoire supérieur est le siège de rhinites ou de sinusites, c'est le cas de l'IBR, de la grippe, ou encore du coryza gangreneux. Une atteinte plus profonde est une trachéite ou une laryngite. Cela peut être dû à un corps étranger, ou à une mycose. Arrivé aux bronches c'est une bronchite (Vénéreau, 2011).

2.2.1. Etiologies des affections respiratoires

Plusieurs catégories d'agents pathogènes peuvent être à l'origine des maladies respiratoires chez les vaches et sur leurs veaux :

- des BACTÉRIES : pasteurelles (*pasteurella multocida* ; *mannheimia haemolytica*) ; mycoplasmes
- des VIRUS : virus respiratoire syncytial (RSV) ; virus PI3 (*parainfluenza 3*) ; virus BHV1 (IBR)
- des PARASITES : dictyocaulus.

2.2.2. Les broncho-pneumonies infectieuses enzootiques (BPIE)

Les bronchopneumonies bovines sont un ensemble de maladies multifactorielles fréquentes en élevage ; plusieurs facteurs entrent en jeu entre-autres : les conditions de vie de l'animal, les défenses immunitaires, le stress (Schelcher et Valarcher, 1999).

Ces affections ont des conséquences néfastes sur les productions. Car elles peuvent entraîner des retards de croissance et une mortalité élevée chez les veaux notamment lors des quatre premiers mois de leur vie (Catella, 2003).

2.2.2.1. Traitement des broncho-pneumonies infectieuses enzootiques

Le traitement des BPIE vise à stopper le plus tôt possible le développement des bactéries (Schelcher et Valarcher, 1999). Il repose essentiellement sur l'utilisation d'anti-infectieux et d'anti-inflammatoires susceptibles de favoriser une guérison rapide. Les antibiotiques prescrits dans le traitement des BPIE sont nombreux : pénicillines du groupe A (ampicilline, amoxicilline), céphalosporines (ceftiofur, cefquinone *ND*), aminosides seuls ou associés aux pénicillines (streptomycine, néomycine, gentamicine, spectinomycine), tétracyclines (oxytétracycline) ou d'apparition plus récentes sur le marché, florfénicol, quinoiones fluorées (enrofloxacine, danofloxacine, marbo-floxacine), macrolides (spiramycine, tylosine). D'autres anti-infectieux peuvent également être envisagés dans le traitement des BPIE, notamment les sulfamides (triméthoprime, sulfa-diméthoxine). Les quinolones sont très actives contre les bactéries Gram - et s'utilisent en général par voie parentérale (Bendali *et al.*, 2008 ; Airieau *et al.*, 2000).

2.2.3. Les affections dues au virus respiratoire syncytial

La plupart des espèces de ruminants ainsi que l'homme peuvent être infectés par des souches de virus respiratoire syncytial (RSV). Ce virus est ainsi appelé parce qu'il provoque des lésions de bronchiolite nécrosantes dues à des amas de cellules qui fusionnent- (syncytia). Les souches de virus respiratoires syncytial qui infectent les bovins (BRSV) sont des pneumovirus (*Para-myxoviridae*) qui semblent spécifiques (Airieau *et al.*, 2000).

2.2.3.1 Traitement des affections dues au virus respiratoire syncytial

Les affections respiratoires dues au RSV nécessitent l'administration, pendant 3 à 4 jours, d'un anti-inflammatoire. L'acide acétylsalicylique (aspirine) à la dose de 50 mg/kg de poids vif limite les phénomènes congestifs douloureux et l'abattement (Maillard, 2002).

Pour éviter les complications bactériennes, on utilise systématiquement des antibiotiques comme ceux employés dans le traitement des BPIE. Les pénicillines du groupe A (ampicilline, amoxicilline) se concentrent bien dans le poumon et stoppent la prolifération des pasteurelles (Airieau *et al.*, 2000).

2.2.4. Les pasteurelloses primaires et les mycoplasmes

Les pasteurelles (*Pasteurella*) sont les bactéries habituelles des complications des affections grippales. Elles peuvent aussi exprimer leur pouvoir pathogène propre sans l'intervention préalable de virus. Deux espèces de bactéries sont capables de provoquer des

pasteurelloses primaires chez les bovins, l'une très fréquente et de pathogénité modérée: *P. multocida*, l'autre moins souvent rencontrée, mais très pathogène: *P. hemolytica*.

En plus des infections dues à des pasteurelles, des infections dues à des mycoplasmes, en particulier à *Mycoplasma bovis*, peuvent se développer parfois simultanément dans un même élevage. Ce sont des mycoplasmoses.

Les mycoplasmoses ne se distinguent pas cliniquement des pasteurelloses. Elles ont une évolution moins aiguë et sont souvent associées à d'autres maladies chroniques, arthrites, mammites... Toutes les catégories de bovins peuvent être infectées de pasteurelles ou de mycoplasmes et présenter des affections primaires. Toutefois, les pasteurelloses et les mycoplasmoses sont observées avec une plus grande fréquence chez les jeunes bovins (Sylvester *et al.*, 2008 ; Catella, 2003 ; Airieau *et al.*, 2000).

2.2.4.1. Traitement des pasteurelloses et des mycoplasmes

Pour soigner les pasteurelloses primaires, on utilise soit les pénicillines du groupe A ayant un spectre d'activité élargi aux Gram - (ampicilline, spectinomycine) ou des amoxicillines (spectinomycine), ou les céphalosporines (ceftiofur, cefquinone), soit l'oxytétracycline, soit le florfénicol, soit encore les associations triméthoprime-sulfamide. Vis-à-vis de *M. bovis*, seuls certains antibiotiques : les macrolides et les quinolones, sont efficaces (Airieau *et al.*, 2000).

Chapitre II : lait et modalités de contamination par les résidus d'antibiotiques

1. Le lait

Le lait cru est un produit hautement nutritif. Cependant sa production doit être sévèrement contrôlée en raison des risques éventuels qu'il peut présenter pour la santé humaine (Labioui *et al.*, 2009).

1.1. Définition

Le lait a été défini en 1908 au cours du Congrès International de la Répression des Fraudes à Genève comme étant : le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires, il doit être recueilli proprement et ne pas contenir du colostrum (Pougheon et Goursaud 2001 ; Konte, 1999 ; Lazak et Mâamar, 1978 ; Lecoq, 1965).

1.2. Composition et caractéristiques physicochimiques du lait

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible mais identifiable. C'est un liquide légèrement visqueux dont la composition et les caractéristiques physicochimiques varient sensiblement selon les espèces animales et selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation ainsi qu'au cours de la traite (Courtet Leymarios, 2010).

Les principaux constituants du lait sont, par ordre décroissant:

- de l'eau majoritairement,
- des glucides principalement représentés par le lactose,
- des lipides essentiellement des triglycérides rassemblés en globules gras,
- des protéines : caséines rassemblées en micelles, albumines et globulines solubles,
- des sels et minéraux à l'état ionique et moléculaire,
- des éléments à l'état de traces mais au rôle biologique important : enzymes, vitamines, oligo-éléments (Pougheon, et Goursaud 2001).

Sur le tableau n° 4 ; annexe II, se trouve la composition chimique du lait chez trois espèces animales.

Le lait de vache a une densité moyenne égale à 1,032. C'est un mélange très complexe et très instable, il contient une forte proportion d'eau d'environ 87 % (Courtet Leymarios,

2010). Sur le plan physique, c'est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses) (Courtet Leymarios, 2010), (FAO, 1998). Son pH est légèrement acide (pH compris entre 6,4 et 6,8 pour le lait de vache), l'acidité du lait augmente avec le temps car le lactose va être dégradé en acide lactique (Courtet Leymarios, 2010). Le tableau n° 5 ; annexe II, récapitule les principales caractéristiques physicochimique du lait de vache.

1.3. Valeurs nutritives du lait

Le lait est généralement considéré comme un aliment très complet du point de vue nutritionnel car il apporte à la fois des protéines, des glucides, des lipides et des minéraux.

1.3.1. Apports en protéines

Un litre de lait de vache, qu'il soit entier ou écrémé apporte 35 g de protéines. Il s'agit principalement de caséine, de lactalbumine et de lactoglobuline. Tous les acides aminés indispensables sont présents, ces protéines sont très bien assimilées par l'organisme. (Courtet Leymarios, 2010).

1.3.2. Apports en lipides

Les matières grasses sont présentes dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras. La teneur en matières grasses du lait est appelée taux butyreux (TB). La teneur en lipides du lait de consommation courante est standardisée à un taux minimum de 36 g par litre de lait entier (peut varier de 35 à 45 g par litre). Cette teneur en lipides confère au lait entier une valeur énergétique importante (700 Kcal soit 2 930 KJ pour 1 litre). Les laits demis écrémés et écrémés apportent respectivement 15 à 18 g et 1 g de lipides par litre (Pujol-Dupuy, 2004).

1.3.3. Apports en glucides

Le lactose, glucide essentiel du lait, favorise l'absorption du calcium contenu dans cet aliment. Un litre de lait, qu'il soit entier ou écrémé, apporte 50 g de lactose (Courtet Leymarios, 2010).

1.3.4. Apports en minéraux et oligo-éléments

Le lait est une source importante de calcium : 1 200 mg par litre (les besoins journaliers de l'adulte sont de 900 mg). Le calcium du lait est mieux absorbé que celui de toute autre source car il apporte en même temps du phosphore (rapport Ca/P = 1,4) et de la

vitamine D. Le lait apporte en outre du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du zinc et de faibles quantités de soufre, de magnésium et de cuivre. Il ne contient pas de fer (Courtet Leymarios, 2010 ; Wehrmuller et Ryffel, 2007 ; Enjalbert, 2002 ; Guenguen, 1995).

1.3.5. Apports en vitamines

Le lait entier est une source appréciable en vitamine A, la teneur en vitamine D est variable (plus élevée dans le lait d'été que dans le lait d'hiver). Presque toutes les vitamines du groupe B sont présentes, en particulier la vitamine B12 (Courtet Leymarios, 2010).

1.3.6. Autres valeurs nutritives

Selon Enjalbert (2002), certains composants du lait peuvent jouer un rôle de promoteur de croissance ou de protecteur à l'égard de maladies notamment :

- la casoplatéline et la casoplastrine, inhibent l'agrégation plaquettaire ou la fixation des fibrinogènes
- les phosphopeptides, chélateurs de calcium, qui expliquaient en partie la forte digestibilité du calcium chez le jeune consommant du lait
- les casokinines, à rôle immunomodulateur et antihypertenseur
- les casomorphines, à propriétés opioïdes
- les casoxines, antagonistes des opioïdes
- la lactoferrine, glycoprotéine de transport du fer, possède des fonctions antimicrobiennes

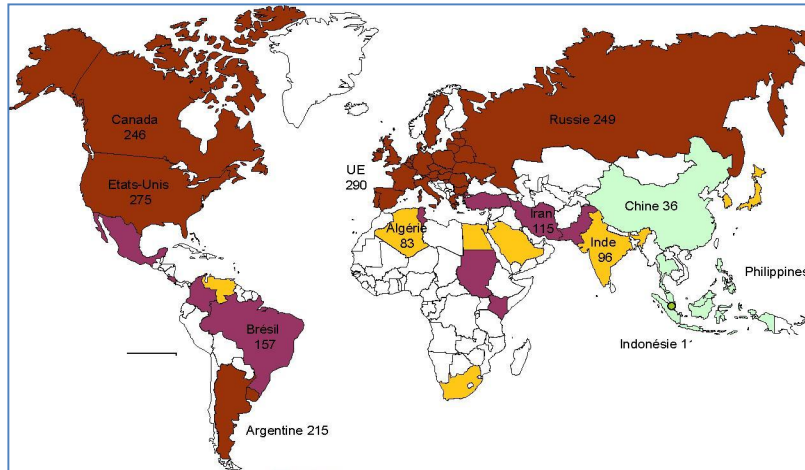
De nombreuses études ont montré que la consommation des produits laitiers pouvait diminuer le risque d'apparition de certains cancers (Enjalbert, 2002).

1.4. Importance de la consommation du lait

1.4.1. Dans le monde

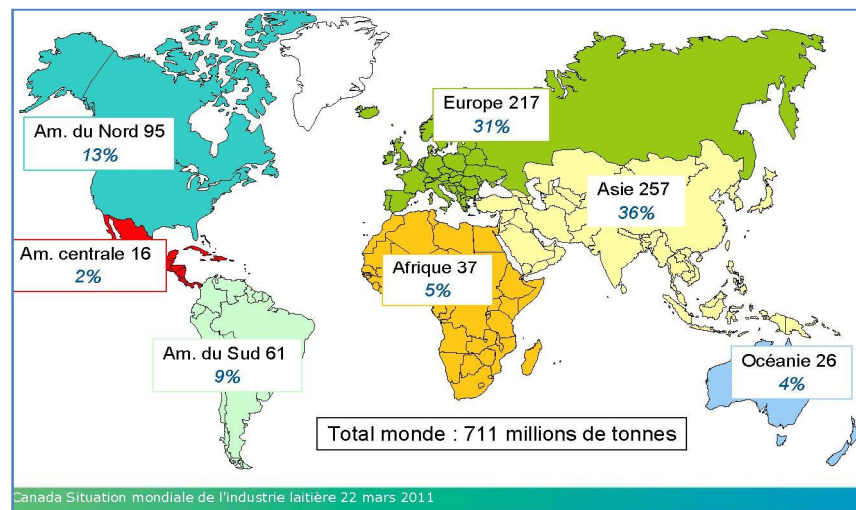
La consommation du lait et des produits laitiers n'est connue avec précision que pour les pays développés. Par contre, la FAO dispose pour tous les pays des statistiques sur les quantités disponibles, par personne et par an, de lait et produits laitiers (le beurre étant exclu) exprimés en équivalent lait, ainsi que la quantité disponible de beurre (FAO, 1998). Les données sont rapportées sur le tableau n° 6 ; annexe II.

Cette consommation est davantage représentée sur la carte ci-dessous.



Carte n° 1 : Niveau de consommation apparente de produits laitiers en 2010 (kg par habitant) (Source CNIEL / FAO, 2011)

Selon le CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière) et la FAO (2011), La production laitière, dans le monde, est répartie inégalement avec une dominance pour l'Asie et l'Europe qui représentent 67% de la production mondiale, le reste des proportions est partagé entre l'Amérique, l'Afrique et l'Australie. La carte ci-dessous montre les variations de la production mondiale du lait.



Carte n° 2 : Répartition géographique de la production mondiale en 2010 (millions de tonnes) (Source CNIEL / FAO, 2011).

En ce qui concerne la consommation du lait reconstitué, les usines de reconstitution sont en majorité implantées dans les pays en développement qui, grâce à leurs ressources naturelles, ont une population dont le pouvoir d'achat et le nombre augmentent rapidement. En outre, dans beaucoup de ces pays, des créations d'élevage ont démontré aux responsables locaux qu'il leur en coûterait toujours sensiblement plus cher de produire du lait frais chez

eux que d'importer de la poudre pour la reconstitution. Ceci s'est vérifié aussi bien en Afrique du Nord qu'en Egypte et que dans tout le Moyen-Orient (Apria, 1980).

1.4.2. En Algérie

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb et le second pays au monde importateur de lait et de ses dérivés avec un marché annuel estimé, en 2004, à 1,7 milliard de litres (Benelkadi, 2007) plus de trois milliards de litres en 2007 (Griffoul, 2007 ; Mamart , 2007) et une consommation moyenne de l'ordre de 115 l par habitant et par an en 2010 (Ghazi et Niar, 2011).

La production locale est évaluée à un peu moins de deux milliards de litres (Mamart , 2007), l'Algérie est donc contrainte d'importer des quantités massives de lait, dont la plus grande partie sous forme de lait de poudre qui coûte de plus en plus cher (Griffoul, 2007). Le manque est donc énorme; ainsi, le pays a adopté une politique d'importation des vaches laitières, mais celles-ci ne parviennent pas à donner les résultats escomptés (Ghazi et Niar, 2011).

Selon l'Office National Interprofessionnel de Lait (ONIL), des subventions sont accordées par l'Etat à l'éleveur : 12 DA/litre pour le producteur, 5 DA/litre pour le collecteur et 4 DA/litre pour les laiteries (El Watan, 2012).

En Algérie, le lait occupe une place importante dans la ration alimentaire car il représente la principale source de protéines d'origine animale, en 1990 par exemple, on estime que le lait a compté pour 65,5 % dans la consommation de protéines d'origine animale, devançant largement la viande (22,4 %) et les œufs (12,1 %). Cela est du surtout au coût car un gramme de protéines à partir du lait coûte huit fois moins cher que la même quantité à partir de la viande ; en terme énergétique, une calorie obtenue à partir de la viande est vingt fois plus chère que celle du lait (Amellal, 1995).

1.5. Filière lait en Algérie

On appelle filière un système économique qui consiste en un réseau de distribution et d'approvisionnement utilisé par tous les producteurs d'un même produit ou type de produits, en concurrence sur un marché de consommation (Lagrange, 1989). Elle vise à valoriser le potentiel d'une matière première fournie par l'agriculture en les transformant en produits finis à forte valeur ajoutée (Adrian *et al.*, 1995 ; Cazet, 2007).

La filière lait en Algérie se trouve actuellement dans une phase critique, face à une production locale insuffisante, aggravée par un taux de collecte très faible et une

augmentation des prix de la matière première sur les marchés internationaux. La production laitière en Algérie, régulièrement croissante depuis les années 80, est très faiblement intégrée à la production industrielle des laits et dérivés (Bencharif, 2001).

En Algérie, la filière s'articule autour de trois maillons principaux :

- En amont, une grande diversité d'élevages bovins,
- les organismes de collecte et de transformation à la fois étatiques et privés,
- les systèmes de mise en marché et les consommateurs.

L'émergence en amont d'un élevage laitier en mesure d'assurer les approvisionnements nécessaires conséquents en lait, représente la principale condition pour le développement de cette filière (Belhadia *et al.*, 2009 ; Cherfaoui, 2003).

1.6. La poudre de lait

La poudre de lait est constituée essentiellement de matière sèche de lait et d'une très faible quantité d'eau (de 2 à 4 %) lui permettant de se stocker et se transporter aisément; et de s'utiliser après reconstitution pour la préparation de nombreux produits: laits liquides de consommation, laits fermentés, fromages (FAO, 1998).

1.6.1. Qualité de la poudre de lait

Afin de répondre aux qualités requises, une bonne poudre de lait doit avoir une aptitude à la reconstitution de façon à obtenir facilement un liquide homogène, exempt de particules macroscopiques. Elle est sous la dépendance des propriétés de mouillabilité, de dispersibilité et de solubilité.

Elle doit être aussi exempte de saveurs anormales (goût de cuit, de brûlé, de rance, etc.) ainsi que de germes pathogènes (salmonelles, staphylocoques), de toxines et de micro-organismes capables de nuire à sa conservation ou à son utilisation.

Elle ne doit pas contenir de substances anormales (antibiotiques) et de résidus divers provenant des conditions de production, de récolte et de conservation du lait initial.

Enfin une absence de modifications de la structure et de la composition physicochimique, pouvant nuire à sa valeur nutritionnelle et à ses aptitudes technologiques, est requise.

Ces qualités dépendent de la qualité du lait cru mis en œuvre et des traitements subits au cours de la fabrication (FAO, 1998).

1.6.2. Méthodes de préparation de la poudre de lait

La méthode de fabrication du lait en poudre permet de le conserver sous un volume réduit et d'en faciliter ainsi le report et l'usage dans le temps et dans l'espace. Elle est obtenue par chauffage et dessiccation. Un simple apport d'eau permet de reconstituer le lait liquide initial.

Après les traitements d'épuration, de standardisation, de pasteurisation ou de préchauffage à haute température, Les étapes de base de la fabrication de lait en poudre sont constituées de l'évaporation et du séchage (FAO, 1998).

1.6.2.1. Traitements thermiques et évaporation

Le traitement thermique a parmi ses objectifs d'inactiver tous les germes pathogènes et réduire le nombre de germes global, d'inactiver les enzymes, les lipases en particulier et d'inactiver les groupes thiols dans la β -lactoglobuline afin d'élever la stabilité de l'oxydation de la poudre durant le stockage.

Il faut privilégier les processus à haute température et de courte durée car cela permettra d'obtenir les effets recherchés d'une manière à augmenter les substances oxydantes. De même, la solubilité de la poudre est meilleure lors de l'utilisation d'un processus à haute température et de courte durée. Souvent, on chauffe à 88-95°C pendant 15-30 secondes, parfois à des températures pouvant atteindre 130°C. Ensuite, le lait passe dans l'installation d'évaporation. Sous vide, l'eau est évaporée avec ménagement à une température de 45-75°C jusqu'à ce qu'une concentration de 33-35% respectivement 40-50% de la matière sèche du lait soit atteinte. Le premier domaine s'applique au séchage sur cylindres et le deuxième au séchage par atomisation.

1.6.2.2. Séchage

On utilise principalement deux techniques différentes ; le séchage sur cylindres et le séchage par atomisation.

1.6.2.2.1. Séchage sur cylindres

Un concentré de lait de 30-35% de matière sèche est appliqué sous la forme d'une couche fine sur les cylindres de séchage en train de tourner. Ceux-ci sont chauffés à l'intérieur avec de la vapeur et présentent une température pouvant aller jusqu'à 145°C. En moins de 3 secondes, on atteint une teneur d'eau résiduelle de 4% seulement et le lait séché est raclé par les couteaux de cylindres.

1.6.2.2.2. Séchage par atomisation

C'est la méthode de séchage la plus souvent utilisée pour le lait en poudre. Dans ce cas, on insuffle de l'air filtré très chaud ayant une température de 150-300°C. Cela permet d'effectuer un séchage avec ménagement. Lors de la pulvérisation, il se forme de petites gouttelettes rondes qui conservent leur forme durant le processus de séchage. C'est la raison pour laquelle la poudre obtenue par séchage par atomisation présente des particules sphériques.

1.6.2.3. Emballages et stockage

Afin de conserver la qualité du lait en poudre, un emballage approprié est important. Il doit protéger le lait en poudre contre l'humidité, la lumière et les souillures. A cet effet plusieurs matériaux sont utilisés comme le papier avec une couche bitumée, les cartons multicouches, les boîtes avec un intérieur en polyéthylène, les tonneaux en métal avec un intérieur en polyéthylène et les boîtes avec des couvercles de feuille mince d'aluminium.

Il est possible de prolonger la durée de conservation en retirant l'oxygène à l'aide d'une atmosphère protectrice de gaz ou d'emballage sous-vide. Le lait en poudre est stocké à température ambiante. Le lait entier en poudre peut être conservé moins longtemps que le lait écrémé en raison de la possible oxydation de la matière grasse (FAO, 1998).

1.6.3. Le lait reconstitué et le lait recombinaison

1.6.3.1. Définitions

Avezard et Lablee (1990), ont défini indépendamment la reconstitution et la recombinaison comme suit:

La recombinaison : c'est l'opération qui consiste à mélanger dans une eau convenable les différents composants du lait pour réaliser un produit le plus proche possible du lait initial. Les trois composants essentiels sont l'eau, la poudre de lait écrémé spray et la matière grasse laitière anhydre. Dans certains cas quelques adjuvants complémentaires sont utilisés.

La reconstitution : c'est l'opération qui consiste à diluer dans une eau convenable une poudre spray grasse, elle peut aussi correspondre à reconstituer un lait écrémé.

L'arrêté interministériel du 18 août 1993, publié sur le journal officiel algérien, relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation a donné les définitions suivantes pour le lait reconstitué et le lait recombinaison :

Le lait reconstitué est dit :

- Ecrémé, en cas d'utilisation de lait en poudre écrémé extra grade c'est-à-dire titrant moins de 1,25 % de matières grasses,
- Entier, en cas d'utilisation de lait en poudre titrant au moins 26% de matières grasses.

Le lait recombinaison est obtenu par mélange d'eau, de matière grasse et de lait en poudre écrémé extra grade titrant moins de 1.25 % de matière grasse (Ghaoues, 2011).

1.6.3.2. Méthodes de reconstitution et de recombinaison

Elles sont relativement simples et satisfaisantes dans la mesure où l'on tient compte d'un certain nombre de précautions.

la reconstitution, qui consiste à mélanger de l'eau et du lait en poudre écrémé afin d'obtenir un produit dont la teneur en matière sèche est voisine de celle du lait liquide initial (ou conforme à un rapport eau/ matière sèche donnée). La reconstitution peut aussi être la dilution d'une poudre de lait grasse dans de l'eau (Ghaoues, 2011 ; FAO 1998).

La température de reconstitution varie entre 35 et 45 °C. La poudre est versée dans l'eau contenue dans une cuve ou, mieux, dans un tank tout en agitant assez énergiquement pendant 20 à 30 minutes. Afin de permettre une bonne hydratation de la poudre, il faut maintenir le mélange sous agitation à la température de 5 à 10 °C pendant 5 à 12 heures (FAO 1998).

Ensuite il faut procéder à la pasteurisation à la température de 74°C pendant 15 à 20 secondes. La pasteurisation peut être suivie d'un dégazage permettant l'élimination de saveurs anormales de certaines poudres (saveur de vieux) (FAO, 1998).

La recombinaison, qui consiste à ajouter à l'eau et à la poudre de lait de la matière grasse laitière anhydre (MGLA), de façon à obtenir un lait entier ou partiellement écrémé présentant à la fois les rapports eau/matière sèche totale et matière grasse/matière sèche dégraissée conformes au produit désiré (Ghaoues, 2011 ; FAO, 1998).

Dans le cas de la préparation du lait recombinaison l'apport de matière grasse se fait:

- Soit directement dans le lait reconstitué (écrémé) après fluidification de la MGLA par réchauffage vers 38-42 °C. Le mélange est ensuite agité à la température de 55 à 65 °C puis homogénéisé sous une pression d'environ 250 bars;
- Soit sous forme d'une crème à 20-30 pour cent de matière grasse obtenue par mélange de lait écrémé et de MGLA chauffé à 55-65 °C et homogénéisée dans un appareil à deux étages, le premier opérant à 200 bars environ et le second à 50 bars (FAO, 1998).

2. Les causes de contamination du lait par les résidus d'antibiotiques

Le traitement des mammites représente la principale cause de contamination du lait par les antibiotiques (Sraïri *et al.*, 2004), plusieurs causes peuvent ainsi être incriminées :

2.1. Les erreurs commises par l'éleveur

Nombreuses sont les fautes commises par les éleveurs pouvant engendrer la contamination du lait par les résidus d'antibiotiques, selon Abidi (2004) :

- Un mélange accidentel du lait d'une vache traitée avec celui des autres vaches,
- Une traite, par erreur, d'une vache tarie, récemment traitée par des antibiotiques,
- Une désinfection défectueuse de la machine à traire,
- Une non-vérification de l'ancien traitement administré aux vaches en lactation récemment achetées,
- Un mélange accidentel de l'aliment médicamenteux avec la ration des vaches.

2.2. La mauvaise utilisation du médicament

Selon ces auteurs (Gedilaghine, 2005 ; Abidi, 2004 ; Brouillet, 1994) cela s'articule autour du :

- Non-respect de la dose, car l'augmentation de cette dernière est à l'origine de l'allongement de la durée d'élimination du médicament,
- Non-respect de la voie d'administration,
- Utilisation d'une préparation destinée à une vache tarie dans le traitement d'une vache en lactation.

2.3. Le non respect du délai d'attente

Selon les auteurs cités ci-après (Abidi, 2004 ; Brouillet, 1994 ; Gedilaghine, 2005), le non respect du délai d'attente peut être dû à un :

- Défaut de communication entre médecin vétérinaire et éleveurs,
- Acte volontaire de la part de l'éleveur par ignorance des risques réels de ce geste.

2.4. La contamination par le matériel de traite

Par défaut de nettoyage après la traite des vaches traitées (Brouillet, 1994 ; Abidi, 2004).

2.5. L'absence d'identification des animaux (Abidi, 2004 ; Brouillet, 1994 ; Gedilaghine, 2005).

2.6. La mauvaise hygiène lors de la traite

Le lait peut être contaminé par les souillures fécales contenant des antibiotiques excrétés par voie digestive (Labie, 1981).

2.7. L'adjonction volontaire d'antibiotiques dans le lait

Après la traite, dans le but d'inhiber le développement de la microflore et d'améliorer la qualité bactériologique du produit (Labie, 1981).

3. Les mesures destinées à prévenir la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait

Afin de prévenir l'apparition des résidus d'antibiotiques dans le lait, des mesures sont à entreprendre tels :

3.1. L'identification des animaux traités

Cela repose sur la bonne tenue du registre d'élevage, le marquage des animaux traités et des animaux sains (Gedilaghine, 2005 ; Fabre et Lepoutre, 2002 ; Laurentie et Sanders, 2002 ; Bouillet, 1994).

3.2. Le respect des mesures hygiéniques au cours de la traite

Cela passe par un ensemble de points à respecter tels l'établissement d'un ordre de traite en traquant en dernier les animaux traités, en utilisant un matériel adéquat réservé à ces animaux (Gedilaghine, 2005), il faut aussi éviter de faire passer dans le tank le lait d'une vache traitée car il représente la principale cause de contamination (Abidi, 2004), et en cas de traitement d'un seul quartier atteint de mammite, le lait des quatre quartiers doit être éliminé. Enfin le lait des vaches sous traitement et pendant la période inférieure au délai d'attente doit être recueilli séparément et son élimination doit se faire dans les règles (Abidi, 2004 ; Fabre et Lepoutre, 2002).

3.3. Le respect du délai d'attente

Le délai d'attente doit être respecté, il est calculé pour un schéma thérapeutique précis, en respectant les règles d'administration des antibiotiques (Abidi, 2004).

3.4. Le respect de la réglementation et des exigences de l'AMM

En respectant la voie d'administration, dose, délai d'attente (Federicci-Mathieu, 2000 cité par Gedilaghine, 2005 ; Abidi, 2004). Lors des traitements hors AMM (Autorisation de la Mise sur Marché) par changement de la durée de traitement ou de la dose, le délai d'attente doit impérativement être modifié en prenant une marge supplémentaire de sécurité (Fabre et Lepoutre, 2002 ; Faroult et Alno, 1999 cité par Gedilaghine, 2005 ; fabre *et al.*, 2000).

3.5. Limiter la surmédication des élevages et favoriser les actions sanitaires et hygiéniques

Cela passe par le raisonnement des traitements au tarissement et, quand les conduites zootechniques et hygiéniques le permettent, mettre en place avec l'éleveur des traitements sélectifs : les antibiotiques devraient peut-être être moins automatiques et réservés aux seules vaches infectées en fin de lactation, et ce d'autant plus que la prévention des nouvelles infections des vaches saines peut être effectuée grâce à de nouvelles spécialités dépourvues d'antibiotiques (Federicci-Mathieu, 2000 cité par Gedilaghine, 2005).

Enfin détecter les antibiotiques dans le lait grâce aux tests rapides en cas de doute ou lorsque le délai d'attente est difficile à établir (Faroult et Alno, 1999 cité par Gedilaghine, 2005).

4. Mesures destinées à éliminer les résidus d'antibiotiques dans le lait

Certes, des alternatives existent ; Différentes méthodes permettent d'assainir le lait et éliminer les résidus d'antibiotiques (Form, 2003) :

4.1. Le traitement thermique

Le chauffage du lait permet d'éliminer une partie des résidus, mais tous les antibiotiques n'ont pas la même thermolabilité et ne sont pas tous détruits par les procédés de diminution de charge microbienne mis en œuvre dans les industries laitières (pasteurisation, stérilisation). Des paramètres plus élevés augmenteraient fortement le prix de revient et modifieraient les propriétés technologiques du lait (dénaturation des protéines).

4.2. Le traitement enzymatique

L'utilisation de pénicillinases a été envisagée, mais elle est très coûteuse et n'est efficace que sur les résidus de pénicillines.

4.3. L'utilisation de bactéries sélectionnées pour leur antibiorésistance

L'augmentation de la résistance d'une bactérie à un antibiotique donné, ou à une autre famille d'antibiotique donnée, s'accompagne inévitablement de la détérioration d'autres de ses qualités, par ailleurs, cette méthode ne supprime pas le risque de santé publique posé par les inhibiteurs.

Au final, ces techniques sont onéreuses, pas toujours très fiables, et de ce fait sont rarement mises en œuvre par les industries laitières (Form, 2003).

Chapitre III : Les résidus d'antibiotiques « notions & risques »

L'antibiotique destiné à l'animal est un médicament au même titre que celui destiné à l'homme. Les deux sont soumis à une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) mais le médicament vétérinaire a une exigence supplémentaire ; la fixation d'un temps d'attente. L'utilisation des antibiotiques pourrait amener à une présence anormale de résidus dans les denrées d'origine animale (Follet, 2007 ; Oliveira *et al.*, 2006 ; Moretain, 2000). Ainsi selon Moretain (2000) et Rexach et Petransxiene (1987), les résidus d'antibiotiques dans le lait peuvent causer des problèmes à deux niveaux :

- Hygiénique : toxicité des résidus pour le consommateur.
- Technologique : entrave la transformation industrielle du lait.

1. Les résidus d'antibiotiques

1.1. Origine des résidus d'antibiotiques

Les modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin sont très bien codifiées : le praticien de terrain peut y avoir recours pour prévenir ou guérir une infection bactérienne clairement identifiée (Chatellet, 2007). Néanmoins, selon Schwarz et Kehrenberg *et al.* (2001), ces antibiotiques peuvent être utilisés de quatre façons différentes, avec des objectifs différents :

- **A titre thérapeutique curatif**, avec comme objectifs d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades, d'empêcher l'excrétion bactérienne dans les produits (viandes, lait) et d'éviter la contamination humaine lors d'infections zoonotiques (Kantati, 2011 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Phillips *et al.*, 2004 ; König *et al.*, 1998 ; Zanditenas, 1999).

- **En métaphylaxie** pour empêcher la contamination de tous les animaux d'un lot d'élevage, lorsqu'une infection se déclare chez quelques animaux ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes (Kantati, 2011 ; Maillard, 2002).

- **A titre préventif** pour empêcher l'apparition des signes cliniques d'une infection bien connue et récurrente à des périodes de la vie des animaux, ou encore pour compenser des conditions d'hygiène défavorable (Kantati, 2011).

- **En tant qu'additifs alimentaires** : les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance afin d'améliorer la productivité des élevages (Sanders, 2005 ; Bories et Louisot, 1999). Cependant depuis l'année 2006 l'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue

améliorer la croissance et les performances des animaux est banni dans l'union européenne (Kantati, 2011 ; Guillemot, 2006).

1.2. Définition des résidus

Les résidus sont définis comme toutes substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après administration des médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux et susceptibles de nuire à la santé humaine (Laurentie et Sanders, 2002).

1.3. Évaluation de la toxicité des résidus

Deux méthodes d'évaluation de la toxicité des résidus peuvent être employées :

- l'étude toxicologique des différents métabolites d'un médicament (dont le médicament lui-même), en se basant principalement sur la notion de la Dose Sans Effet (DSE).
- et l'étude de la « toxicité de relais ».

1.3.1. Méthode d'évaluation de la dose sans effet d'un principe actif

La DSE d'un principe actif est la dose expérimentale maximale, qui administrée régulièrement per os pendant un temps suffisamment long n'entraîne aucune manifestation toxique chez l'espèce la plus sensible, selon des critères cliniques, biochimiques et anatomopathologiques (Stoltz, 2008). Les résultats sont ensuite extrapolés à l'homme (Puyt, 2003 ; Laurentie et Sanders, 2002 ; Delatour, 1981).

1.3.2. Dose sans effet et « toxicité de relais »

Cette méthodologie considère l'animal de rente traité comme un relais au cours duquel le principe actif antibiotique initial peut subir de multiples transformations. Un deuxième animal est utilisé pour jouer le rôle de consommateur : il ingère les denrées provenant de l'animal relais (Dziedzic, 1988). Ce type de protocole reproduit ainsi les circonstances naturelles de consommation des résidus (Stoltz, 2008).

Partant de cette DSE on peut calculer la Dose Journalière Admissible (DJA) (Stoltz, 2008 ; Fabre *et al.*, 2006 ; Moretain, 2000).

1.3.3. La dose journalière acceptable (DJA)

À partir de la dose sans effet, on détermine une dose journalière acceptable (DJA) pour l'homme en divisant la dose sans effet par un facteur de sécurité arbitraire de 100 à 1 000, selon la nature des effets expérimentaux observés. Cette dose journalière acceptable, exprimée en mg/kg par jour, représente

la quantité totale de substance que l'homme peut ingérer chaque jour pendant toute sa vie sans qu'il en résulte de problèmes pour sa santé (Puyt, 2003 ; Laurentie et Sanders, 2002 ; FAO-OMS, 1995 ; Delatour, 1981).

2. La limite maximale des résidus (LMR)

La fixation des LMR est obligatoire pour tous les principes actifs qui entrent dans la composition des médicaments administrés aux animaux de production. Elle signifie que le potentiel toxique du médicament est parfaitement connu et que le consommateur n'encourt aucun risque si le délai d'attente est respecté et donc si les LMR ne sont pas dépassées (Puyt, 2003).

2.1. Définition

C'est la concentration maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire considéré, comme sans risque sanitaire pour le consommateur, et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les denrées alimentaires (Fabre *et al.*, 2006 ; Abidi, 2004 ; Laurentie et Sanders, 2002). Elles sont calculées en prenant compte de la santé du consommateur ; le risque toxicologique, le risque microbiologique sur la flore digestive humaine et surtout le risque économique d'inhibition de la transformation du lait (Fabre *et al.*, 2006 ; Verhnes et Vandaele, 2002 ; FAO-OMS, 1995 ; Brouillet, 1994).

2.2. Réglementation

2.2.1. La législation européenne

En Europe, les résidus de médicaments sont réglementés essentiellement par la directive 2001/82/EC et le règlement du conseil 2377/90 (Robb, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005 ; Gatermann et Bruns, 2004 ; Cinquina *et al.*, 2003 ; Maghuin-Rogister *et al.*, 2001).

Dans ce document de référence, on trouve environ 700 substances ou classes de composés dont près de 200 sont soumises aux LMR, les 500 autres composés n'y sont pas associés. Une tolérance zéro est appliquée à dix résidus interdits à l'intérieur de l'union européenne dont le chloramphénicol, les nitrofuranes, les nitroimidazolés, les dimetridazoles, les metronidazoles et les ronidazoles. Les autres substances non explicitement mentionnées sont interdites (Gatermann et Bruns, 2004).

Selon ces auteurs (Romnée, 2007 ; Berthe *et al.*, 2006 ; Aguin-Rogister, 2005), le règlement CEE n° 2377/90 de la communauté européenne définit les limites maximales de résidus et comporte quatre annexes :

- annexe I : substances à LMR définitive.
- annexe II : substances sans risques (LMR inutile).
- annexe III : substances à LMR provisoire.
- annexe IV : substances interdites (risque pour le consommateur).

Le tableau 7 ; annexe II représente les LMR en Europe des principales molécules d'antibiotiques susceptibles d'être trouvées dans le lait. Le tableau 8 ; annexe II démontre une comparaison entre les LMR de l'Europe, des états unis et du codex alimentarius.

2.2.2. La législation algérienne

La législation algérienne dans sa définition du lait, dans l'article 6 de l'arrêté interministériel (le ministère de l'économie, le ministère de l'agriculture et le ministère de la santé et de la population) du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation (Anonyme, 1993), mentionne le fait qu'un lait propre à la consommation humaine ne doit pas contenir des résidus d'antibiotiques mais ne précise pas explicitement des limites maximales de résidus .

NB

La fixation des LMR restent très diverses, par exemple la FDA a fixé des niveaux d'inquiétudes pour les résidus de l'oxytétracycline à 30 ng/mL. Une étude en 2007 a publié qu'aux États-Unis, la limite maximale de résidu de tétracycline devrait être de 2 ppm dans les muscles et 6 ppm dans le foie (Moats, 2000 cité par Ziadi, 2010). Or, la limite maximale de tétracycline serait de 100 ng/mL dans le lait et la viande pour les pays de l'Union Européenne (Chris et al., 1999 cité par Ziadi, 2010).

3. Le délai d'attente

3.1. Définition

Selon la directive 81/851/CEE émise par la communauté européenne, le temps d'attente est défini comme le délai entre la dernière administration à l'animal de l'antibiotique et le moment où celui-ci ne présente plus de résidus dans ses tissus ou dans ses productions (lait, œuf) (Follet, 2007 ; Guillemot, 2006 ; Abidi, 2004 ; Anonyme, 2003 ; Puyt, 2003 ; Ryckaert *et al.*, 2003 ; Laurentie et Sanders, 2002). Il est établi pour un schéma thérapeutique bien précis : espèces animales concernées, dose, rythme d'administration, voie d'administration, durée du traitement, etc. (Moulin, 2007 ; Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Brouillet, 1994).

Le respect de ce temps d'attente permet de commercialiser les denrées qui présentent des concentrations inférieures ou proches de la limite maximale des résidus garantissant la protection de la santé du consommateur (Moulin, 2007 ; Abidi, 2004 ; Ryckaert *et al.*, 2003 ; Laurentie et Sanders, 2002).

3.2. Méthodes de calcul du temps d'attente dans le lait

Le calcul du temps d'attente est fondé sur le principe que dans 95 pour cent des groupes d'animaux traités, 95% des individus produisant un lait avec une concentration

inférieure à la LMR, cependant le risque d'avoir une concentration dans le lait supérieure à la LMR n'est pas nulle mais reste sans danger pour le consommateur (Stoltz, 2008 ; Fabre et Lepoutre, 2002 ; Laurentie et Sanders, 2002 ; Sachot et Puyt, 2001).

3.2.1. La méthode simple de calcul

C'est la méthode traditionnelle où les animaux sont abattus à différentes dates après la dernière administration effectuée selon un schéma prévu dans la demande de l'AMM. Les résidus sont dosés dans les différents tissus, la date d'abattage la plus proche pour laquelle toutes les concentrations résiduelles sont inférieures aux LMR, additionnée d'une marge de sécurité (souvent de l'ordre de 30%), détermine le temps d'attente. Ce principe simple présente cependant des limites car il est peu reproductible (l'augmentation du nombre d'animaux allonge le temps d'attente) (Sachot et Puyt, 2001).

3.2.2. La méthode européenne de calcul

Largement inspirée des pratiques de l'agence américaine Food and Drug Administration (FDA), le principe de détermination statistique des temps d'attente repose sur l'hypothèse que les quantités de résidus dans les tissus décroissent à vitesse constante. En utilisant la formule suivante : $C_t = CO e^{-kt}$.

C_t étant la concentration résiduelle au temps t , CO étant la concentration résiduelle virtuelle au temps $t = 0$ et k étant la constante de la vitesse d'élimination (Sachot et Puyt, 2001).

3.3. Expression du délai d'attente

Initialement, le délai d'attente était exprimé sous forme d'un nombre de traite à éliminer avant de pouvoir commercialiser le lait.

Actuellement : compte tenu des différents types de traites rencontrées, il est exprimé en multiple de 12 heures, par conséquent, il est exprimé en heures ou en jours éventuellement.

Le temps d'attente est noté « zéro » lorsqu'il n'est pas nécessaire d'éliminer le lait après un traitement (Laurentie et Sanders, 2002).

4. Les problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait

Les problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques sont d'ordre sanitaire et technologique.

Il faut toutefois distinguer la notion d'inhibiteurs qui correspond à un problème technologique et la notion de résidus qui correspond à un problème de santé publique (Fabre *et al.*, 2002).

4.1. Les problèmes sanitaires

4.1.1. Problèmes d'allergie

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particulier des bêta-lactames (car ces derniers sont à la fois très immunogènes et souvent utilisés (Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Boatto *et al.*, 1998 ; Pepin et Boudene, 1977). Cependant, compte tenu du très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotiques administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu (Châtaigner et Stevens, 2005 ; Brouillet, 1994 ; Burgat-Sacaze, 1981 ; Labie, 1981).

Cependant des cas d'allergies aux résidus de pénicilline dans les aliments d'origine animale ont été scientifiquement prouvés, ceux-ci restent extrêmement rares ; quelques cas seulement d'allergie à la pénicilline suite à la consommation des produits laitiers, ont été déclarés dans le monde depuis plusieurs décennies (Federicci-Mathieu, 2000).

Les réactions allergiques ont été observées chez des personnes déjà sensibilisées, (Gedilaghine, 2005 ; Cinquina *et al.*, 2003 ; Maghuin-Rogister *et al.*, 2001 ; Burgat-Sacaze, 1981 ; Pepin et Boudene, 1977), suite à la consommation de denrées d'origine animale (Jeon *et al.*, 2008). D'autant plus qu'ils réunissent plusieurs conditions pouvant donner lieu à des manifestations de type allergique (Fiscus-Mougel, 1993) (concentrations très faibles, administration par voie orale, et exposition occasionnelle et discontinue (Stoltz, 2008 ; Fiscus-Mougel, 1993).

Avec la pénicilline par exemple, chez des sujets déjà sensibilisées, des doses de 0.03 UI/ml dans le lait peuvent être suffisantes pour entraîner des réactions allergiques type : urticaires, dermatoses, prurit, choc, etc (Pepin et Boudene, 1977).

Les antibiotiques les plus souvent incriminés sont les pénicillines, suivis des sulfamides et, dans une moindre mesure les tétracyclines ou la spiramycine (Gedilaghine, 2005).

4.1.2. Problèmes toxiques

4.1.2.1. Toxicité directe

La toxicité directe des résidus d'antibiotiques est assez difficile à mettre en évidence car il s'agit en générale de toxicité chronique. Cette dernière ne s'exprime qu'après consommation répétée de denrées alimentaires contenant des résidus du même antibiotique. Certains scientifiques évoquent alors une possible toxicité hépatique (Jeon *et al.*, 2008 ; Stoltz, 2008). Elle est donc dans l'ensemble extrêmement limitée, le cas de toxicité potentielle fréquemment cité est celui du chloramphénicol (Guy *et al.*, 2004 ; Maghuin-Rogister *et al.*, 2001 ; Fabre et Joyes, 2000) qui a été responsable d'anémies aplasiques chez l'homme (liées à

son utilisation en médecine humaine) (Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Guy *et al.*, 2004 ; Labie, 1985 ; karst, 1984 ; Mihaud, 1981 ; Labie, 1981).

L'utilisation vétérinaire de cette molécule est désormais interdite un peu partout dans le monde (Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Guy *et al.*, 2004 ; Maghuin-Rogister *et al.*, 2001 ; Labie, 1985 ; karst, 1984).

4.1.2.2. Risques cancérigènes

Certains antibiotiques ont des propriétés carcinogènes connues. Les résidus de ces antibiotiques peuvent avoir un effet carcinogène sur le long terme, suite à une consommation régulière d'aliments contenant ces résidus. Ces antibiotiques sont alors interdits d'utilisation chez les animaux de production : C'est le cas des nitrofuranes, des nitroimidazoles (Stoltz, 2008).

4.1.2.3. Risques bactériologiques

Le risque bactériologique lié à la consommation de denrées alimentaires contenant des résidus d'antibiotiques peut être attribué à deux phénomènes : la modification de la flore digestive pouvant entraîner des troubles et une symptomatologie indésirables, et la sélection chez l'homme de souches de germes pathogènes résistantes à ces antibiotiques (Gedilaghine, 2005).

4.1.2.3.1. Modifications de la flore digestive du consommateur

Dans le tube digestif vivent en effet des milliards de bactéries saprophytes et commensales (surtout des bactéries anaérobies : bactéroïdes, fusobactérium) (Person, 1981).

La consommation de produits contenant des résidus d'antibiotiques (cycline, sulfamides) perturbe cette flore intestinale (Moulin, 2007 ; Broutin *et al.*, 2005 ; Châtaigner et Stevens ; 2005 ; Fabre et Joyes, 2000 ; Gedilaghine 2005) ; en modifiant sa composition par inhibition sélective ; ils dévastent la flore normale et laissent place à des bactéries pathogènes ou opportunistes tels que les entérobactéries, les pseudomonas, les entérocoques, les staphylocoques et les levures (Stoltz , 2008 ; Abidi, 2004 ; Corpet et Brugere, 1995 ; Person, 1981), diminuant ainsi l'immunité naturelle préétablie.

Ce déficit immunitaire peut conduire à certains problèmes sanitaires tels qu'une atteinte du système nerveux, des os, des dents (coloration des dents en jaune), du foie, du sang (Broutin *et al.*, 2005 ; Cerniglia et kotarski, 2005), ainsi que l'apparition de bactéries mutantes résistantes aux antibiotiques, engendrant des échecs thérapeutiques (Stolker *et al.*, 2008 ; Moulin, 2007 ; Broutin *et al.*, 2005 ; Corpet et Brugere, 1995 ; Labie, 1981).

4.1.2.3.2. Risques d'antibiorésistances

Par définition, l'antibiorésistance correspond à la capacité d'une bactérie à résister aux effets des antibiotiques (Ziadi, 2010). Elle peut être aussi définie de différentes manières :

- D'un point de vue bactériologique, elle caractérise une souche bactérienne dont la croissance n'est pas inhibée au contact d'une concentration d'antibiotique, empêchant la multiplication de la majorité des autres souches de son espèce (Acar *et al.*, 1989).
- D'un point de vue pharmacologique, la résistance est définie comme l'atteinte au niveau des tissus malades d'une concentration maximale en antibactérien trop faible pour inhiber la croissance bactérienne.
- Enfin, d'un point de vue clinique, une bactérie est résistante si le traitement mis en place par le praticien est inefficace pour traiter l'infection dont elle est la cause (Chatellet, 2007).

Cette résistance peut s'opérer de deux façons ; elle est dite *naturelle* lorsque les espèces de bactéries possèdent naturellement la capacité de résister aux antibiotiques. Elle est dite *acquise* quand les bactéries peuvent développer une mutation génétique aléatoire leur permettant de résister et de continuer à se multiplier (Brouillet, 2011 ; Chatellet, 2007).

Le transfert de plasmides entre des bactéries résistantes et sensibles peut se faire entre des bactéries d'espèces différentes (Okolo, 1986 cité par Stoltz, 2008) ce qui autorise alors des échanges entre les bactéries d'origine alimentaire et les bactéries du tube digestif de l'homme (Van Den Bogaard, 2001 cité par Stoltz, 2008 ; Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Sanders, 2005 ; Martel et Vandaele, 1999). Par ailleurs, il faut souligner que ce ne sont pas les animaux où les humains qui deviennent résistants aux antibiotiques mais bien les bactéries qui les affectent (Follet, 2007 ; Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Broes et Boutin, 2003).

Les mécanismes de résistances des principales familles d'antibiotiques sont détaillés sur le tableau n° 9 ; annexe II.

Une des raisons de l'augmentation de cette résistance pourrait résider dans l'utilisation préventive et thérapeutique d'antibiotiques en production animale (Riantou, 2008 ; Gysi, 2006 ; Cloeckart, 2003 ; Siousarran, 2003 ; Aarestrup, 1999 ; Davies, 1997) car les médicaments vétérinaires contiennent en partie les mêmes matières actives qu'en médecine humaine (Gysi, 2006 ; Sanders, 2005 ; Gaynes et Monnet, 1997).

L'apparition de cette résistance peut être liée à des mauvaises pratiques thérapeutiques (posologie inadaptée, fréquence d'administration, non respect de la prescription) (Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005 ; Maghuin-Rogister *et al.*, 2001) ou à l'utilisation des antibiotiques

comme facteurs de croissance (sous forme d'additifs alimentaires), favorisant ainsi le développement rapide du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Châtaigner et Stevens, 2005 ; Sanders, 2005 ; Bories et Louisot, 1998).

Vu qu'aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'a été découverte depuis les 30 dernières années, les vétérinaires ont tous intérêt à préserver l'efficacité de la ressource antibiotique actuelle pour continuer à bien soigner les animaux. L'OMS et son comité ainsi que le Codex Alimentarius, ont défini une liste d'antibiotiques critiques. La liste est très voisine de celle de la médecine humaine. Parmi les plus importants, citons les Céphalosporines de 3e et 4e génération, les Fluoroquinolones et les Macrolides (Brouillet, 2011).

4.2. Les problèmes technologiques

Les résidus représentent un réel problème pour les transformateurs laitiers par leurs conséquences néfastes sur les fermentations lactiques (Gedilaghine, 2005 ; Brouillet, 2002 ; Maghuin-Rogister *et al.*, 2001 ; Moretain, 2000 ; Gaudin, 1999 ; Bories, 1993 ; Labie, 1981 ; Mourot, 1981 ; Giraudet, 1978) et constituent le problème majeur des accidents de fabrication en industrie laitière (Oliveira *et al.*, 2006 ; Ouellette, 2004 ; Weisen, 1974).

Les bactéries lactiques telles : *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis* (Mietton *et al.*, 1994 ; Bories, 1993 ; Mourot, 1981) jouent un rôle essentiel comme ferment en acidifiant le lait ; ils transforment le lactose du lait en acide lactique entraînant ainsi une baisse du pH (Robb, 2006 ; Mietton *et al.*, 1994)) ce qui permet la précipitation des protéines, le développement des arômes et l'inhibition de flores indésirables (Fabre *et al.*, 2006 ; Abidi, 2004 ; Brouillet, 1994 ; Luquet, 1985).

Les bactéries lactiques sont sensibles à de très faibles doses d'antibiotiques (Brouillet, 2002 ; Fabre et Joyes, 2000), ainsi la présence de résidus d'antibiotiques inhibent de manière partielle ou totale la croissance de ces ferments, se traduisant ainsi par de nombreux défauts de fabrication tels que l'insuffisance de égouttage et les risques de prolifération incontrôlée de germes gazogènes, insensibles aux antibiotiques telles que les Coliformes, Bacillus, Clostridium, Proteus, Aerobacter (Fabre *et al.*, 2006 ; Robb, 2006 ; Gedilaghine, 2005 ; Abidi, 2004 ; Ouellette, 2004 ; Siousarran, 2003 ; Fabre et Joyes, 2000 ; Labie, 1981 ; Mourot et Loussouarn, 1981 ; Anifantakis, 1980 ; Giraudet, 1978 ; Weisen, 1974).

Les fabrications les plus sensibles sont celles où interviennent les ferments lactiques et les germes d'aromatization types : yaourt, fromages à caillage acide et à caillage mixte, crème et beurres maturés (Zinedine *et al.*, 2007 ; Broutin *et al.*, 2005 ; Ryckaert *et al.*, 2003 ; Brouillet, 1994).

Les différents ferments ne sont pas sensibles de la même manière aux différents résidus d'antibiotiques présents dans le lait. Les laits contaminés par la pénicilline posent de sérieux problèmes en laiterie. Dès 0,01 ppm, la production d'arômes cesse, à 0,05 ppm, la fermentation lactique est ralentie de façon significative et à 0,1 à 0,2 ppm l'acidification est arrêtée (Heeschen et Bluthgen, 1990 ; Mourot et Loussouarn, 1981).

Les résidus sont ainsi responsables de grandes pertes financières qui se répercutent tout le long de la filière laitière (Mitchell, 2005 ; Abidi, 2004 ; Fabre et Joyes, 2000 ; Raskin *et al.*, 1997 ; Brouillet, 1994 ; Le Talec, 1981). Exemple : un seul traitement intramammaire peut rendre inutilisable plus de 100 000 litres de lait (Fabre *et al.*, 2006).

En France ce sont les antibiotiques qui représentent la première cause d'inhibiteurs dans le lait (Fabre *et al.*, 2000 ; Fabre *et al.*, 1996) et les pics d'antibiotiques sont dus aux traitements par voie intramammaire plutôt qu'aux traitements par voie générale (Sérieys, 2004).

Chapitre IV : Méthodes de recherche et de confirmation des résidus d'antibiotiques dans le lait

1. Historique et évolution des méthodes de détection

L'utilisation des tests de détection des inhibiteurs est très ancienne, les premiers tests ont été utilisés quelques années après l'apparition des antibiotiques (Brouillet, 2002).

Dès 1952, le premier test de détection des inhibiteurs dans le lait était mis au point. Il était fondé sur l'inhibition du développement de différentes souches de bactéries (Fabre *et al.*, 2002), selon ce dernier, deux voies de recherche ont été explorées :

- Les recherches microbiologiques ont été améliorées en sélectionnant des souches et en modifiant les milieux de culture pour augmenter la sensibilité à certains antibiotiques et élargir le spectre,
- De nouvelles méthodes (immuno-enzymatique, í) ont été mises au point pour diminuer le temps d'analyse.

Le tableau n° 10 ; annexe II, rapporte l'évolution des méthodes de détection dans le temps.

2. Les tests de dépistage

Le dépistage est effectué au moyen d'une méthode d'analyse donnant une indication forte de la présence d'un résidu dans un échantillon (Aghuin-Rogister, 2005). Les tests de dépistage ont pour objectifs de détecter un maximum de substances différentes à un seuil proche ou inférieur à la limite maximale des résidus. Ils doivent aussi permettre de faire rapidement des analyses sur un grand nombre d'échantillons, afin de ne retenir qu'un faible nombre suspect à soumettre à une méthode de confirmation.

Pour le dépistage, les tests microbiologiques présentent l'intérêt d'avoir un spectre large, néanmoins ils présentent des inconvénients tels que le manque de sensibilité à certains antibiotiques et l'éventuelle sensibilité à des inhibiteurs naturels (Fabre *et al.*, 2002).

2.1. Le Delvotest®

C'est un test biologique simple, très utilisé, standardisé, fondé sur la multiplication d'un germe : *Bacillus stearotherophilus var. calidolactis* (Zinedine *et al.*, 2007 ; Reybroeck, 2004 ; Brouillet, 2002 ; Fabre *et al.*, 2000 ; Romnee *et al.*, 1999 ; Brouillet, 1994 ; Billon, 1981).

C'est un test de sélection microbiologique à large spectre, permettant de détecter les résidus de substances anti-infectieuses dans le lait à des niveaux proches des limites maximales des résidus, il est particulièrement sensible vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines et des sulfamides (Romnée, 2009 ; Reybroeck, 2004 ; Verhnes et Vandaele, 2002). Le principal inconvénient de ce test est sa durée d'incubation de 2 h 30 à 3 h (Brouillet, 2002 ; Verhnes et Vandaele, 2002).

Le test se présente sous la forme d'ampoules contenant un milieu géloséensemencé par le germe test (spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), avec un indicateur coloré de pH, du triméthoprim et des comprimés de milieu nutritif à incorporer dans les ampoules au moment de leur utilisation (Romnée, 2009 ; Reybroeck, 2004 ; Abidi, 2004 ; Brouillet, 2002).

Un échantillon de 0,1 mL de lait est laissé à diffuser dans le milieu gélosé, l'ampoule est fermée par un ruban adhésif et placée pendant 2 h 30 à 3 h dans un incubateur à $64 \pm 1^\circ\text{C}$. Si le lait ne contient aucune substance inhibitrice, l'indicateur de pH vire du violet au jaune en raison de la production d'acide par le germe. Mais en présence de substances inhibitrices, la couleur du milieu gélosé reste pourpre (violet) car ces dernières empêchent la croissance du germe et par conséquent la production d'acide lactique (Romnée, 2009 ; Scippo et Maghuin-Rogister, 2006 ; Abidi, 2004 ; Reybroeck, 2004 ; Brouillet, 2002 ; Moretain, 2000 ; Archimbault *et al.*, 1978), les résultats sont présentés sur la figure n° 2.

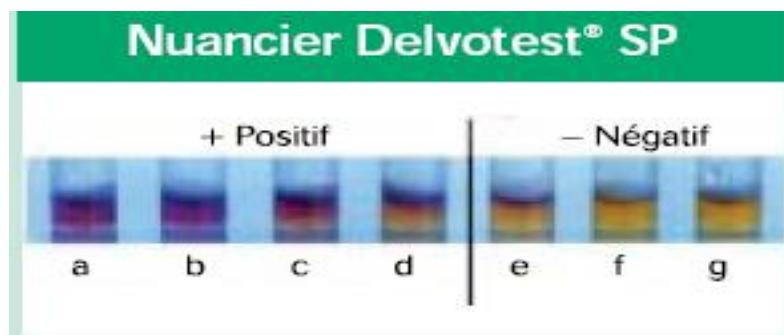


Figure n° 2 : expression des résultats de Delvotest® (Reybroeck, 2004)

Bien que le test détecte certains antibiotiques qu'on trouve dans le lait, comme, la pénicilline G, la cloxacilline, la sulfaméthazine, la sulfadiazine, la céphalexine, la gentamicine, il est moins sensible pour d'autres comme la tétracycline et l'oxytétracycline (Le Breton *et al.*, 2007). Le tableau n° 11 ; annexe II, démontre le seuil de détection des principales familles d'antibiotiques par le Delvotest®.

3. Les méthodes de confirmation

3.1. Méthode immuno-enzymatique « ELISA »

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique rapide (de quelques minutes à 20 minutes) mais onéreuse. Elle est spécifique pour une famille d'antibiotiques et sensible pour cette dernière. Sa limite de détection est souvent inférieure à la limite maximale des résidus (Abidi, 2004 ; Verhnes, 2002).

3.1.1. Historique

A la fin des années 60, Stratis-Avrameas et Pierce mettent au point la technique d'immunoenzymologie, technique d'analyse par réaction entre antigènes et anticorps et utilisant comme marqueur des enzymes (Hanzen, 2008). La technique d'ELISA a été ensuite conceptualisée et développée par deux scientifiques suédois, Perlmann et Engvall à l'Université de Stockholm en 1971.

3.1.2. Principe de la méthode

L'ELISA est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps (Hanzen, 2008).

La méthode est dite directe lorsque, en une étape, on utilise uniquement un anticorps conjugué qui est soumis à incubation avec l'antigène contenu dans l'échantillon. La méthode indirecte en deux étapes utilise un anticorps secondaire conjugué pour la détection. En premier lieu, l'anticorps primaire est incubé avec l'antigène contenu dans l'échantillon. Cette opération est suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire conjugué qui reconnaît l'anticorps primaire (Anonyme, 2012).

3.1.3. Les variantes de la technique ELISA

Les tests ELISA peuvent se réaliser selon deux méthodes :

- Elles sont dites de type "sandwich" quand la couleur développée est proportionnelle à la quantité de molécules à détecter présente dans l'échantillon,
- Et sont dite de type "compétition" directe ou indirecte lorsque la couleur développée est inversement proportionnelle à la quantité présente.

3.1.3.1. Protocole général de la méthode ELISA type sandwich

Dans les ELISA de type « sandwich », l'analyte recherché est capturé par un premier anticorps et détecté grâce à un deuxième anticorps. Ce dernier est marqué au moyen d'une enzyme ; l'analyte est véritablement pris en sandwich entre les deux anticorps (figure n° 3). La réponse est dans ce cas directement proportionnelle à la concentration en analyte dans l'échantillon (Scippo, 2006 ; Anonyme, 2012).

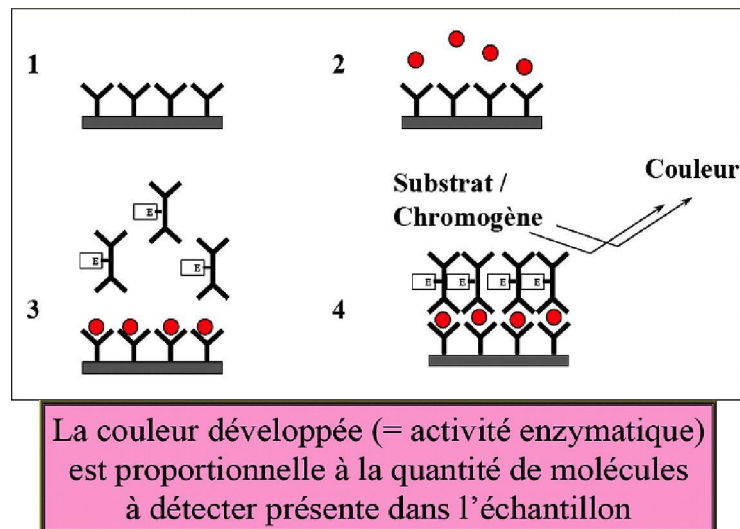


Figure n° 3 : ELISA type "sandwich" (Espinasse *et al.*, 2011).

3.1.3.2. Protocole général de la méthode ELISA compétitive

Les ELISA de type « compétition » et par opposition aux ELISA de type « sandwich », l'antigène est marqué par un enzyme dont l'activité liée aux anticorps peut être mesurée grâce à une coloration correspondant à la transformation du substrat de l'enzyme en produit (figure n° 4) (scippo, 2006).

Le terme compétitif décrit des essais où la mesure implique la quantification d'une substance selon sa capacité à interférer avec un système établi (Anonyme, 2012 ; Espinasse *et al.*, 2011).

Le principe de la méthode repose sur l'ensemble des étapes suivantes :

1. Les plaques à utiliser sont sensibilisées au préalable (adsorption d'une quantité connue de l'antigène voulu sur le fond des puits).
2. Bloquer ensuite tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface (saturation).
3. Appliquer l'échantillon ou les étalons.
4. Les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène sur une microplaque. Les antigènes immobilisés à la surface et les antigènes en solution entrent en

compétition avec les anticorps. Ainsi, plus il y aura d'antigène dans l'échantillon, moins l'anticorps pourra se lier à l'antigène immobilisé.

5. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés) et les complexes anticorps-antigènes non liés.

6. Ajouter un chromogène qui sera converti par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique,

7. enfin, mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène.

Avant l'analyse, les préparations d'anticorps doivent être purifiées et conjuguées (Anonyme, 2012 ; Espinasse *et al.*, 2011).

Pour la méthode indirecte, en plus des étapes précédentes, elle nécessite l'ajout d'un anticorps secondaire, spécifique à l'anticorps primaire, et conjugué avec une enzyme.

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle doit être conjuguée.

Pour ce type de réaction, plus la concentration initiale d'antigène est élevée, plus le signal éventuel est faible (Anonyme, 2012 ; Espinasse *et al.*, 2011).

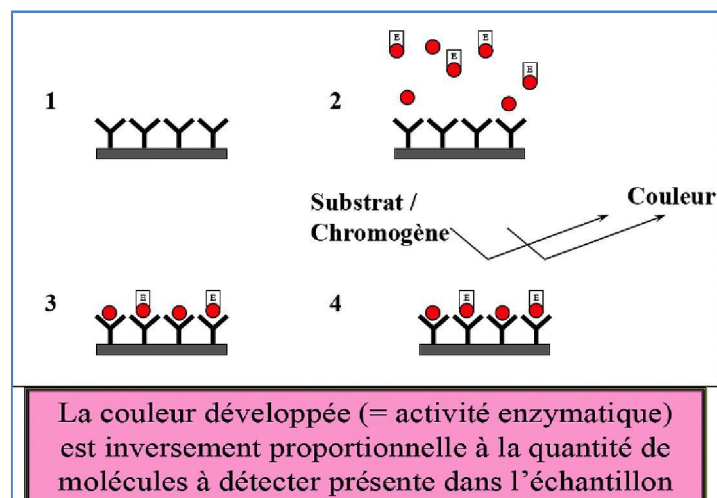


Figure n° 4 : ELISA type "compétition" (Espinasse *et al.*, 2011).

3.1.4. Calculs des résultats

3.1.4.1. Tests semi-quantitatifs

Le résultat est obtenu en comparant la couleur de l'essai à celle d'un témoin de concentration connue. Cette appréciation est visuelle, et se fait sur un fond blanc. Si l'essai est plus coloré que le témoin, il contient moins de concentration que la valeur indicative du

témoin. Pour plus de sûreté, l'appréciation peut se faire à l'aide d'un lecteur de microplaques (Espinasse *et al.*, 2011).

3.1.4.2. Tests quantitatifs

Le principe général consiste à établir une courbe d'étalon avec des solutions contenant des concentrations connues d'Ag. Une série de dilutions successives est fournie dans le kit afin d'obtenir des concentrations finales différentes. Différents modes de représentation peuvent être utilisés pour les courbes d'étalonnage. Pour permettre de calculer plus facilement une concentration, les données sont d'abord transformées de manière à exprimer l'intensité du signal sur une échelle de 0 à 100, la valeur de la densité optique (DO) du point 0 ppm ou ppb (selon le test) correspondant à 100 et les autres valeurs de DO sont exprimées en % de cette valeur (B/Bo %) (Espinasse *et al.*, 2011).

3.2. Méthodes physico-chimiques

Les années 80 ont été marquées par le développement de nouvelles méthodes de dépistage, comme la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Samanidou *et al.*, 2007 ; Fritz, *et al.*, 2007), la chromatographie sur couche mince (TLC) (Zvirdauskiene *et al.*, 2007 ; Pena *et al.*, 2007) et l'électrophorèse. Bien que ces méthodes, produisent des résultats précis du niveau des résidus d'antibiotiques, elles sont cependant, très coûteuses, très lentes, et demandent des compétences techniques spécialisées.

3.2.1. Les méthodes chromatographiques « La chromatographie liquide haute performance (HPLC) »

Une analyse HPLC permet la séparation de composés en solution élués à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile liquide, elle-même percolée grâce à une pression élevée. Il existe une réelle interaction triple entre l'analyte, la phase stationnaire et la phase mobile basée sur l'affinité physico-chimique entre les trois (Burgot et Burgot, 2006 ; Marcoz, 2003).

Cette méthode permet de séparer des composés de masse molaire variables et de nature chimique différente. La HPLC est devenue la première technique analytique présente dans les laboratoires de recherche et d'analyses. Elle couvre tous les domaines d'applications (Saunier et Godin, 2013).

3.2.1.1. Principe

La phase mobile parcourt un tube appelé colonne, cette colonne peut contenir des

granulés poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire.

Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne, ce mélange doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges (Anonyme, 2007).

Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne.

De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injectés se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leur vitesse de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés. Chaque soluté est alors soumis à une force de rétention, exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité, due à la phase mobile (Panaiva, 2006).

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé, il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.

Le principe est donc d'exploiter les interactions entre les solutés et les deux phases (mobile et stationnaire) pour séparer ces solutés en fonction de leurs affinités et ainsi de les identifier et ou de les doser (Panaiva, 2006).

La chromatographie liquide haute performance classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté, phase mobile et phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases en présence (Marcoz, 2003).

3.2.1.2. Instrumentation

Selon les auteurs suivants : Saunier et Godin, (2013), dans tous les appareils de chromatographie liquide haute performance, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre illustrés sur le schéma ci-dessous.

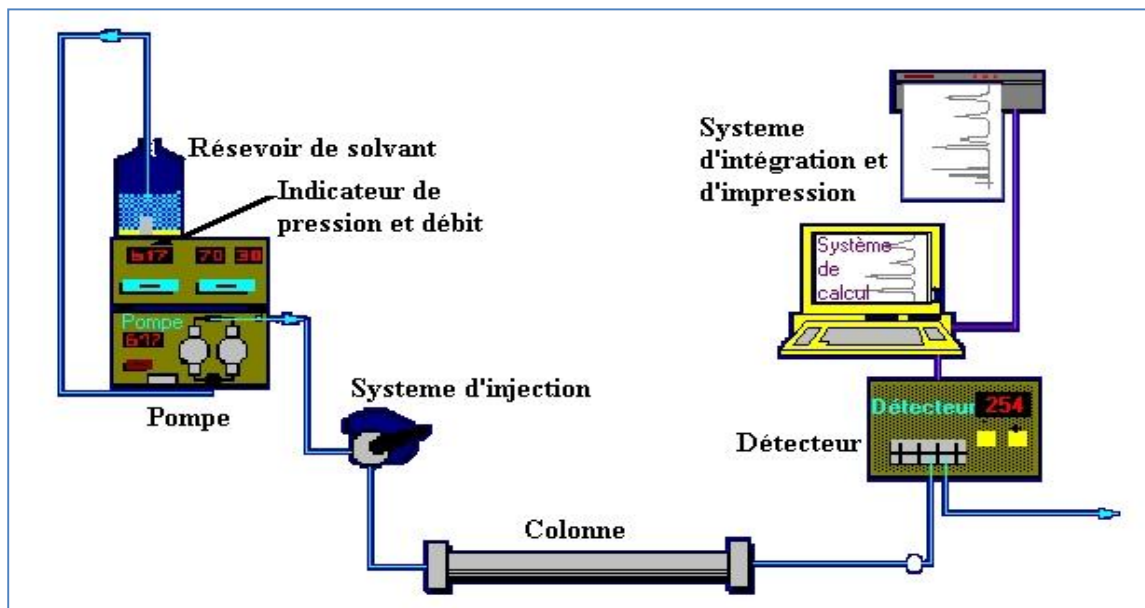


Schéma n ° 1 : instrumentation de l'HPLC (Anonyme, 2007).

3.2.1.2.1. Réservoirs des solvants

Ils contiennent la phase mobile en quantité suffisante, plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide des pompes (Anonyme, 2007).

3.2.1.2.2. Pompes

Les pompes utilisées en HPLC permettent de délivrer les solvants à débit constant sous de fortes pressions pouvant atteindre quelques centaines de bar, dont but est de forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne. Son rôle est double :

D'abord elles permettent le maintien d'un débit constant quelles que soit la pression et la variation de composition de la phase mobile mais aussi d'obtenir un débit suffisant jusqu'à 10 mL/min sans perte d'exactitude et de reproductibilité (Saunier et Godin, 2013).

Les pompes sont munies d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elles permettent donc de travailler en mode isocratique (avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse) ou en mode gradient (une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants). Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min (Anonyme, 2007).

3.2.1.2.3. Injecteur ou vanne d'injection

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes : 10, 20, 50, ... μl . Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, sans variation importante de la pression, dans le circuit allant des pompes vers l'entrée de la colonne ; ce qui est important pour l'analyse quantitative (Anonyme, 2007).

3.2.1.2.4. Colonne

C'est un tube qui doit être en inox ou en verre (inerte aux produits chimiques). Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Il renferme la phase stationnaire qui peut être polaire (phase normale) ou non polaire (phase inverse) (Anonyme, 2007).

Les supports de la colonne sont des solides très finement divisés dont la principale propriété est d'être inerte vis-à-vis des phases stationnaires et mobiles. Le support majoritairement utilisé est le gel de silice formé de grains de diamètre variant de 1,5 à quelques dizaines de micromètres. Ces grains présentent à leur surface des pores de diamètres différents (80 à 300 \AA) à travers desquels la phase mobile circule (Saunier et Godin, 2013).

La phase normale : elle est constituée de gel de silice ; ce matériau est très polaire, il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête.

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations (Anonyme, 2007).

La phase inverse : elle est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (acétonitrile, méthanol, eau). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier.

Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps et la qualité de la séparation est donc maintenue constante (Anonyme, 2007).

3.2.1.2.5. Détecteurs

Placé en sortie de colonne, le détecteur enregistre un signal (électrique ou optique) en fonction du temps caractéristique du passage progressif des solutés.

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

Le détecteur UV-visible : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci étant fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190 à 350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm (Anonyme, 2007).

Selon Saunier et Godin, (2013), pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand,
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

Le réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice.

Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur.

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur, soit d'une station d'acquisition (Anonyme, 2007).

3.2.1.3. Analyses des chromatogrammes

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits, la figure n° 5 montre la différence entre un bon et un mauvais chromatogramme.



Figure n ° 5 : l'analyse qualitative d'un chromatogramme (Anonyme. a, 2006).

Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible, pour cela, il faut préciser pour chaque analyse le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, supporté, la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, son débit, le mode de détection en nm, la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme et la sensibilité du détecteur.

3.2.1.3.1. Analyse qualitative

- le temps de rétention

Le temps de rétention (t_R en min) est une caractéristique de chaque soluté dans les conditions opératoires fixées ainsi l'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire (normale ou à polarité inversée) se répercute sur les temps de rétention des solutés.

Le temps de rétention (t_R) = temps écoulé entre l'injection et le point maximal du pic.

Le temps mort (t_M) = temps écoulé pour qu'un constituant non retenu traverse la colonne (Anonyme. a, 2006).

Le temps de rétention est habituellement utilisé à la place du volume de rétention et sa grandeur dépend de la nature de la phase stationnaire, de la nature de la phase mobile, du débit de la phase mobile, et enfin de la longueur de la colonne (Anonyme, 2007).

3.2.1.3.2. Analyse quantitative

La chromatographie est une technique analytique quantitative, basée sur une relation entre la quantité massique du soluté injecté et l'aire du pic du chromatogramme donné par le détecteur, c'est à dire que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé (Anonyme. a, 2006).

La masse m_i du soluté i détectée est proportionnelle à l'aire A_i du signal mesuré par le détecteur:

$$m_i = K_i \cdot A_i$$

K_i est le coefficient de réponse du détecteur pour le soluté i , il dépend de la colonne utilisée, de la sensibilité du détecteur vis-à-vis du soluté i et des conditions expérimentales.

A_i est l'aire du pic d'éluant du soluté i sur le chromatogramme. Cette aire de pic est déterminée automatiquement grâce à un enregistreur-intégrateur (Anonyme. b, 2006).

Dans la pratique, il faut donc déterminer K_i et A_i pour un soluté i donné dans les conditions d'analyses données (Anonyme. b, 2006).

3.2.1.4. Les avantages de la chromatographie liquide haute performance

La chromatographie en phase liquide présente les avantages suivants :

- elle est utilisée pour des solutés de masse moléculaire élevée, peu volatils, sensibles aux températures élevées. Ces solutés peuvent être non polaires, polaires ou ioniques.
- Elle analyse de très petites quantités, présente une extrême sensibilité, possède un grand pouvoir de séparation et une excellente reproductibilité (Anonyme, 2007)

3.2.1.5. Domaines d'application de la chromatographie liquide haute performance

L'HPLC est une méthode physico-chimique qui permet la détection et la quantification des résidus d'une gamme assez large des antibiotiques s'étendant à toutes les familles utilisées en médecine humaine et vétérinaire. C'est une méthode nettement plus sélective et plus sensible que les méthodes microbiologiques car elle permet d'identifier les molécules séparément et donc éviter les problèmes d'interférences possibles entre les substances (Boatto *et al.*, 1998).

La chromatographie liquide haute performance est reconnue comme une méthode de choix pour l'analyse quantitative des résidus d'antibiotiques dans le lait, la préparation de l'échantillon est habituellement nécessaire afin d'éliminer les composants importuns et d'extraire les antibiotiques présents dans le lait.

Différentes méthodes d'extraction peuvent être appliquées telles que : l'extraction liquide-liquide, l'ultrafiltration, la précipitation des protéines et l'extraction en phase solide (Oliveira *et al.*, 2006).

Partie expérimentale

Objectifs de l'étude

Le manque de réglementation du contrôle des résidus d'antibiotiques dans le lait, nous a fortement motivé pour le choix de ce thème. Le lait, une denrée largement consommée par le citoyen algérien, représente de ce fait un potentiel danger. D'autre par les pertes subies dans les industries laitières se répercutent directement sur l'économie nationale.

Pour ce manque de contrôle, un certain nombre de questions s'imposent : est-ce que le citoyen algérien, et plus particulièrement Constantinois, est à l'abri d'une consommation passive des résidus d'antibiotiques ? Cette contamination vient-elle du lait de vache produit localement ou bien du lait importé ? D'autre part, l'antibiothérapie en élevage bovin, est-elle rationnée ou bien donnée à tort et à travers, compliquant ainsi davantage la situation ?

Pour répondre à ces questions, nous allons développer plusieurs volets relatifs à la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait (plus particulièrement la pénicilline et l'oxytétracycline). Le premier consistera en une enquête faite auprès des vétérinaires praticiens de la région de Constantine, dans le but de cerner la situation de l'antibiothérapie en pratique rurale. Dans le même volet, nous réaliserons également, une enquête sur les laiteries de la région de Constantine afin de connaître la réalité de la production laitière au sens large du terme.

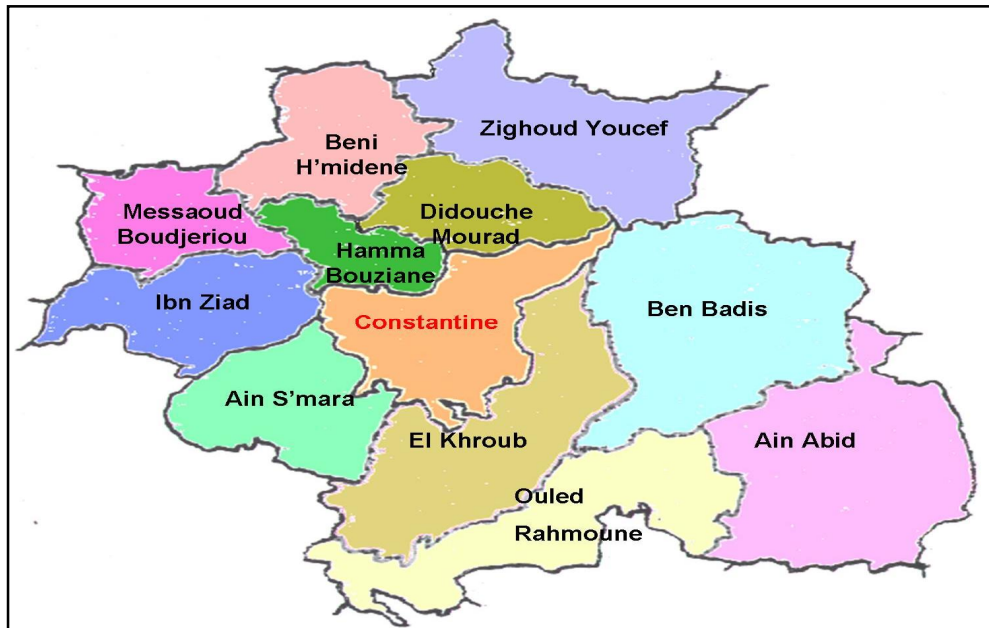
Le second volet sera consacré à la recherche qualitative des résidus d'antibiotiques par test d'inhibition microbiologique (le Delvotest®), puis une recherche par test immuno-enzymatique (ELISA)

Enfin une analyse quantitative par HPLC des échantillons qui se révéleront positifs ou douteux par les tests précédemment cités. Ce travail sera précédé par une optimisation, des différents paramètres d'analyse HPLC, pour la recherche de la pénicilline et de l'oxytétracycline, ainsi qu'une adaptation d'une technique d'extraction et de purification des échantillons de lait.

1. Site d'étude

L'étude est réalisée au niveau de la région de Constantine. C'est une ville du nord-est de l'Algérie. Elle est limitée au nord par la wilaya de Skikda, au sud par la wilaya d'Oum El Bouaghi, à l'est par la wilaya de Guelma et à l'ouest par la wilaya de Mila. Avec une superficie de 231.63 km² et une population de 448 374 habitants depuis le dernier

recensement fait en 2008. Le nombre de communes est de 12 appartenant à 6 daïras. La wilaya de Constantine est représentée sur la carte ci-dessous.



Carte n° 3 : site de l'étude représenté par les 12 communes de la wilaya de Constantine.

(Source : site internet <http://www.sante.dz/dsp-25/presentation.html>)

Le nombre d'élevages bovins dans la région de Constantine, durant l'année 2013, est estimé à 3763 élevages avec un total de 51000 têtes de bovins recensés. 24257 vaches laitières sont comptées parmi ce cheptel (source : DSA, septembre 2014).

2. Méthode d'échantillonnage

La méthode d'échantillonnage définit combien d'individus seront sélectionnés et de quelle façon sera opérée cette sélection (Bobbia *et al.*, 2009). Pour notre travail, nous avons opté pour une méthode stratifiée, dans laquelle la population (représentée par la wilaya de Constantine) est divisée en strates (représentées par les communes). Les échantillons sont prélevés au sein de chacune des communes, de façon homogène et aléatoire.

Notre plan d'échantillonnage est confectionné de la manière suivante :

2.1. Lait de vache

Les prélèvements sont effectués de manière homogène sur tout le territoire de la wilaya de Constantine à raison de 10 échantillons par commune, soit un total de 120 échantillons.

Le lait prélevé est un lait de mélange, et l'échantillonnage est prélevé de manière aléatoire. Des flacons en plastique stériles (capacité 50 ml), étiquetés et hermétiquement fermés sont utilisés. Sont mentionnées sur ces flacons la date et la provenance du prélèvement.

Tous les prélèvements sont collectés à partir de fermes individuelles et enregistrées. Cela a été réalisé sur la période allant de mars 2013 jusqu'à juin 2014. Les informations, relatives à la provenance des prélèvements de lait de vaches, sont détaillées sur le tableau n° 12 ; annexe II.

Les échantillons sont ensuite acheminés au laboratoire (PADESCA) dans des bacs isothermes où ils sont stockés dans un congélateur jusqu'au jour de l'analyse sans altérer les concentrations d'antibiotiques comme le rapportent plusieurs auteurs (Gaurav *et al.*, 2014) (Ferraz Spisso *et al.*, 2009).

Chaque échantillon est prélevé en double. Un échantillon servira pour l'analyse qualitative et l'autre pour une éventuelle quantification.

2.2. Poudre de lait

La poudre de lait a été prélevée sur les trois laits de reconstitution les plus consommés dans la région de Constantine.

Pour des raisons d'éthique nous les nommerons respectivement poudre 1, 2 et 3.

La première (poudre 1) concerne la poudre de lait servant à préparer le lait recombinaé (lait écrémé + matière grasse). Vu que le lait recombinaé, commercialisé en sachet, peut contenir un mélange entre le lait de vache et le lait en poudre, cette dernière est prélevée directement au niveau des laiteries, pour éviter d'éventuels biais, au niveau des résultats.

Les deux autres (poudre 2 et 3), concernent deux marques de poudre (à 26% de matière grasse) à reconstituer, sont directement prélevées du commerce.

L'échantillonnage est effectué dans des sachets en plastique hermétiques et stériles. Ils sont stockés au réfrigérateur jusqu'au jour de l'analyse. Le nombre de prélèvement est de 30 pour la poudre 1. Il est de 15 pour chacune des deux autres. La quantité de poudre prélevée est de 100g.

Les prélèvements de poudre proviennent de lots différents et parfois même de pays différents comme c'est le cas pour la poudre 1. Les renseignements nécessaires à l'identification des échantillons de poudre sont retrouvés sur le tableau n° 13 ; annexe II pour la poudre 1, tableau n° 14 ; annexe II pour la poudre 2 et le tableau n° 15 ; annexe II pour la poudre 3.

Le lait est reconstitué selon les recommandations des fabricants pour une consommation standardisée.

3. Caractéristiques des antibiotiques à rechercher

3.1. Choix des antibiotiques

Le choix des antibiotiques à étudier est justifié par le fait que la pénicilline est l'antibiotique le plus utilisé pour le traitement des mammites (Owens *et al.*, 1997) et même pour les affections respiratoires chez les bovins laitiers. Par ailleurs, c'est celle qui cause le plus de dégâts en industrie laitière (Gustavsson *et al.*, 2002).

L'oxytétracycline représente, de loin, l'antibiotique le plus employé pour le traitement ou la prévention de plusieurs pathologies bovines (affections respiratoires, mammaires, podales et autres) (Desalegne, 2011 ; Sarmah *et al.*, 2006 ; Mackie *et al.*, 2006 ; Furusawa, 2003).

Ces deux antibiotiques sont utilisés pour le traitement des mammites, ce dernier représente la principale cause de pollution du lait par des résidus d'antibiotiques (Fabre *et al.*, 1996 ; Federicci-Mathieu, 2000 ; Lepoutre, 2000 ; Serieys *et al.*, 1995), surtout quand il est administré par voie diathélique qui, théoriquement, semble présenter le plus de risque (Schmidt et Rodrick 2003).

D'autre part, au delà des risques pour la santé publique, le déclassement des laits contenant des résidus médicamenteux est dû à l'action inhibitrice des antibiotiques sur le développement normal des levains, utilisés en fromagerie (Jepsen, 1996). Le tableau n° 16 indique les taux approximatifs auxquels quelques antibiotiques inhibent certains levains.

Tableau n ° 16 : Taux auxquels quelques antibiotiques inhibent les levains dans le lait.

Antibiotique	Début d'inhibition (quantité/mL)	Inhibition totale (quantité/mL)
Pénicilline G (unités)	0,05	0,1
Chlortétracycline (µg)	0,02	1,0
Oxytétracycline (µg)	0,01	2,0
Chloramphénicol (µg)	0,20	10
Streptomycine (µg)	0,04	10

D'après le tableau n° 16, la pénicilline et l'oxytétracycline sont retrouvés en haut du tableau, représentant ainsi un risque énorme pour les transformations laitières. A des taux relativement bas (pénicilline 0.05 unité/mL et l'oxytétracycline 0.01 µg/mL).

3.2. Stabilité des antibiotiques

La stabilité de la pénicilline est maximale aux environs du pH normal du lait, et la pasteurisation influe peu l'altération de ce médicament. De même un chauffage momentané du lait n'altère pas l'activité biologique des tétracyclines, du chloramphénicol, ni de la streptomycine. De plus, des antibiotiques actifs ont déjà été décelés dans le fromage, le beurre et le lait en poudre préparé par atomisation (Jepsen, 1996).

Chapitre I : Enquêtes prospectives sur la pratique rurale et les industries laitières dans la région de Constantine

Afin d'avoir une idée sur la production laitière, au sens large du terme ; deux enquêtes prospectives ont été menées. La première s'est dirigée vers quelques vétérinaires praticiens, dans un but de recueillir un maximum d'informations sur les pathologies les plus rencontrées et leurs traitements (surtout ceux à base d'antibiotiques) et la seconde s'est déroulée au sein de quelques laiteries, situées dans la région de Constantine dans un but de connaître la situation de la production et de la transformation laitière à Constantine. Les deux questionnaires se sont déroulés simultanément durant la période de février à juin 2012.

1. Enquête auprès des vétérinaires praticiens

Nous avons réalisé une enquête de type descriptive, dans un but de rapporter la situation de l'antibiothérapie dans la région de Constantine.

L'objectif ici est, d'essayer, de savoir la manière dont les vétérinaires opèrent avec les traitements à base d'antibiotiques. Sont-ils donnés à tort et à travers ou bien au contraire leur utilisation est rationnelle.

Un autre objectif de cette investigation était, éventuellement, de corréler des comportements à risques tels : le non respect des voies et doses d'antibiothérapie à d'autres critères comme le non respect du délai d'attente et l'émergence de l'antibiorésistance.

L'enquête n'a pas été réalisée sur l'ensemble de la population (près de 100 vétérinaires privés et 51 travaillant dans le secteur public) mais sur une partie de celle-ci.

Le tirage au sort des personnes interrogées est aléatoire : l'échantillon est composé de 40 vétérinaires prélevés à partir de la liste délivrée par la direction des services agricoles, de la wilaya de Constantine.

1.1. Description du questionnaire

L'enquête a concerné 40 vétérinaires praticiens diversement situés dans la wilaya. Le questionnaire est composé de 18 questions ayant des objectifs précis. Les informations recueillies portent sur :

- Les pratiques vétérinaires courantes dans les régions respectives,
- Les pathologies les plus rencontrées,
- L'antibiothérapie : traitements par voie générale ou diathéliques,

- Le choix de l'antibiotique : spectre, voie d'administration, posologie
- L'efficacité des traitements administrés,
- Le respect des conditions d'utilisation,
- Les délais d'attente,
- Les résistances aux antibiotiques : importance et fréquence.

Le questionnaire en entier est porté sur l'annexe III. Il comporte des questions à réponses suggérées et d'autres à réponses libres.

1.2. Résultats et discussion

Cette investigation avait pour but de se rapprocher du terrain et de savoir, comment les vétérinaires opèrent avec les antibiothérapies. Sont-elles rationnelles et étudiées ou données de façon anarchique ? D'autre part, est-ce que les vétérinaires rencontrent des difficultés lors et après avoir donné un traitement à base d'antibiotiques (antibiorésistance notamment) ?

Compte tenu du nombre limité de l'effectif des vétérinaires interrogés, le traitement des données a été restreint à une analyse statistique descriptive (pourcentages et fréquences) sans réalisation de tests statistiques.

1.2.1. Pathologies rencontrées et types de traitements

Selon les données récoltées, la pratique rurale est exercée par 100% des vétérinaires ayant fait l'objet de l'enquête. Seulement 72% pratiquent sur les animaux de compagnie (chiens et chats), puis 44% sur les pathologies aviaires et enfin seulement 27% d'entre eux exercent en pathologie équine.

Sur le terrain, une multitude de pathologies existe. Les maladies d'origine ou avec complication bactérienne sont prédominantes. On constate que les mammites, les métrites et les problèmes respiratoires représentent les pathologies les plus importantes. D'autres sont moins courantes, comme les boiteries. Ainsi, les formulations médicamenteuses administrées aux animaux sont faites généralement à base d'antibiotiques.

Dans une étude similaire menée en Anjou (France) en 2007 par Chatellet, ce dernier avait signalé que 80% des élevages étaient atteints de mammites, 33 % atteints de pathologie respiratoire et 10% touchés par une pathologie podale. Ce sont donc les mêmes pathologies qui prédominent en élevage bovin en Algérie comme en France.

1.2.2. Critère de choix des antibiothérapies

Les vétérinaires choisissent les antibiotiques à administrer selon :

- **Le spectre d'activité** : la plupart des vétérinaires interrogés (66 % des cas) privilégiaient le spectre large, lors d'instauration d'un traitement à base d'antibiotiques, bien que ce type de traitement entraîne l'émergence de bactéries antibiorésistantes. Les vétérinaires expliquent cette utilisation par la difficulté de déplacement pour la réalisation d'injections multiples, à plusieurs jours d'intervalles, que demande l'emploi d'antibiotique à spectre étroit.

En réalité la situation du terrain nous permet de constater, essentiellement, la non utilisation de l'antibiogramme par les vétérinaires praticiens, ce qui devrait permettre de les orienter vers l'antibiotique indiqué pour chaque situation. A ce propos, aucun vétérinaire interrogé ne possède de laboratoire pour la réalisation des examens complémentaires, notamment le laboratoire de microbiologie, pour l'identification des bactéries. D'autre part aucun d'entre eux n'envoie vers des laboratoires spécialisés (tel que le laboratoire vétérinaire régional par exemple) des échantillons pour faire l'objet d'un antibiogramme et de là adapter son traitement aux résultats transmis par le laboratoire. Les raisons avancées par la grande majorité des vétérinaires objet de l'enquête, sont le manque de temps et parfois la lenteur dans l'obtention des résultats.

- en second lieu, **l'efficacité et le coût** sont au même rang avec 27% (figure n° 6). Donc le souci des vétérinaires n'est pas une efficacité complète du traitement instauré mais plutôt une antibiothérapie générale couvrant une partie de la pathologie.

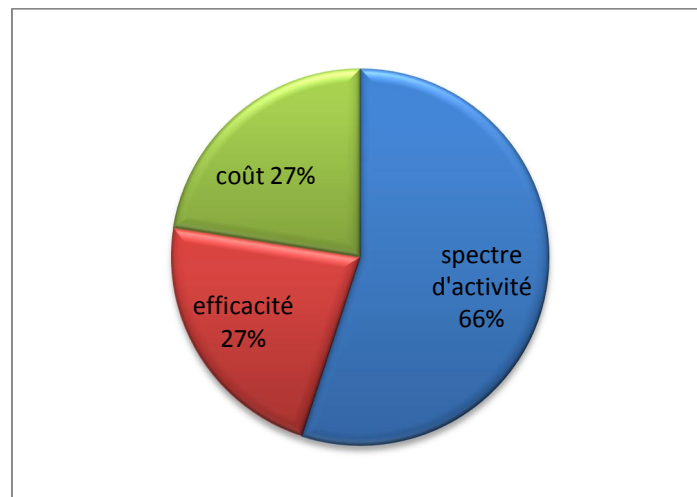


Figure n° 6 : critères de choix des antibiotiques à administrer

1.2.3. Traitements antibiotiques

1.2.3.1. Traitement des mammites

Toujours suite à l'absence de l'antibiogramme, selon les vétérinaires, les mammites (qui peuvent être dues à des bactéries Gram+ ou Gram-) nécessitent l'emploi d'un antibiotique à large spectre et liposoluble, en première intention. L'association d'une antibiothérapie par voie générale et intramammaire doit être privilégiée.

Les antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites par voie intra-mammaire sont par ordre décroissant : les tétracyclines (55%), les bêta-lactamines (33%), les macrolides (9.67%) et enfin les sulfamides (3.22%) (figure n° 7).

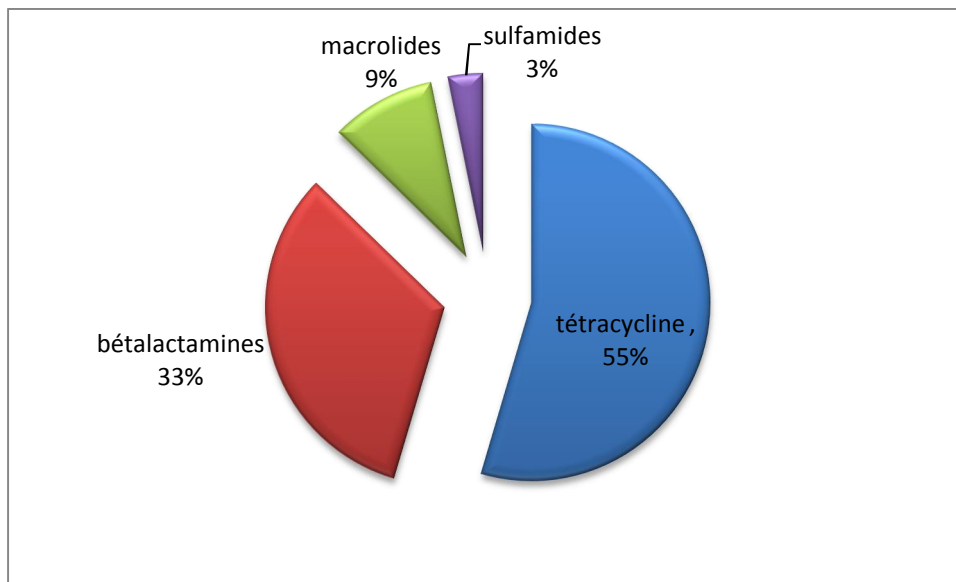


Figure n° 7 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites par voie intra-mammaire

Pour Chatellet (2007), les formulations intra-mammaires sont à base de tétracyclines, de polypeptides et d'aminosides, associés à un anti-inflammatoire. Là on retrouve une grande partie des antibiotiques utilisés par nos vétérinaires, à l'exception des polypeptides.

Par ailleurs, d'après l'enquête réalisée par Fabre *et al.* en 1996, dans 625 élevages répartis dans les principaux bassins laitiers français, dans le cadre du contrôle des résidus d'antibiotique dans le lait. Le traitement des mammites cliniques est incriminé dans 64% des cas de contamination du lait par les résidus d'antibiotiques et le traitement au tarissement dans 24% des cas. Ces chiffres sont, eux-mêmes, proches de ceux rapportés par d'autres auteurs : respectivement 52% et 19% Lepoutre (2000), et respectivement 42% et 24% Verhnes et Vandaele (2002).

En corrélant avec les résultats avancés par Fabre (1996), en Algérie, les deux antibiotiques (en raison de leur large utilisation comme décrit précédemment) les plus susceptibles d'être retrouvés dans le lait sont donc : les tétracyclines et les bêtalactamines.

Pour le traitement des mammites par voie générale, presque les mêmes molécules sont retrouvées ; ce sont : les bêtalactamine (46.5%), les tétracyclines (26%), les macrolides (22.5%) et enfin les sulfamides (8.69 %) (figure n° 8).

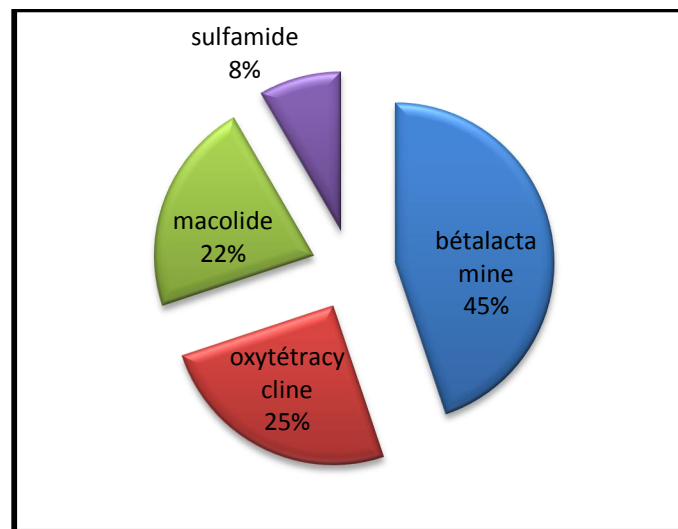


Figure n° 8 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites par voie générale

En 2007, Chatellet rapporte que pour les injections, les vétérinaires préfèrent utiliser les macrolides, les tétracyclines, le florfénicol, les fluoroquinolones et l'amoxicilline avec une préférence pour les pénicillines. Là encore, on constate une similitude entre les molécules d'antibiotiques privilégiées en France et en Algérie pour le traitement des mammites par voie générale.

1.2.3.2. Traitement des pathologies respiratoires

Les antibiotiques utilisés pour le traitement des pathologies respiratoires sont : les tétracyclines (44%), les bêtalactamines (43,5 %), les macrolides (43%), les céphalosporines (22%). Comme le montre la figure ci-dessous.

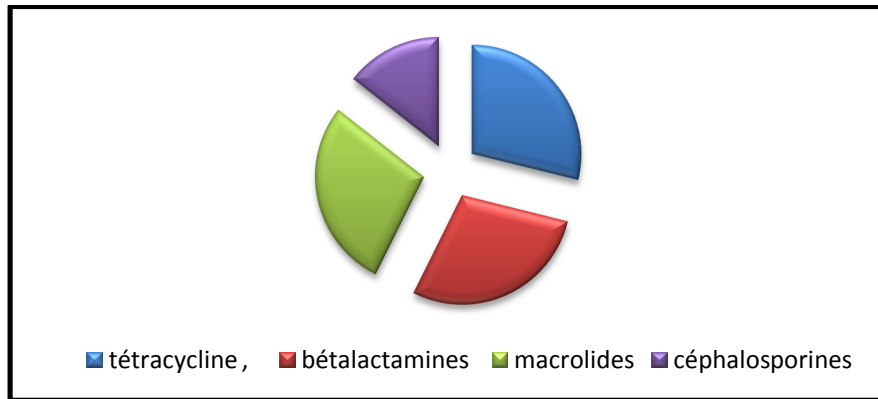


Figure n° 9 : antibiotiques utilisés pour le traitement des affections respiratoires.

Selon Chatellet (2007), Les familles antibiotiques préconisées en cas d'infection respiratoire sont : les pénicillines du groupe A, les tétracyclines et les phénicolés, les macrolides ou les quinolones.

Dans ce cas, on peut conclure que, pour le traitement des deux pathologies les plus répandues chez les bovins laitiers, ce sont les tétracyclines et les bétalactamines qui sont les plus largement utilisées.

En 1998, la Fédération Européenne de la santé animale a réalisé une enquête, sur l'usage des antibiotiques vétérinaires, dans les 15 États membres de l'Union Européenne (UE). Il a été constaté que 65% de tous les antibiotiques et les antibactériens consommés, pour l'utilisation thérapeutique et la prévention, sont des tétracyclines (Bogialli *et al.*, 2006).

Nous pouvons donc constater que le composant le plus représenté dans ces traitements de première intention est un produit antibiotique : la spécialité utilisée peut ne comporter qu'une seule molécule active (« antibiotique seul », ou bien plusieurs (« association d'antibiotiques ») ou encore associer l'antibiotique à un anti-inflammatoire.

1.2.4. Respect du délai d'attente par les éleveurs

Tous les vétérinaires interrogés indiquent que les éleveurs ne respectent presque pas les délais d'attente préconisés, au cours des traitements antibiotiques instaurés.

Selon leurs dires, 15 % seulement de vétérinaires interrogés pensent que le respect du délai d'attente par les éleveurs est bon. 50 % disent qu'il est moyen et 35 % rapportent qu'il est mauvais.

Le non respect de ce délai s'explique par un manque de responsabilité et de sensibilisation des éleveurs. Par ailleurs ces derniers n'ont pratiquement aucune notion sur le délai d'attente et les risques encourus en cas de non respect de ce dernier.

1.2.5. Antibiorésistances

La plupart des vétérinaires questionnés (95%), ont enregistré des cas d'antibiorésistance ; notamment la résistance des mammites à l'oxytétracycline. Ce dernier est couramment employé et d'une manière abusive. Ajouté à cela, la mauvaise manipulation des antibiotiques, car le vétérinaire laisse, parfois, à l'éleveur le soin d'administrer lui-même le médicament ou parfois même l'éleveur achète, directement, l'antibiotique sans l'avis du médecin.

L'administration d'un traitement par l'éleveur, peut conduire à un mauvais suivi de la prescription du vétérinaire. La dose à administrer dépend souvent du poids de l'animal : il est évident que tous les éleveurs ne disposent pas d'une balance dans leur stabulation, leur permettant de peser l'animal à traiter avant d'entamer un traitement antibiotique, ce qui peut conduire à des erreurs d'appréciation du poids et donc à des surdosages ou plus fréquemment des sous-dosages. Le sous-dosage est notamment à l'origine de la sélection de germes résistants aux antibiotiques (Afssa, 2006 cité par Chatellet, 2007).

La durée du traitement est le second critère fondamental à respecter : de nombreux éleveurs, pour des raisons économiques, se basent sur l'état général de leur animal plutôt que sur les critères bactériologiques pris en compte dans la prescription ou la notice de l'antibactérien utilisé, et auront donc tendance à réduire le temps de traitement quand l'animal sera cliniquement guéri.

Pour l'automédication : si l'éleveur est confronté à des symptômes relevés sur son animal, il aura recours au même traitement que le vétérinaire aura mis en place précédemment, ne faisant appel à ce dernier qu'en cas d'échec thérapeutique. Cette pratique, peut aboutir d'avantage à la sélection de bactéries résistantes.

2. Enquête au près des laiteries siégeant dans la région de Constantine

Une enquête est réalisée au sein des industries laitières situées dans la région de Constantine. Cette étude a porté sur trois unités ; une à Ain smara, une à Constantine et une autre à Ibn badis. Ce travail est une étude préliminaire décrivant les conditions de travail ainsi que les problèmes rencontrés au sein des unités de fabrication et de transformation laitière.

2.1. Description du questionnaire

Le questionnaire est confectionné dans un but de recueillir un maximum d'informations, relatives aux points essentiels, que nous avons jugé utile de développer pour évaluer la situation de la production laitière à Constantine. Ces points portent essentiellement sur :

- ✓ Les quantités (capacités) de la production,
- ✓ Les types et les qualités de productions,
- ✓ L'approvisionnement en matières premières (la poudre et le lait vache),
- ✓ Les problèmes de maturation au cours des transformations,
- ✓ Les moyens de contrôle sanitaires et technologiques,
- ✓ Et les plans de traçabilité éventuellement instaurés.

Pour la réalisation de cette enquête, nous avons effectué des visites ponctuelles, au sein de chacune des laiteries, durant lesquelles nous avons interrogé des techniciens et des ingénieurs responsables des unités de production. Le questionnaire est à réponses libres et est porté sur l'annexe III.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Types de production

Les spécialités de productions varient d'une laiterie à une autre :

Pour la laiterie 1 par exemple, les productions varient en qualité, où on retrouve plusieurs spécialités, comme le lait de vache entier pasteurisé, le lait de vache demi-écrémé pasteurisé, le lait recombinaé pasteurisé conditionné, et des produits dérivés tels que le lben, (petit lait) raib (lait caillé), la crème fraîche, le camembert, le beurre, le fromage de crème (à base de crème fraîche épicée).

Pour la laiterie 2, les types de production sont : le lait recombinaé pasteurisé conditionné, le lait de vache pasteurisé à 28 % de matière grasse, lben, la pâte fraîche, le camembert, la crème fraîche et le beurre.

Par contre pour la troisième laiterie, on retrouve seulement deux types de production : le lait recombinaé pasteurisé conditionné et lben pasteurisé.

2.2.2. Capacités de production (quantités)

A propos des capacités et des quantités de production, les données sont assez diversifiées. Nous avons remarqué que certaines laiteries sont les leaders de la production laitière à Constantine, avec des quantités allant jusqu'à 350 000 L/jour. Or, pour d'autres, la

production est beaucoup plus faible avec seulement 12 000 L/jour comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau n° 17 : Les capacités de production des laiteries

Les laiteries	Quantité /jour (litre)	Quantité/mois (litre)
Laiterie 2	350 000	10 500 000
Laiterie 1	180 000	5 400 000
Laiterie 3	12 000	360 000

2.2.3. Approvisionnement en matière première (poudre et lait de vache)

La provenance de la poudre est la même pour les trois laiteries ; c'est l'ONIL (Office National Interprofessionnel du Lait et Produits Laitiers) seul qui a la charge d'importer et de distribuer la poudre à travers le territoire national.

Pour la fabrication du lait recombinaé pasteurisé, la poudre à 0% de matière grasse est recombinaée, soit avec de la poudre à 26% de matière grasse ou bien avec la MGLA (matière grasse laitière anhydre) pour obtenir un lait demi-écrémaé à 15% de matière grasse.

La poudre de lait est souvent mélangée au lait de vache, surtout en période de pics de production (Mars à juin). Les proportions de mélange varient d'une laiterie à une autre : 50%-50% pour les laiteries 1 et 3 et de 30% lait de vache - 80% lait en poudre pour la laiterie 2.

Concernant les quantités de poudre de lait importées annuellement, celles-ci varient de 3 à 2000 tonnes/an.

La production laitière locale (lait de vache) reste minime comparées aux quantités de la poudre consommée, les quantités varient selon les saisons (pics de production entre mars et juin) et sont réservées surtout aux transformations laitières.

2.2.4. Les problèmes rencontrés à la production

Dans toutes les laiteries, les problèmes de maturation, au cours des transformations, existent. Les résidus d'antibiotique sont les plus incriminés.

Au moment de l'exécution du questionnaire, une seule unité utilisait un test qualitatif de détection résidus d'antibiotiques. Dans cette dernière, le test est exclusivement employé en cas de transformation laitière. Pour les deux autres laiteries, l'acquisition du test reste un projet à réaliser.

En revanche dans un souci de maîtriser le danger des résidus d'antibiotique. Les trois laiteries ont instauré un plan de traçabilité à travers des collecteurs agréés par l'état, dans un

but de sélectionner, par la suite, les éleveurs potentiels et sensibilisés sur les résidus d'antibiotiques.

3. Conclusion

Au terme de ces deux enquêtes, nous avons récolté des informations importantes :

- A l'issue de la première enquête, Il s'est avéré que les pathologies les plus rencontrées sur le terrain sont les mammites et les affections respiratoires. Ces dernières sont souvent traitées à base d'antibiotiques, représentés majoritairement par les bêta-lactamines (33%) et les tétracyclines (55%). Ces deux antibiotiques sont eux-mêmes source d'antibiorésistance et par conséquent d'échecs thérapeutiques. D'autre part, les délais d'attente, après l'administration des antibiotiques, sont souvent non respectés, exposant ainsi le consommateur à une ingestion passive des antibiotiques.
- A l'issue de la deuxième enquête, nous avons constaté que la production laitière à Constantine est basée essentiellement sur la poudre de lait. Les quantités minimales, qui représentent la production locale de lait de vache, sont consacrées aux transformations laitières. A cela s'ajoute l'existence de problèmes de transformations qui causent d'importantes pertes de production, surtout par manque d'instauration d'une politique anti-résidus d'antibiotiques.

Chapitre II : Analyse qualitative des résidus d'antibiotiques par test d'inhibition microbiologique « Delvotest® »

1. Matériel et méthode

1.1. Matériel utilisé :

1.1.1. Le kit Delvotest®

C'est un test microbiologique basé sur le principe de la diffusion en tube ; Le coffret de Delvotest® contient :

- Cent ampoules contenant une géloseensemencée par un nombre standardisé de spores de *Bacillus stearotherophilus var. calidolactis*, des nutriments pour ce micro-organisme et du pourpre de bromocrésol,
- une seringue doseuse pré-réglée à 0.1 ml, en plus de 100 embouts jetables pour prélever les échantillons,

1.1.2. Incubateur Delvotest®

C'est un appareil spécialement conçu pour l'incubation des ampoules Delvotest®, avec une température préalablement réglée à 64°C.

1.1.3. Échantillonnage

Tous les échantillons de lait produit localement (120 échantillons) et de lait en poudre (60 échantillons), précédemment cités, feront l'objet d'une analyse par le Delvotest®. Voir partie but et objectifs (partie échantillonnage).

1.2. Méthode

1.2.1. Protocole d'analyse

Après décongélation des échantillons au bain-marie à température 15°C pendant 1 heure (Romnée, 2009), les ampoules sont identifiées avec un marqueur indélébile pour chaque échantillon de lait à tester. Les pellicules d'aluminium couvrant les ampoules sont perforées avec la seringue.

D'autre part, l'échantillon de lait est mélangé, homogénéisé, prélevé avec la seringue doseuse (0.1 ml) puis déposé lentement sur la gélose. Les embouts de pipettes sont jetés après chaque utilisation pour éviter la contamination entre les échantillons.

Le tout est mis à incuber, soit dans l'incubateur Delvotest® ou au bain-marie, préchauffé à $64 \pm 0.5^\circ\text{C}$. La durée d'incubation est de 2h30 à 3h00.

Après les 3 heures d'incubation (à 64°C), on procède directement à la lecture des résultats.

1.2.2. Lecture et expression des résultats

Les résultats sont lus dans les 2/3 inférieurs de l'agar. La coloration est interprétée ainsi :

- Une couleur jaune indique l'absence de substance antibactérienne, à une concentration supérieure ou égale à la limite de détection du test,
- Une couleur jaune / violette indique la présence de substances, antibactériennes dans l'échantillon de lait analysé, à un taux proche du seuil de détection,
- Une couleur violette indique, la présence de substances antibactériennes dans l'échantillon de lait analysé, à un taux égal ou supérieur au seuil de détection.

2. Résultats et discussion

2.1. Expression des résultats

2.1.1. Lait de vache

Cent vingt échantillons de lait de vache sont analysés par le Delvotest® en vue d'une recherche qualitative des résidus d'antibiotiques. A l'issue des analyses, 30/120 (soit 25%) sont positifs, 72/120 (soit 60%) sont négatifs et 18/120 (soit 15%) sont douteux.

La lecture est interprétée sur la base de virement de la couleur où la couleur violet indique que le résultat est positif, quand la couleur est jaune c'est négatif et quand elle est entre les deux, c'est douteux (figure n° 10). Les photos des ampoules du Delvotest® après analyse des échantillons sont retrouvées sur l'annexe V.

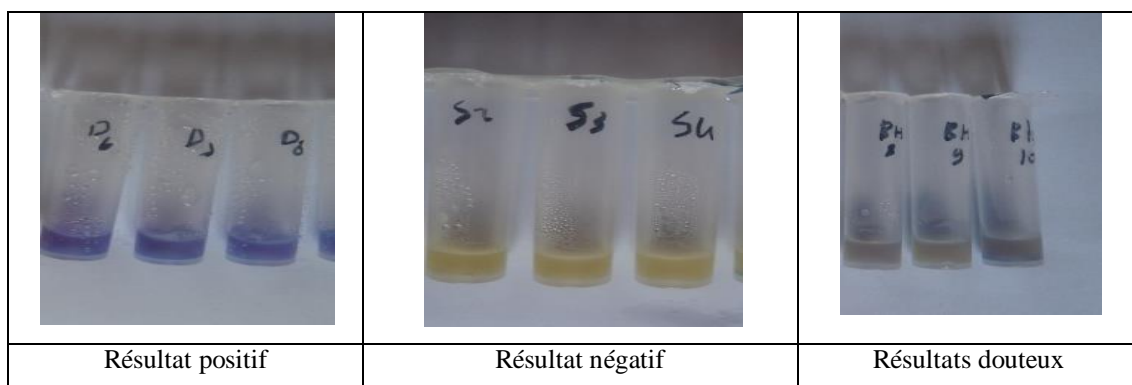


Figure n° 10 : exemples de résultats positifs, négatifs et douteux après analyse par le Delvotest®

Pour exprimer les données, nous avons calculé les fréquences des résultats, pour chacune des communes, en divisant le nombre de cas (positifs, négatifs ou douteux) sur le nombre total des échantillons par communes (10). Les résultats varient considérablement d'une commune à l'autre, comme le montre le tableau, ci-dessous.

Tableau n° 18 : fréquences des résultats positif, négatifs et douteux/commune

communes	Const	El khr	Ouled- Rah	Zigh- youc	Did- mour	Ham- Bouz	Ibn- Ziad	Ain- Abid	Bni- Hmi	Mass- Boudjriou	Aïn- Smara	Iben- Badis
Fréquences des échantillons positifs	0.2	0.1	0.6	0.7	0.4	0.7	0	0.2	0.1	0	0	0
Fréquence échantillons négatifs	0.7	0.8	0.4	0.3	0.3	0.2	0.6	0.6	0.7	0.7	1	0.9
Fréquence échantillons douteux	0.1	0.1	0	0	0.3	0.1	0.4	0.2	0.2	0.3	0	0.1

Sur le tableau nous remarquons une hétérogénéité de contamination entre les zones, où certaines communes présentent une absence totale de contamination telles que Aïn Smara et Iben Badis or dans d'autres, la contamination est beaucoup plus importante ; la fréquence des résultats positifs est de 0.7 pour Hamma bouziane et Zighoud youcef et 0.6 pour Ouled Rahmoun.

Les résultats de tous les échantillons de lait de vache local sont rapportés sur le tableau n° 19 ; annexe II.

En théorie, la plupart des travaux, réalisés sur le Delvotest®, les résultats sont exprimés en pourcentage de contamination. En termes de pourcentages de contaminations, les résultats sont exprimés ainsi : positifs = 25 %, négatifs = 60 %, douteux = 15 %. Les résultats sont représentés ci-dessous.

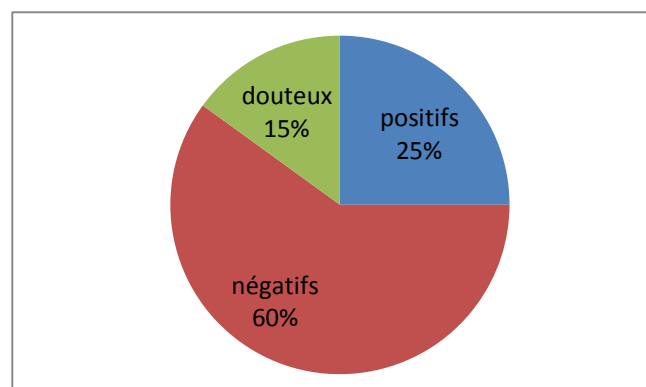


Figure n° 11 : pourcentages de contamination du lait de vache révélés par le Delvotest®

2.1.2. Lait en poudre

Pour le lait en poudre, sur 60 échantillons, 2 seulement sont positifs, (soit 3,3 %), 57/60 sont négatifs (soit 95 %) et 1 douteux (soit 1,6 %). Les résultats sont représentés ci-dessous.

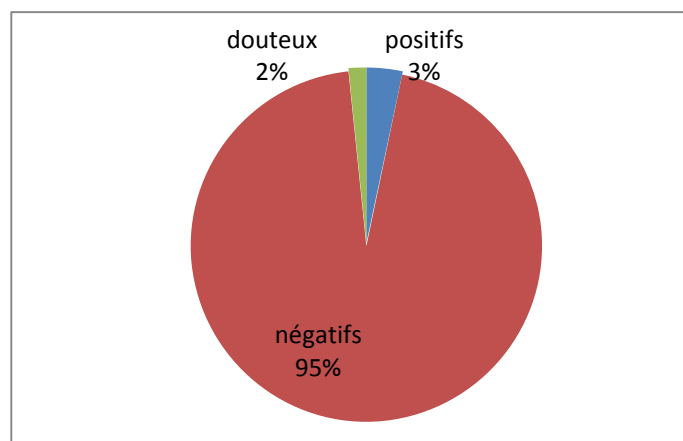


Figure n° 12 : pourcentages de contamination du lait en poudre révélés par le Delvotest®

Nous remarquons dans ce cas que les pourcentages de contamination apparaissent nettement plus bas par rapport au lait local.

Les résultats sont retrouvés sur le tableau n° 20 ; annexe II pour la poudre 1, sur le tableau n° 21 ; annexe II pour la poudre 2 et sur le tableau n° 22 ; annexe II pour la poudre 3.

2.1.3. Comparaison des résultats entre le lait de vache et le lait en poudre

Afin de comparer le degré de contamination entre les échantillons de lait de vache, produit localement, et ceux de lait en poudre importé, nous avons appliqué le test Qui₂ pour voir si la différence est significative ou non. Le tableau ci-dessous représente les valeurs à comparer entre le lait de vache et celles du lait en poudre.

Tableau n° 23 : calcul statistique de comparaison du degré de contamination entre le lait local et le lait importé

	Positifs		Négatifs		Douteux		total
	(observés)	(calculés)	(observés)	(calculés)	(observés)	(calculés)	
Lait de vache	30	21,33	72	86	18	12,6	120
Lait en poudre	2	10,6	57	43	1	6,33	60
Total		32		129		19	180

$\chi^2 = 23.8$

Nous avons appliqué le test χ^2 selon la formule suivante :

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

O_i représente l'effectif calculé

E_i représente l'effectif observé

le degré de liberté (ddl) est égal à $(L-1)(C-1) = 2$

Les valeurs de χ^2 table au (ddl) 2 est égal à 3,84 au risque 5 % et 9,21 au risque 1 %.

La valeur du χ^2 calculée est égale à 23,8, soit une valeur nettement supérieure à aux valeurs de la table citée ci-dessus aux risques de 1 % et 5 %. Donc la différence est significative entre le degré de contamination des échantillons de lait local et ceux de lait importé. La contamination est beaucoup plus importante sur les échantillons de lait (produit localement) que sur le lait en poudre importé.

2.2. Discussion

Multiplés tests d'inhibiteurs microbiologiques, rapides et sélectifs, sont appliqués pour la détection des résidus à la ferme, au niveau des industries laitières et au niveau des laboratoires agréés (Suhren 1995; Honkanen-Buzalski & Reybroeck 1997; Honkanen-Buzalski et Suhren 1999; Botsoglou et Fletouris 2001).

Le Delvotest® est l'un des premiers tests d'inhibition microbiologique, utilisé directement sur les tanks de lait, pour la recherche des résidus d'antibiotiques. C'est le meilleur test d'inhibition microbiologique largement utilisé dans beaucoup de pays (Alomskien *et al.*, 2002). Cette méthode était préconisée depuis 1982 par l'association officielle des chimistes analytiques (Katz, 1982 ; Kelley, 1982).

C'est un test qui contient une souche particulièrement sensible à de nombreux antibiotiques, notamment à la pénicilline. Il s'agit d'un test spécifique pour la recherche des antibiotiques à noyau lactam (2-4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) mais possède une spécificité diminuée pour d'autres tels que les tétracyclines (200-400 $\mu\text{g}/\text{kg}$), les macrolides (néomycine, érythromycine), la streptomycine, la gentamycine et les chloramphénicolés (Aggad *et al.*, 2009 ; Navratilova, 2008 ; Althaus *et al.*, 2003 ; Botsoglou et Fletouris, 2001). Dans notre étude, nous avons utilisé ce test, principalement, pour la recherche des bétalactamines dans le lait, spécifiquement la pénicilline G qui fera l'objet d'une recherche quantitative par HPLC ultérieurement.

Le test est composé essentiellement de spore de *Bacillus stearothermophilus* variété *calidolactis*. Le choix de cette bactérie est justifié par son utilisation en industrie laitière, en

particulier dans la production du yaourt. La thermophilie de cette bactérie, son utilisation réussie dans la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et ses dérivés par certains chercheurs notamment par Jurdi et Asmar (1981), et sa sensibilité aux antibiotiques est d'un grand avantage, et peuvent expliquer en partie notre choix sur son utilisation comme méthode qualitative pour la détection des antibiotiques.

Le principe repose sur une addition de nutriments et une incubation à 64°C, les spores germent et produisent l'acide lactique responsable du virage d'un indicateur de pH coloré (pourpre de bromocrésol).

La méthode possède néanmoins quelques inconvénients ; elle ne permet pas une identification spécifique des antibiotiques, ce qui fait d'elle une méthode seulement qualitative. Sa durée d'incubation est assez longue (2,5 à 3h) et sa sensibilité est marquée pour les bêta-lactamines, essentiellement la pénicilline, mais apparemment moindre pour d'autres cités plus haut.

En comparant nos résultats avec d'autres, nous constatons une diversification de données :

Pour le lait de vache, nos résultats (25% d'échantillons positifs) concordent avec certains travaux réalisés ici en Algérie. Comme Aggad *et al.* (2009) où 28 % des échantillons de laits sont positifs. Lui-même est proche d'autres auteurs comme : Guetarni (2006) avec 26.38 % et au Maroc Srairi *et al.* (2004) avec 26 %.

Ailleurs plusieurs travaux rapportent des pourcentages de contamination supérieurs aux nôtres. Ceux-ci s'observent surtout dans les pays où le contrôle n'est pas régulier. Les pourcentages d'échantillons positifs sont beaucoup plus grands et varient considérablement (Ruegg, 2005). Comme en Chine durant 2002 et 2003 le contrôle des résidus a révélé 37 % de résultats positifs sur les tanks de lait et 17.24 % sur le lait stérilisé (UHT) (Deng *et al.*, 2004). Au Pakistan, 36.5 % de lait commercialisé en 2006 étaient contaminés par des β -lactames (Khaskheli *et al.*, 2008). Parallèlement des investigations aux Brésil montrent que presque 50% de lait pasteurisé livré au commerce étaient contaminés par les résidus d'antibiotiques (Nascimento *et al.*, 2001). En Europe, de tels pourcentages ont été observés dans les pays de l'est précisément en Pologne où Rybinska *et al.* (1995) rapportent que 13-22 % de résultats sont positifs.

D'autres travaux ont rapporté des pourcentages de contamination beaucoup plus bas. A commencer ici en Algérie où le Delvotest® est employé en 2013 à Oran par Beldjil *et al.* Sur 105 échantillons, 4.76 % seulement sont positifs. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence. Les variations saisonnières peuvent être mises en avant car les pourcentages de contaminations sont beaucoup plus importants en période de pic de production laitière. En

effet à cette période on assiste à des traitements massifs à base d'antibiotiques, afin de guérir ou le plus souvent de prévenir certaines affections. Ce qui se répercute directement sur la contamination du lait en résidus d'antibiotiques.

Dans d'autres pays, les pourcentages de contamination sont moyens comme en Afrique où Shitandi (2004) déclare que 14.9 % sont contaminés au Kenya et Abebew Syit, (2011) rapporte que 8.5 % des échantillons sont contaminés en Ethiopie.

En Colombie, Díez *et al.*, en 2013, ont analysé 312 échantillons et 12.8 % se sont révélés positifs par le Delvotest®.

Au Brésil Borges *et al.* (2000) rapporte dans leur étude que 4.3 % des échantillons sont positifs

En Inde, pour Sudershan et Bhat (1998) 9% des échantillons sont positifs.

Et en Turquie, en 1987, Ceyhan et Bozkurt ont réalisé une étude à Ankara sur 200 échantillons et 5.5% étaient positifs.

Dans les pays de l'union européenne, les pourcentages des résultats positifs sont très bas. Ils sont inférieurs à 0.5 % dans les pays de l'ouest (Hillerton and Berry, 2004) ; où en Belgique et Danemark, ils sont de 0.1 % (FSA, 2006), en Espagne ils sont de 0.18 % (Garcia *et al.*, 2001) et au Suède les pourcentages sont entre 0.08-0.26 % (Sternesjo, 1998). De tels résultats témoignent de longues années de contrôle d'inhibiteurs dans le lait. Exemple : en Angleterre et dans les pays de Galles, le contrôle des résidus se fait depuis 1965.

En revanche dans les pays de l'Europe de l'est, les pourcentages sont un peu plus élevés. Ainsi en Croatie, sur un total de 291 411 échantillons, analysés durant l'année 2007, 0.4 % seulement étaient positifs (SLKM, 2008). En république Tchèque le pourcentage de contamination est de 0.5 % et en Lituanie il est de 0.8 % (EC, 2001 ; fivirdauskiene *et al.*, 2004) enfin au Montenegro, plus de 6161 échantillons ont été analysés, et 7.84 % sont positifs (Nikoli *et al.*, 2011).

En analysant les valeurs avancées plus haut, on constate que les pourcentages de contamination sont nettement élevés dans les pays de l'Afrique (dont l'Algérie) et de l'Asie, comparés à ceux de l'Europe où les pourcentages sont nettement plus bas. Ainsi dans les pays où le contrôle des résidus est appliqué de manière rigoureuse, les contaminations sont minimales, en revanche dans les pays où le contrôle se fait d'une manière occasionnelle, la contamination est très importante.

Les travaux réalisés sur le **lait en poudre** restent limités par rapport à ceux du lait de vache. Nos résultats (3.3 % d'échantillons positifs) sont nettement inférieurs à ceux rapportés au Mexique par Tolentino *et al.* en 2005. Ces derniers ont porté une étude sur quatre marques

(A, B, C, D) de laits et les pourcentages de contaminations étaient respectivement de 47.2%, 58.3 %, 44.7 %, et 50 %.

3. Conclusion

D'après les résultats obtenus après analyse des résidus d'antibiotiques par le Delvotest®, nous pouvons conclure que le degré de contamination des échantillons de lait, produit localement, reste assez élevé comparé à celui rapporté dans d'autres pays.

Il est cependant beaucoup plus bas dans le lait importé. La différence est donc nettement significative entre le degré de contamination du lait produit localement et le lait importé, car ce dernier est contrôlé dans le pays producteur ainsi qu'au niveau des frontières.

Cependant les méthodes de détection microbiologiques ne donnent pas une indication sur l'identité de la substance inhibitrice. L'évaluation des risques éventuels d'ordre sanitaire ou technologique, associés à leur présence, passe par une connaissance qualitative et quantitative préalable de ceux-ci. Raison pour laquelle, nous allons poursuivre le travail par une recherche semi quantitative par méthode ELISA et en fin une quantification par HPLC des résultats révélés positifs ou douteux par le Delvotest®.

Chapitre III : Analyse immuno-enzymatique des résidus d'antibiotiques par méthode « ELISA »

1. Matériel et méthode

1.1. Matériel utilisé

1.1.1. Le kit ELISA pour tétracycline

Nous avons utilisé deux kits biopharm-r RIDASCREEN tetracyclin fabriqués en Allemagne pour l'analyse de la totalité des échantillons. Chaque kit permet de réaliser 96 tests. Il est composé de :

La microplaque de 96 puits (12 barrettes de 8 puits sécables) recouverts de conjugué tétracycline / protéine.

La Tétracycline en solution aqueuse: Six standards concentrés, contenant 1,3 ml chacun. Les concentrations sont : 0 ppb (standard zéro), 0,5 ppb, 1,5 ppb, 3 ppb, 6 ppb, 18 ppb.

Le conjugué : 10 mL de conjugué peroxydase-anticorp secondaire, prêts à l'emploi.

L'anticorps anti-tétracycline : 6 mL de la solution, prête à l'emploi.

Le chromogène Pro rouge : c'est une solution de substrat / chromogène, rouge rouillé contient tetramethylbenzidine (quantité 10 mL) prête à l'emploi.

La solution stop : 14 mL de la solution, contient de l'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Le tampon de dilution : 60 mL de tampon, prêt à l'emploi, utilisé pour la dilution des standards et des échantillons.

Le tampon de lavage (sel) : 10 mM, pH 7,4 contient 0,05% de Tween 20 PBS (0,55 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 2,85 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 0,1 % de tween 20.

Quelques photos du kit sont retrouvées sur l'annexe V.

1.1.2. Echantillons

Tous les échantillons de lait de vache (120 échantillons) et de lait en poudre (60 échantillons) ont fait l'objet d'une analyse ELISA.

1.2. Méthode

1.2.1. Principe du test

Le principe du test est la réaction antigène-anticorps. Les puits de microtitration sont revêtus de conjugué tétracycline-protéine.

Les standards de tétracycline ou solutions d'échantillonnage et les anticorps anti-tétracycline sont ajoutés. En effet, une compétition entre la Tétracycline libre et la tétracycline immobilisée, pour les sites de liaison anticorps anti-tétracycline (dosage immunoenzymatique compétitif), se produit.

Les anticorps non liés, sont ensuite éliminés par l'étape de lavage et l'enzyme nommée anticorps secondaire, qui est dirigée contre l'anticorps anti-tétracycline, est ajoutée. Après avoir retiré l'enzyme non liée par l'étape de lavage, la solution substrat /chromogène est ajoutée aux puits et incubée. Le conjugué d'enzyme liée convertit le chromogène en un produit bleu. L'addition du réactif d'arrêt conduit à un changement de couleur du bleu au jaune.

La mesure est réalisée par photométrie à 450 nm. Et l'absorption est inversement proportionnelle à la concentration de tétracycline dans l'échantillon. C'est donc une méthode ELISA type compétitif indirect.

1.2.2. Etapes de l'analyse

1.2.2.1. Préparation des standards et solutions

Les standards sont fournis sous forme de concentrés. Afin de produire des standards de tétracycline prêts à l'emploi, il faut diluer 50 µl de chaque standard concentré (fourni dans le kit) dans 450 µl de tampon de dilution, et bien mélanger au vortex. Les dilutions sont faites ainsi :

Tableau n° 24 : dilutions des standards faites au cours de l'analyse ELISA

	Concentrations initiales	Proportions Standards + tampon	Concentration finales
Standard 1	0 ppb	50 µL + 450µL	0 ppb
Standard 2	0.5 ppb	50 µL + 450 µL	0,05 ppb
Standards 3	1,5 ppb	50 µL + 450µL	0,15 ppb
Standards 4	3 ppb	50 µL + 450µL	0,3 ppb
Standards 5	6 ppb	50 µL + 450µL	0,6 ppb
Standards 6	18 ppb	50 µL + 450µL	1,8 ppb

Pour la préparation du tampon phosphate (10 mM, pH 7,4 contient 0,05% de Tween 20 PBS (0,55 g de NaH₂PO₄* H₂O + 2,85 g de Na₂HPO₄ * 2 H₂O+ 0,1 % de tween 20)), nous avons dissout le contenu total du sachet dans un litre d'eau distillée. Ce tampon de lavage peut être gardé environ 4 - 6 semaines à 2 - 8 ° C.

1.2.2.2. Préparation des échantillons

Cette étape est primordiale. Le lait est dégraissé et ensuite dilué. Deux procédures distinctes sont utilisées : une pour le lait de vache et une autre pour le lait en poudre.

1.2.2.2.1. Lait de vache

Dans la procédure du déroulement du test, le lait de vache ne peut être utilisé tel quel, il faut d'abord, le dégraisser pour pouvoir le diluer par la suite. Pour se faire, nous avons centrifugé les échantillons de lait 10 min à 3000 tours/min. Cette étape nécessite l'utilisation d'une centrifugeuse réfrigérée. A défaut, le lait est porté à 3°C, pour pouvoir, par la suite, enlever complètement la couche de crème supérieure à l'aide d'une pipette Pasteur, pour enfin, diluer le lait écrémé obtenu à 1/10.

Plusieurs auteurs utilisent des dilutions de 16 X ou 20 X avant de procéder à la détection de l'antibiotique par ELISA, dans un but de diminuer, au maximum, les interférences (Aga *et al.*, 2003 ; Dolliver *et al.*, 2008).

1.2.2.2.2. Lait en poudre

En plus des étapes précédemment citées pour le lait de vache, la poudre de lait nécessite davantage une préparation (dissolution), avant le dégraissage et la dilution. En effet, il faut passer par les étapes suivantes :

- Premièrement, 10 g de poudre de lait sont ajoutés à 100 mL d'eau distillée préchauffée à 60°C. Le tout est secoué pendant quelques minutes au vortex. Ensuite le mélange est porté au bain à ultrason, jusqu'à ce que la poudre soit complètement dissoute.
- deuxièmement, le lait en poudre dissout est centrifugé 10 min à 3500 tours/min. ici, aussi, le lait est porté à 3°C avant la centrifugation. La couche supérieure de crème est enlevée complètement avec une pipette Pasteur.
- enfin le lait écrémé est dilué avec le tampon de dilution en mélangeant 50 µL de lait avec 450 µL de tampon.

1.2.2.3. Mode opératoire

Le protocole général de notre analyse passe par l'ensemble des opérations suivantes :

- Insérer les puits sécables dans le support-puits et enregistrer la position de chaque dépôt (standards et échantillons). La position de chaque échantillon et standards sur la plaque est retrouvée sur les tableaux n° 25 et 26 ; annexe II.

- Déposer 50 µL de solution dans chaque puits (standard ou échantillon).
- Ajouter 50 µL de la solution anticorps anti-tétracycline dans chaque puits.
- Mélanger doucement en secouant manuellement la plaque et incuber pendant 1 h à température ambiante (20 à 25 ° C).

N.B : Par mesure de précaution, l'incubation est faite dans une étuve réglée à 25°, et cela durant toutes les incubations nécessaires au cours de l'analyse.

- Après incubation, vider le liquide des puits en renversant vigoureusement la microplaque à trois fois de suite puis égoutter contre du papier absorbant, pour assurer une élimination complète du liquide des puits.
 - Pour le lavage, remplir tous les puits avec 250 µL de tampon PBS-Tween. Cette opération de lavage est répétée deux fois.
 - Ajouter 100 µL/puit de solution contenant le conjugué et mélanger doucement en secouant manuellement la plaque. L'incubation dure 15 min à 20 - 25 °C.
 - Une nouvelle opération de lavage similaire à la précédente est envisagée.
 - Ajouter 100 µL/puit de solution de chromogène. Mélanger et incuber pendant 15 min à 25°C, à l'obscurité.
 - Terminer par l'ajout de 100 µL/puit de la solution stop (solution d'arrêt de la réaction).
- La lecture est faite à 450 nm et doit avoir lieu dans les 30 minutes qui suivent l'addition de la solution stop.

1.2.2.4. Lecture et expression des résultats

Le calcul des résultats peut se faire, soit à l'aide d'un logiciel spécialement conçu à cet effet, soit sur papier semi-logarithmique. Il faut d'abord calculer les pourcentages d'absorbance selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Absorbance du standard (ou échantillon)}}{\text{Absorbance du standard zéro}} \times 100 = \% \text{ absorbance}$$

Ensuite ces pourcentages sont extrapolés sur la courbe des concentrations des standards. La valeur zéro (du standard) est ainsi égale à 100% d'absorbance. Pour les autres valeurs, elle diminue avec l'augmentation des concentrations. Les valeurs calculées pour les normes sont inscrites dans un système de coordonnées sur papier graphique semi-logarithmique en terme de la concentration de tétracycline [µg / kg]. Afin d'obtenir la

concentration réelle en $\mu\text{g} / \text{kg}$ de tétracycline contenue dans un échantillon, la concentration prise à partir de la courbe d'étalonnage doit être encore multipliée par le facteur de dilution de 10 pour le lait de vache et de 100 pour le lait en poudre (recommandations précisées sur le kit de dosage).

2. Résultats et discussion

Le Delvotest®, précédemment utilisé pour une recherche qualitative des résidus d'antibiotiques dans le lait, présente une sensibilité diminuée vis-à-vis des tétracyclines (Aggad *et al.*, 2009 ; Navratilova, 2008 ; Althaus *et al.*, 2003 ; Botsoglou et Fletouris, 2001). C'est pourquoi nous avons recherché l'oxytétracycline par méthode immuno-enzymatique (ELISA).

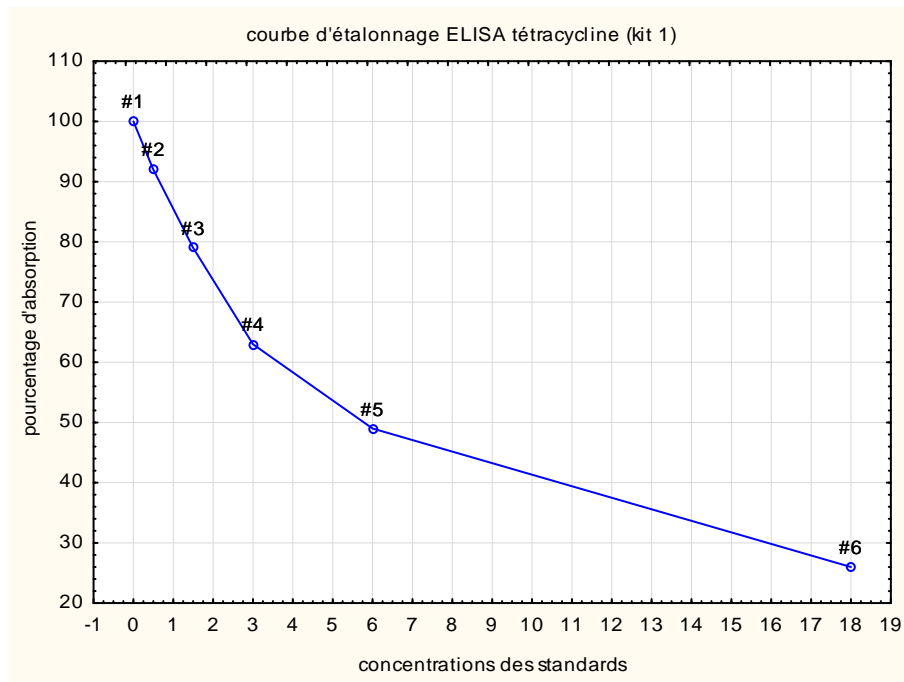
Pour réaliser l'analyse de 120 échantillons de lait de vache et 60 échantillons de lait en poudre, nous avons utilisé deux kits de 96 puits chacun.

Après lecture sur microplaque, les valeurs obtenues correspondent à l'absorbance, à 450 nm. Cette dernière est inversement proportionnelle à la quantité d'oxytétracycline présente dans les échantillons ; plus l'antibiotique est présent, moins l'absorbance est grande.

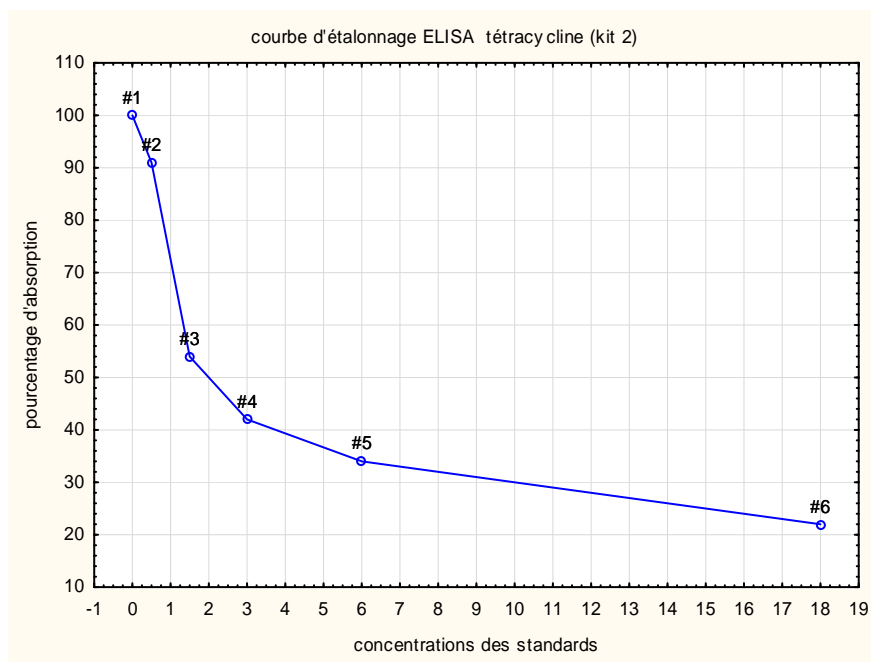
Nous avons calculé par la suite les pourcentages d'absorbance selon la formule citée plus haut. La courbe d'étalonnage est établie sur les pourcentages d'absorption des standards en fonction de leurs concentrations respectives. Et les concentrations des échantillons sont obtenues en extrapolant les pourcentages d'absorbance, sur la courbe d'étalonnage, sur papier semi-logarithmique exprimées en $\mu\text{g/L}$.

La courbe du premier kit est représentée sur le graphe n°1 et pour le deuxième kit sur le graphe n°2.

Les pourcentages d'absorption ainsi que les concentrations d'oxytétracycline obtenus par échantillon de lait sont retrouvés sur les tableaux n° 25 ; annexe II pour la première microplaque et sur le tableau n° 26 ; annexe II pour la deuxième microplaque.



Graph n° 1 : courbe d'étalonnage de la méthode ELISA pour le kit 1, représentant les concentrations des standards ($\mu\text{g/L}$) en fonction des pourcentages d'absorbance.



Graph n° 2 : courbe d'étalonnage de la méthode ELISA pour le kit 2, représentant les concentrations des standards ($\mu\text{g/L}$) en fonction des pourcentages d'absorbance.

Sur les 120 échantillons de lait de vache, 36 contiennent des résidus d'oxytétracycline.
Soit un pourcentage de 29.16 %.

Les concentrations d'oxytétracycline obtenues varient de 5,3 à 74 µg/L, soit des valeurs inférieures à la limite maximale de cet antibiotique dans le lait, qui est de 100 µg/L.

Les concentrations d'oxytétracycline pour les 36 échantillons de lait sont représentées sur le tableau ci-dessous.

Tableau n° 27 : concentrations d'oxytétracycline par échantillons de lait obtenues après analyse ELISA

échantillons	A5	A6	A8	A9	B4	B10	H2	H3	H4	H7
Concentration (µg/L)	18	22	20	15	15	15	25	42	20	25
échantillons	H9	H10	J3	J4	J8	J10	C3	C10	D1	D8
Concentration (µg/L)	16	15	5,3	25	65	18	18	18	18	15
échantillons	E1	E5	E6	E9	F1	F2	F3	F4	F6	F7
Concentration (µg/L)	45	25	46	15	30	22	25	40	40	52
échantillons	F8	F9	G10	G9	G6	G5				
Concentration (µg/L)	60	12	15	30	74	18				

Minimum, maximum

Les échantillons contenant des résidus d'oxytétracycline seront confirmés par chromatographie liquide haute performance.

Pour les échantillons de lait en poudre, les concentrations obtenues ne sont pas significatives. Les valeurs sont proches du zéro.

Toutes les concentrations obtenues par analyse ELISA, pour le lait de vache et le lait en poudre, sont regroupées sur les tableaux n° 25 et 26 ; annexe II.

La méthode ELISA est utilisée à travers le monde, pour la recherche et l'identification des résidus d'antibiotiques dans le lait. Plusieurs travaux en témoignent :

Ainsi, dans une étude réalisée par Abhishek Gaurav *et al.*, en 2014, les auteurs ont employé le même kit utilisé au cours de notre étude pour la recherche des tétracyclines dans le lait. Sur 133 échantillons, 18 contenaient des résidus de tétracyclines à des concentrations entre 16-134.5 ppb ; où 3 échantillons seulement excédaient la LMR.

La différence de sensibilité entre les tests disponibles sur le marché possède un impact direct sur la détection des résidus d'antibiotiques dans le lait (Adesiyun *et al.*, 1997). C'est ainsi que différentes situations à travers le monde ont été rapportées :

En 2010, Ergin Kaya *et al.* ont rapporté que 1.25% des échantillons seraient positifs aux tétracyclines en Turquie. Or une étude portée sur 60 échantillons par Unusan (2009)

révèle que 40 échantillons contenaient des résidus de tétracyclines mais à des valeurs inférieures aux LMR.

En Corée, sur 478 échantillons, 5% se sont révélés positifs (Chang- Soo *et al.*, 1996).

En Iran, Karamibonari et Movassagh en 2011, ont utilisé la méthode ELISA pour la recherche de la Tylosine dans le lait pasteurisé, et ont trouvé que 63% des échantillons étaient contaminés, mais à des seuils inférieurs à la LMR.

Une étude menée en République Tchèque, indique que 50.6% des échantillons sont contaminés mais avec des concentrations inférieures aux LMR (Navratilova *et al.*, 2009).

Or dans une autre étude en Macédoine, la limite des résidus d'oxytétracycline est dépassée : 149.1 µg/kg (Elizabeta *et al.*, 2011).

Une autre étude au Kuwait, sur le lait importé et le lait produit localement, indique que 29.1% des échantillons sont contaminés à des valeurs supérieures aux LMR (Alomirah *et al.*, 2007).

Une étude récente, en Chine (Zhang *et al.*, 2014), portée sur 94 échantillons de lait UHT et 26 échantillons de lait pasteurisés, révèle une contamination de 0 et 7.7% respectivement à des valeurs supérieures aux LMR.

Enfin, Bilandfi *et al.* en (2011) ont travaillé sur 119 échantillons et les valeurs retrouvées se sont avérées plus basses que la limite maximale de tétracycline dans le lait. Avec un maximum de 49.5 µg/kg et la moyenne des concentrations retrouvées est 35 fois inférieure à la LMR.

D'après les travaux cités ci-dessus, on constate que la technique ELISA est à la fois une méthode qualitative qui permet la détection des résidus d'antibiotiques et donner ainsi des pourcentages de contamination. Mais c'est aussi une technique qui permet de caractériser la molécule responsable de la contamination et de quantifier les résidus d'antibiotiques dans le lait à des seuils inférieurs aux LMR.

3. Conclusion

Les méthodes immuno-enzymatiques sont utilisées pour la recherche et l'identification des résidus d'antibiotiques dans le lait. La méthode est sensible et spécifique pour la recherche des tétracyclines dans le lait.

Sur les 180 échantillons analysés, 20 % des échantillons contenaient des résidus d'oxytétracycline dans le lait, mais à des valeurs inférieures aux LMR. Cependant pour plus d'exactitude, le travail sera poursuivi par une confirmation par HPLC.

Chapitre IV : Analyse quantitative des résidus pénicilline G et d'oxytétracycline par HPLC

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel utilisé

1.1.1. Description de l'HPLC de l'étude

L'appareil est composé de :

- **Dégazeur** : il sert à éliminer les gaz éventuellement introduit dans l'appareil au moment des manipulations (Shimadzu Corporation, 2006).
- **Deux pompes** : les pompes permettent aux solvants (phase mobile et échantillons) de progresser depuis le départ (réservoirs de phase mobile ou boucle d'échantillonnage) jusqu'à l'expulsion, cela se fait sous un débit préalablement réglé (Shimadzu Corporation, 2006).
- **Deux détecteurs UV** : elles sont munies chacune d'une lampe Deutérium ayant un spectre d'absorption compris entre 190 et 350 nm (Shimadzu Corporation, 2006).
- **Un système de contrôle ou intégrateur** : il coordonne et interprète des signaux envoyés par les différents modules de la HPLC (Shimadzu Corporation, 2006).
- **Un enregistreur (supports informatiques)** : supportant un logiciel (CLASS-VP) ce dernier contrôle tous les modules de l'appareil HPLC.
- **Une colonne** : elle est de type VP-ODS 250 L*40, c'est une colonne remplie de gel de silice greffé ; colonne C18 en phase inverse (Shimadzu Corporation, 2006).
- **Une boucle d'injection** : capacité maximale de 20 µL (Shimadzu Corporation, 2006).
- **Deux réservoirs de la phase mobile** : Ce sont deux flacons en verre, le premier contient le solvant dans lequel plonge deux filtres reliés aux pompes par des tuyaux et le deuxième sert à recueillir le solvant après purgation.
- **Tuyauterie** : Tuyaux en plastiques de faible diamètre, qui permet la progression de la phase liquide dans les différents compartiments de l'appareil.

1.1.2. Autres matériel

- **Centrifugeuses** : vitesse maximale 6000 tours/min.
- **Dispositif de filtration** : l'appareil de filtration est composé d'un réservoir en verre, d'une capacité de 250 mL, d'un flacon en fuseau en verre, d'une capacité 1000 mL, d'une pince pour immobiliser le réservoir et le flacon, d'un tamis, un joint d'étanchéité, une membrane en nylon ; porosité (0.45 µm x 47 mm) et enfin d'une pompe à vide : Knf LAB, Laboport.

- **Seringues d'injection** : Celles-ci possèdent des capacités comprises entre 20 et 50 μ l.
- **Filtres** : Deux types de filtres ont été utilisés :
 - membrane en nylon de porosité (0.45 μ m x 47 mm)
 - papier Whattman
- **Pipettes** : capacité : 5, 10 et 20 mL.
- **Balance analytique** : SCALTEC, précision 0.1 mg.
- **Vortex** : Modèle Richard Wolf GmbH.
- **Flacons en verre ombrés** : stérile, utilisés pour stocker les dilutions des standards ainsi que les solutions obtenues après extraction.

1.1.3. Produits chimiques

1.1.3.1. Standards d'antibiotiques

- **Standard de pénicilline G** : potassium salt Vetranal, Riedel-de Haën, Laborchemikalien GMBH, Sigma-Aldrich.
Formule chimique : $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$.
- **Standard oxytétracycline** : Oxytetracyclin Hydrochloride Veteranal, sigma-aldrich.

1.1.3.2. Autres produits chimiques

- **Méthanol** : Chromosolv pour chromatographie liquide haute performance, Sigma-Aldrich.
- **Acétonitrile** : acétonitrile pour HPLC grade, Biochem. Chemopharma.
- **Eau pour HPLC** : Chromosolv plus pour HPLC, Sigma-Aldrich.

1.1.4. Échantillonnage

Dans ce chapitre nous avons utilisé trois sortes d'échantillons de lait de vache pour trois manipulations différentes :

- Le premier concerne l'échantillon de lait employé au cours des essais d'extraction, il s'agit d'un lait de vache prélevé sur une ferme individuelle située dans la région de Constantine. Le lait est prélevé dans des conditions hygiéniques rigoureuses et est présumé exempt de résidus d'antibiotiques.
- Le second est utilisé au cours des essais d'étude de la cinétique des antibiotiques après injection par voie parentérale. Le lait est prélevé après 4, 7 et 12 jours qui suivent l'injection en respectant les conditions d'hygiène et de conservation des échantillons.

- Le troisième concerne les échantillons de lait analysés au cours de la recherche des résidus d'antibiotiques dans les laits consommés dans la région de Constantine. L'échantillonnage est composé dans ce cas de 48 échantillons de lait de vache produit localement. Ces échantillons sont ceux révélés positifs ou douteux par les tests qualitatifs précédemment employés (voir chapitre II et chapitre III de la partie pratique) et sont sélectionnés parmi les 180 échantillons de lait de vache et de lait en poudre concernés par l'étude.

1.2. Méthodes

1.2.1. Optimisation des paramètres d'analyse

Avant de détecter et de quantifier les résidus de pénicilline et d'oxytétracycline dans le lait, il a fallu procéder, à l'étalonnage de l'appareil HPLC, à l'aide de standards d'antibiotiques.

Les standards sont accompagnés de prospectus, sur lesquels sont mentionnées des conditions d'analyse préconisées. En utilisant ces paramètres, les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants. Car, pour obtenir des résultats identiques, il faut reproduire les mêmes conditions d'analyse du fournisseur. Nos conditions ne sont pas les mêmes, raison pour laquelle, nous avons procédé à l'optimisation des paramètres d'analyse HPLC à savoir : le solvant de dilution du standard, la phase mobile, la longueur d'onde, le débit et le volume d'injection.

1.2.2. Examens de fiabilité de la méthode

La validation de notre méthode d'analyse doit passer par la réalisation des tests suivants : la répétabilité, la reproductibilité et la linéarité de la courbe d'étalonnage.

1.2.2.1. La répétabilité

C'est la réalisation de la méthode par la même équipe et le même laboratoire ; c'est à dire des conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essais identiques, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (ISO 3534-1, ISO 5725-1 ; cité par Anonyme. a, 2006).

Pour tester la répétabilité des résultats obtenus, pour les deux molécules, nous avons effectué trois séries de 5 essais, le même jour, avec la même solution de travail, le même opérateur, le même lieu, le même équipement et avec les mêmes conditions d'analyse. Les résultats obtenus, exprimés en surfaces de pics, sont ensuite soumis aux tests statistiques de Student (Berrah, 1984).

1.2.2.2. La reproductibilité

Dans ce cas, les essais sont réalisés dans des conditions différentes ; au moins un des paramètres suivants est modifié volontairement : opérateur, appareil, mise en solution, temps... (ISO 3534-1, ISO 5725-1 ; cité par Anonyme. a, 2006).

Pour tester ce paramètre, nous avons réalisé 3 séries d'analyse, ces dernières sont effectuées par deux opérateurs différents, avec trois solutions de travail différentes (une pour chaque série) et à quelques jours d'intervalles. Chaque série comprend 20 essais dont les surfaces seront soumises aux tests statistiques de Student (Berrah, 1984).

1.2.2.3. La linéarité de la courbe d'étalonnage

La linéarité de la variation des hauteurs de pics (surfaces) en fonction de la variation des concentrations du produit injecté doit être vérifiée pour chaque composé.

Les coefficients de corrélation entre hauteurs des pics et concentrations, ainsi que les paramètres des droites de régression linéaire correspondantes doivent être calculés (ISO 3534-1, ISO 5725-1 ; cité par Anonyme. a, 2006).

Pour établir la courbe de linéarité et déterminer la droite de régression ; nous avons préparé, pour chaque molécule cinq dilutions à partir des solutions mères. La courbe obtenue correspond aux surfaces des pics en fonction des concentrations correspondantes.

1.2.3. Méthode d'extraction des antibiotiques dans le lait

Afin de pouvoir détecter les résidus d'antibiotiques dans le lait par chromatographie haute performance liquide, nous avons adopté une technique d'extraction des antibiotiques à partir de différentes méthodes préconisées (Diaz *et al.*, 2007 ; Helio *et al.*, 2007 ; Pilar *et al.*, 2007). La méthode repose sur le principe suivant :

Mélange de 10 mL de lait + 20 mL d'acétonitrile + 6 mL d'eau pour HPLC.

Le tout est réparti en quatre tubes, mélangé au vortex pendant 1 minute puis centrifugé pendant 10 min à 6000 tours/min.

Après la première centrifugation, les surnageants (portions aqueuses) des 4 tubes sont recueillis puis filtrés avec les filtres de papier Wattman.

Les surnageants ainsi filtrés sont ajoutés et mélangés avec 20 mL d'acétonitrile, repartis en 4 tubes, mélangés au vortex pendant 1 min et centrifugés pendant 5 min à 3000 tours/min.

Après cette deuxième centrifugation les portions aqueuses sont récoltées à nouveau puis filtrées deux fois ; la première avec un filtre de Wattman et la deuxième avec un filtre en membrane nylon de porosité (0.45 µm/ 47 mm).

Pour tester la fiabilité de la méthode d'extraction, nous avons utilisé un lait prélevé d'une ferme individuelle (wilaya de Constantine). Le lait est présumé exempt d'antibiotiques.

L'échantillon de lait est divisé en trois parties E1, E2 et E3 :

- l'échantillon E1 est dopé avec le standard de pénicilline.
- l'échantillon E2 est dopé avec le standard d'oxytétracycline.
- l'échantillon E3 est laissé comme témoin.

1.2.4. Essai d'étude de la cinétique des antibiotiques après injection par voie parentérale

Dans un but de tester la cinétique des résidus d'antibiotique après une injection par voie parentérale, nous avons injecté une dose d'oxytétracycline à une vache laitière (la dose est calculée en fonction du poids de l'animal). Le lait est ensuite récolté après 4, 7 et 12 jours qui suivent l'injection.

Par la suite, nous avons appliqué la méthode d'extraction, préalablement décrite, aux échantillons de lait, afin d'être analysés par HPLC pour la recherche et la quantification de la molécule d'oxytétracycline.

1.2.5. Analyse des échantillons de lait de vache commercialisés à Constantine

Un total de 48 échantillons de lait de vache sont analysés, en vue de la recherche et de la quantification de l'oxytétracycline et de la pénicilline G dans le lait.

La recherche a concerné seulement les échantillons révélés positifs ou douteux par tests qualitatifs et semi-quantitatifs (le Delvotest® et ELISA) précédemment utilisés (voir chapitre II et chapitre III de la partie pratique).

La recherche des antibiotiques est faite à température ambiante (Fusawa, 2013), en appliquant la méthode d'extraction adaptée ainsi que les paramètres d'analyse optimisés, propre à chaque molécule d'antibiotique (voir plus bas ; les paramètres retenus pour la détection et la quantification des résidus de pénicilline et d'oxytétracycline).

1.2.6. Protocole général d'analyse HPLC

1.2.6.1. Préparation des solutions

Cette étape concerne la préparation des standards et des échantillons :

Les standards en poudre sont dilués, afin d'obtenir des solutions de travail, à des concentrations bien déterminées. Pour la préparation de la pénicilline, nous avons mélangé 4 mg de standard avec 26.66 ml de solvant (méthanol ou acétonitrile) pour obtenir une concentration de 0.15 mg/mL (concentration mentionnée sur le prospectus). Pour l'oxytétracycline, nous avons mélangé 4 mg de standard avec 10 mL de solvants afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 0.4 mg/mL.

Pour l'analyse des échantillons réels de lait, nous avons appliqué la méthode d'extraction et de purification, afin d'obtenir des solutions pures et déprotéinisées, qui pourront être, par la suite, directement injectée dans l'appareil.

1.2.6.2. Opération de filtration

La filtration des solvants est une opération effectuée quotidiennement avant toute manipulation. Cette étape est primordiale en analyse HPLC car elle permet d'éliminer toutes les impuretés présentes dans les solutions (solvants) et d'éviter ainsi la survenue d'artefacts sur les chromatogrammes.

1.2.6.3. L'analyse HPLC

1.2.6.3.1. Démarrages des modules HPLC

L'appareil est relié à un onduleur (pour stabiliser le courant qui alimente tout le système), allumage de l'onduleur puis des modules, toujours dans un ordre bien déterminé.

1.2.6.3.2. Etapes de l'analyse

Après filtration de la phase mobile, cette dernière est mise dans des réservoirs (flacons en verre spéciaux). Il faut ensuite procéder à la purge de l'appareil avec le solvant (Méthanol ou acétonitrile) pour éliminer les bulles d'air ainsi que les impuretés éventuellement présents dans le circuit, cette opération se fait régulièrement au début et à la fin des analyses.

L'analyse des échantillons passe toujours par l'ensemble des opérations suivantes :

A) Création de la méthode d'analyse

Cette opération nous permet de définir les paramètres de l'analyse avec lesquels nous désirons travailler et comprend les étapes suivantes :

- les pompes : il faut préciser le débit, la pression maximale ainsi que le mode de fonctionnement des pompes (isocratique ou mode gradient) : pour notre étude, nous avons

opté pour le mode isocratique car l'analyse nécessite l'utilisation d'une seule phase mobile.

- les détecteurs : la présence de deux détecteurs nous a permis de travailler avec deux longueurs d'ondes différentes qu'il faut régler au préalable.
- il faut régler ensuite le temps de l'analyse.
- le tout est enfin sauvegardé sous un nom propre à la méthode.

B) Lancement de l'analyse

Cette opération fait démarrer les pompes automatiquement, il faut ensuite attendre un laps de temps pour permettre à la pression des pompes de se stabiliser, une fois que la pression est stable, l'injection peut être faite et l'analyse est ainsi lancée.

C. Fin de l'analyse et enregistrement du chromatogramme

Après l'écoulement du temps d'analyse, le chromatogramme obtenu est enregistré et sauvegardé dans un fichier.

1.2.7. Expression des résultats

Nous avons appliqué le test de comparaison des moyennes t de Student pour la réalisation des tests statistiques (Berrah, 1984).

1.2.7.1. Les tests statistiques

Pour vérifier la répétabilité et la reproductibilité des résultats obtenus, pour les deux molécules, nous avons eu recours aux tests de comparaison des moyennes de Student ; nous avons comparé les trois séries, deux à deux, pour voir si la différence entre elles est significative ou pas.

Nous avons calculé la moyenne, l'écart-type et la variance à partir des surfaces obtenues pour calculer ensuite le t de Student et le comparer avec les valeurs indiquées sur la table de Student, aux risques choisis (Berrah, 1984). Les calculs sont détaillés sur l'annexe IV.

Nous avons calculé également l'intervalle de confiance pour les séries de reproductibilité selon la formule décrite sur l'annexe IV.

Le même test est appliqué pour comparer les valeurs (concentrations d'antibiotique) d'oxytétracycline, obtenues par la méthode ELISA, et celles retrouvées par HPLC.

2. Résultats et discussion

2.1 Résultat de l'étape d'optimisation

L'optimisation représente la première étape d'une analyse HPLC. C'est une étape clé, qui permet de fixer les paramètres de recherche et de quantification, des deux molécules d'antibiotiques recherchées.

Les investigations expérimentales ont permis d'optimiser les paramètres suivants :

2.1.1. La phase stationnaire

Durant toute notre étude, nous avons travaillé avec une colonne VP-ODS 250L 40, remplie de gel de silice greffé : colonne C18 en phase inverse. Cette phase est apolaire et nécessite l'emploi de solvant polaire comme par exemple : l'eau extra pure, l'acétonitrile ou encore le méthanol.

L'utilisation de telle phase pour la recherche des antibiotiques est recommandée. Plusieurs auteurs l'ont choisi, comme : Gómez-Jimenez *et al.* en 2008, Schneider *et al.* en 2007, Furusawa en 2003.

2.1.2. Optimisation de la phase mobile

Le mode isocratique est adopté durant toutes les analyses, car nous effectuons des recherches simples (une seule molécule d'antibiotique) ne nécessitant pas la réalisation d'un gradient d'élution.

- La pénicilline G

Pour optimiser ce paramètre, nous avons testé trois types de phases mobiles : la première est un mélange de 75 % eau pour HPLC + 25 % acétonitrile (cette combinaison est recommandée par le fournisseur), les deux autres sont composées de 100 % d'acétonitrile et de méthanol respectivement.

A l'issue du premier essai, les résultats ne sont pas satisfaisants ; nous avons constaté que cette phase a un aspect huileux, ce qui a fait augmenter la pression des pompes, de même le chromatogramme présente de nombreux artefacts. Toute la difficulté de la méthode chromatographique est donc de faire le bon choix de phases, en fonction des composés à séparer, tout en évitant un excès de pression.

Plusieurs auteurs utilisent une phase mobile de composition complexe comme : Msagati et Nindi en (2005) qui ont utilisé une phase mobile constituée de mélange de 75 %

eau pour HPLC + 25 % méthanol + acide acétique, Oruç et Sonal (2005) ont utilisé un mélange composé de méthanol, d'acétonitrile et d'un tampon constitué de potassium dihydrogenphosphate et Shalini (2002) a quant à lui utilisé un mélange composé d'eau, de méthanol et de tampon phosphate sans préciser les proportions de chaque composé.

Pour les deux autres phases mobiles (acétonitrile et méthanol), nous avons obtenu de bons résultats dans les deux cas. Ce qui nous laisse le choix de l'utilisation de l'une ou de l'autre selon la disponibilité.

Pour la recherche des résidus de pénicilline dans le lait, certains auteurs ont également opté pour des phases mobiles simples, comme Popelka *et al.*, 2003 ; Furusawa (2000) ; Boatto *et al.* (1998) qui ont utilisé l'acétonitrile avec le tampon phosphate.

- **L'oxytétracycline**

Pour cet antibiotique, nous avons testé deux phases mobiles : la première est composée de 100 % d'acétonitrile et la deuxième 100 % de méthanol. Seule la première est retenue car c'est celle qui a donné les meilleurs chromatogrammes avec une ligne de base droite et les pics très fins.

En théorie, certains auteurs, comme Reed en (2004), Wang *et al.* en (2004) et Cinquina *et al.* en (2003); préconisent une phase mobile composée d'acétonitrile mais en présence de méthanol. D'autres ont opté pour des phases mobiles de composition simple, comme en 2013 Furusawa, qui a testé une phase mobile composée de 100 % d'eau et qui a donné des résultats satisfaisants. En 2008, Hu *et al.* ont utilisé une phase mobile composée uniquement de méthanol, or Kaale *et al.*, ont utilisé une phase mobile composée d'un mélange d'acide acétique-eau (pH ajusté à 4.5 avec l'hydroxide de sodium)-acétonitrile. Enfin, pour Dimitrieska-Stojkovic *et al.*, (2011), la phase mobile est composée d'acide oxalique-méthanol-acétonitrile.

Pour la recherche des tétracyclines dans le lait, la phase mobile peut-être de composition simple ou complexe, avec ou sans la présence de tampon.

2.1.3. Optimisation de la longueur d'onde

- **La pénicilline**

Nous avons testé plusieurs longueurs d'ondes dans un spectre allant de 190 à 330 nm.

Notre appareil est muni de deux détecteurs, ce qui nous a donc permis de travailler sur deux longueurs d'ondes différentes, dans un même essai.

D'après les essais effectués pour optimiser la longueur d'onde, nous avons constaté que la pénicilline G absorbe dans un spectre allant de 190 à 330 nm. Cependant l'absorption est meilleure à 250 nm, car à cette longueur d'onde les surfaces de pics sont plus importantes ; c'est la raison pour laquelle nous avons gardé cette dernière pour la suite de notre expérience.

Notre constatation concorde plus au moins avec quelques résultats rapportés par des auteurs. En effet Samanidou *et al.* (2007) ont travaillé sur une longueur de 240 nm. D'autres ont choisi des longueurs allant de 210 à 325 nm comme par exemple : Oruç et Sonal (2005) : 210 nm, Boatto *et al.* (1998) : 214 nm, Tarbin *et al.* (1995) : 320 et enfin, Popelka *et al.*, (2003) ; Furusawa (2000) : 325 nm.

Les résultats avancés par ces travaux témoignent d'avantage que la recherche de la pénicilline G peut se faire dans un spectre large. Chaque auteur fixe la longueur d'onde en fonction de l'absorbance optimale. Par ailleurs la longueur d'onde choisie doit être maintenue sur la totalité des analyses.

- **L'oxytétracycline**

Dans ce cas aussi, nous avons testé plusieurs longueurs d'onde dans une fourchette allant de 200 à 370 nm.

La longueur d'onde retenue pour détecter et quantifier l'oxytétracycline est 325 nm. Cette longueur d'onde a été choisie parmi plusieurs, car elle permet une meilleure absorbance.

Le choix de telles longueurs d'onde élevées est justifié par son utilisation par d'autres auteurs. Ainsi, en 2004 Reed *et al.* ont préconisé une longueur d'onde de 350 nm, Coyne *et al.* ont utilisé en 2004 une longueur d'onde de 353 nm, Furusawa en 2003 a utilisé 357 nm, enfin, Dimitrieska-Stojkovic *et al.*, (2011) et Cinquina *et al.*, (2003) utilisait 365 nm pour rechercher l'oxytétracycline dans le lait.

Cela confirme que pour rechercher l'oxytétracycline dans le lait, il faut opter pour des longueurs d'onde qui dépasseraient les 300 nm.

2.1.4. Optimisation du débit

- **La pénicilline G**

Pour optimiser ce paramètre, nous avons testé plusieurs débits dans une fourchette allant de 0.8 à 1.6 mL/min.

Par définition le débit correspond au volume de la phase mobile circulant au travers de la colonne chromatographique par unité de temps (mL.min⁻¹) (Anonyme. b, 2006).

Nous avons remarqué que le débit agit directement sur le temps d'apparition des pics ; l'augmentation du débit diminue ce dernier et vice-versa ainsi :

- avec un débit de 0.8 ml/min, le pic apparaît à 4.95 min,
- avec un débit de 1 ml/min, le pic apparaît à 3.98 min,
- avec un débit de 1.2 ml/min, le pic apparaît à 3.28 min,
- avec un débit de 1.4 ml/min, le pic apparaît à 2.83 min,
- avec un débit de 1.6 ml/min, le pic apparaît à 2.48 min.

La même remarque était rapportée par Furusawa (2013) qui a précisé que le débit agit seulement sur le temps d'apparition du pic et qu'il n'agit nullement sur la surface (l'amplitude des pics).

C'est ainsi que nous avons choisi le débit de 1 mL/min pour la suite de notre expérience. Ce débit permet de maintenir la pression des pompes à des valeurs pas assez élevés.

Le même débit a été choisi par plusieurs auteurs tels : Boatto *et al.* (1998) ; le temps de d'apparition du pic était de 4.24 min. Furusawa (2000), le temps d'apparition était de 4.8 min, enfin Oruç et Sonal (2005), mais ici le pic apparaît à 7.1 min. Cette différence peut être expliquée par le changement de plusieurs paramètres parmi lesquels : la composition de phase mobile, la longueur de la colonne, le calibre de la tuyauterie à titre d'exemple.

- **L'oxytétracycline**

Les débits testés sont compris entre 0.5 et 2 mL/min. Nous avons choisi le débit de 1.5 mL/min. Ce choix est justifié par le fait que le débit n'a pas une grande influence car il agit surtout sur le temps de rétention.

Ce débit est différent de celui qui a été utilisé dans d'autres travaux. Ainsi, Wang *et al.*, 2004 ; Cinquina *et al.*, 2004, ont utilisé un débit de 1 mL/min. Cependant, Reed *et al.*, 2004 ont utilisé un débit de 1.2 mL/mn. Cette disparité du choix des débits entre les auteurs est expliquée par plusieurs hypothèses qui peuvent être avancées, comme la pression des pompes qui doit être maintenue à des valeurs relativement basses, or l'augmentation du débit accroît la pression.

2.1.5. Optimisation du volume d'injection

- La pénicilline G

Notre boucle d'échantillonnage a une capacité maximale de 20 μL . Nous avons donc testé des volumes allant de 5 à 20 μL .

Selon Anonyme. a (2006) l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé, effectivement nous avons remarqué que le volume injecté agit sur l'amplitude des pics (et donc sur la grandeur des surfaces) et non sur le temps d'apparition. Ainsi la surface obtenue avec un volume de 10 μL par exemple est doublée avec 20 μL .

Dans notre travail, nous avons gardé la valeur de 20 μL comme volume à injecter.

En théorie ; Oruç et Sonal (2005) et Msagati et Nindi (2005) ont utilisé respectivement des volumes d'injection de 10 et 20 μL mais dans la plupart des travaux les surfaces correspondantes aux volumes ne sont pas signalées d'où la difficulté de comparaison.

- L'oxytétracycline

Les volumes testés étaient dans un intervalle de 1 à 20 μL . La valeur retenue est de 11 μL .

Plusieurs volumes peuvent être employés, ainsi Hu *et al.* en 2008 ont choisi 10 μL , Babic *et al.* en 2006 ont quant à eux travaillé avec 20 μL .

Les volumes peuvent être variables selon les auteurs, mais chaque auteur doit garder le même volume durant toutes les manipulations, car chaque changement se répercutera directement sur la quantification de la molécule à doser.

2.2. Paramètres retenus pour détecter et quantifier les résidus de pénicilline G et d'oxytétracycline

Nos investigations expérimentales nous ont permis de retenir les paramètres d'analyse suivants :

2.2.1. Pour la pénicilline G

- phase stationnaire : colonne C18 en phase inverse (Gel de silice greffé),
- phase mobile : méthanol,
- volume injecté : 20 μL ,
- longueur d'onde : 250 nm,
- débit : 1 mL/min,

- temps d'analyse : 8 min.

2.2.2 Pour l'oxytétracycline

- phase stationnaire : colonne C18 en phase inverse (Gel de silice greffé),
- phase mobile : acétonitrile,
- volume injecté : 11 μ L,
- longueur d'onde : 325 nm,
- débit : 1,5 mL/min,
- temps d'analyse : 8 min.

À l'issue de cette optimisation, et en appliquant les paramètres énumérés ci-dessus, nous avons obtenu les chromatogrammes suivants, représentés sur la figure n° 13 pour l'oxytétracycline et sur la figure n° 14 pour la pénicilline G.

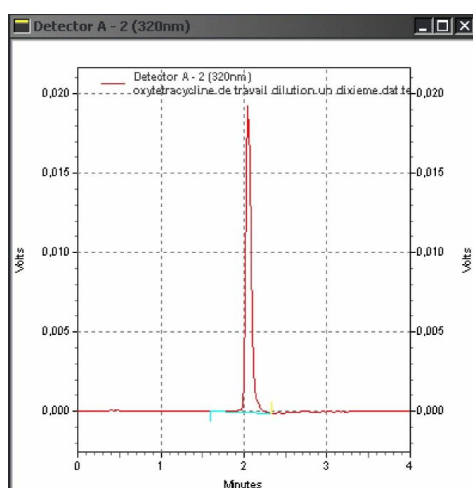


Figure n° 13 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus de l'oxytétracycline

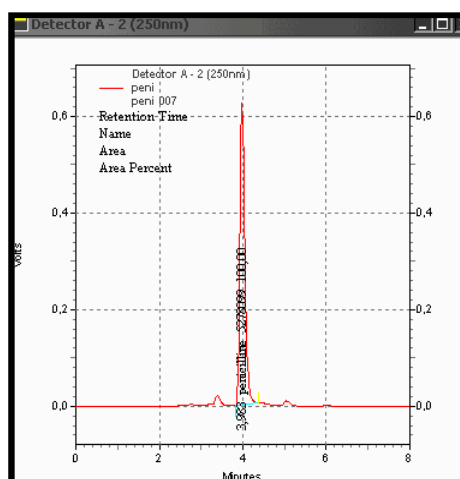


Figure n° 14 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus de la pénicilline G

2.3. Fiabilité des méthodes d'analyse optimisées

L'examen de la fiabilité de la méthode est un élément essentiel en analyse HPLC. Il permet de tester la crédibilité du système utilisé (appareillage et solutions) (Furusawa, 2013).

2.3.1. La répétabilité

- La pénicilline G

Nous avons calculé la moyenne, la variance et l'écart-type pour les trois séries (tableau n° 28), pour un effectif de 5 analyses. Afin de calculer par la suite le t de Student et le comparé avec les valeurs de la table de Student aux risques choisis.

Tableau n° 28 : calculs statistiques de répétabilité de la pénicilline G (valeurs exprimés en surfaces de pics)

	Série 1	Série 2	Série 3
Moyenne	9536934,2	9518480,6	9544828,6
Écart-type	132591,55	171943,39	93079,48
Variance	17580520256	29564530647	8663791447
t Calculé	$t(1 \& 2) = 0.1$		$t(2 \& 3) = 0.11$
	$t(1 \& 3) = 0.04$		

Aux risques de 1 et 5 %, les valeurs de la table de Student sont respectivement 4.6 et 2.78, soit toujours supérieures aux valeurs enregistrées sur le tableau n° 28, donc pas de différence significative entre les trois séries et la méthode est ainsi répétable dans les conditions d'analyse requises.

- L'oxytétracycline

La même procédure a été employée pour l'oxytétracycline, nous avons calculé la moyenne, l'écart-type, la variance et le t de Student (tableau n° 29).

Tableau n° 29 : calculs statistiques de répétabilité pour l'oxytétracycline (valeurs exprimés en surfaces de pics)

	Série a	Série b	Série c
Moyenne	46134,2	45051,3	45982,0
Ecart-type	2557,08	2748,77	2810,47
Variance	7231525494	3317104972	3285151967
T calculé	$t(a \& b) = 0.72$		$t(b \& c) = 0.68$
	$t(a \& c) = 0.39$		

Dans ce cas également, les valeurs de t calculé sont inférieurs à celles de la table de Student, et la méthode est ainsi répétable dans nos les conditions d'analyse.

2.3.2. La reproductibilité

- La pénicilline G

La moyenne, l'écart-type, la variance et l'intervalle de confiance des trois séries de reproductibilité de la pénicilline G sont illustrés dans le tableau n° 30. Chaque série comprend 20 analyses.

Tableau n° 30 : Résultats des calculs statistiques de reproductibilité de la pénicilline G (valeurs exprimés en surfaces de pics)

	Série A	Série B	Série C
Moyenne	1025413,9	1028475,35	1025029,2
Écart-type	57089,36	52778,67	21708,88
Variance	3259195976	2785588238	471275526
Intervalle de confiance	998040,753 < m < 1052787,05	1003169,09 < m < 1053781,61	1014620,25 < m < 1035438,15
T calculé	t (A&B) = 0.17		t (B&C) = 0.27
	t (A&C) = 0.04		

Pour ces essais, nous avons travaillé avec des séries de 20, par conséquent les valeurs de la table de Student sont de 2.86 au risque de 1 % et 2.09 au risque de 5 %. Dans les deux cas les valeurs sont supérieures aux valeurs calculées (tableau n° 30) et la méthode est ainsi reproductible dans nos conditions d'analyse.

- L'oxytétracycline

Les mêmes calculs sont appliqués pour les séries de l'oxytétracycline comme c'est illustré sur le tableau n° 31.

Tableau n° 31 : Résultats des calculs statistiques de reproductibilité de l'oxytétracycline (valeurs exprimés en surfaces de pics)

	Series A	Series B	Series C
Moyenne	41873,8	41468,9	42206,7
Ecart-type	1204,7	1216,19	1243,49
Variance	1451299,71	1479108,05	1546257,91
Intervalle de confiance	41873,8 ± 563.8	41468,9 ± 569.2	42206,7 ± 582.0
T calculé	t (A&B) = 0.59		t (B&C) = 1.07
	t (A&C) = 0.47		

Les valeurs calculées sont inférieures à celles du tableau (1 % = 2.86, 5 % = 2.09), la méthode est donc reproductible.

2.3.3. La linéarité de la courbe d'étalonnage

L'établissement de la courbe d'étalonnage est une étape primordiale pour la quantification de la molécule dans des matrices réelles.

La courbe d'étalonnage est établie à partir de dilutions et, par conséquent, de concentrations différentes.

Pour la molécule de pénicilline G, la courbe est linéaire avec une droite de régression égale à 0.99 et un coefficient de corrélation égale à 0.74 (figure n° 15). Cela signifie que les surfaces augmentent de manière synchronisée avec les concentrations.

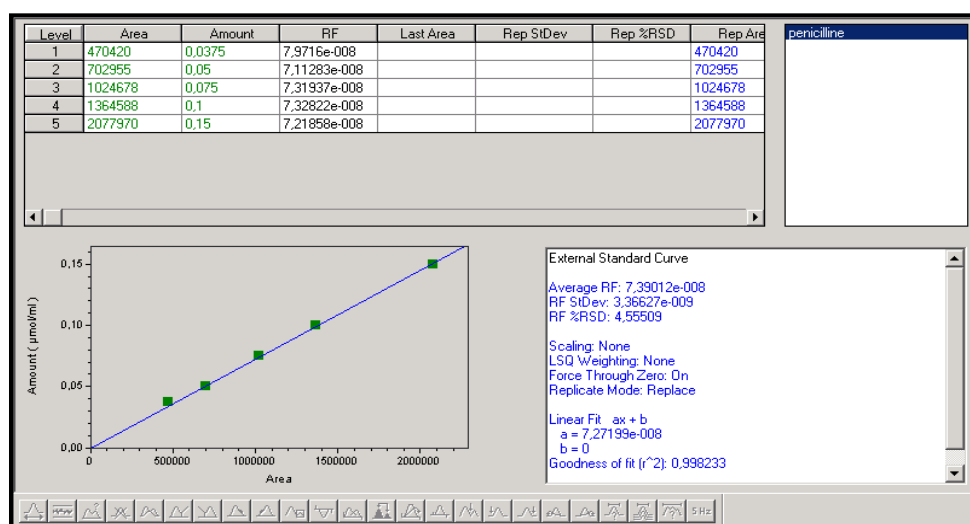


Figure n° 15 : courbe d'étalonnage de la pénicilline G

La linéarité de la méthode est vérifiée aussi pour la molécule d'oxytétracycline (figure n° 16) et cela sur 5 concentrations allant de 10 à 50 µg/mL. Le coefficient de corrélation (r^2) est égal à 0,983.

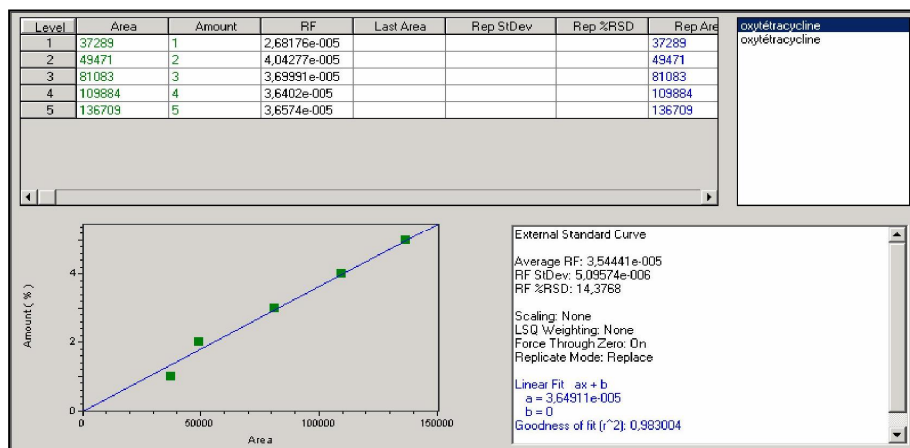


Figure n° 16 : courbe d'étalonnage de l'oxytétracycline

Cette étape est décrite dans plusieurs travaux. Comme, en 2007, par Koesukwiwat *et al.* qui rapportent, avoir utilisé des dilutions de standards d'oxytétracycline, pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, en faisant correspondre chaque surface de pic à la concentration du composé. La même opération est rapportée par sun *et al.* en (2009), P,nar, en (2007), Cinquina *et al.* en (2003), Zuo *et al.* en (2002) et Chen, *et al.*, en (2001).

2.4. Résultats des essais de l'extraction des antibiotiques dans le lait

Les essais d'extraction se sont portés sur un échantillon de lait présumé exempt d'antibiotiques. L'application de la méthode d'extraction a permis la purification et la déprotéinisation du lait, avec des solvants organiques. Nous avons obtenu un liquide transparent et homogène qui est injecté directement dans l'appareil HPLC.

Concernant les échantillons dopés par les standards d'antibiotiques, nous avons obtenus les pics correspondant à chaque molécule, au même temps de rétention respectifs à chaque molécule ; le chromatogramme correspondant à l'échantillon dopé par la pénicilline G est représenté sur la figure n° 17, celui dopé par l'oxytétracycline est représenté sur la figure n° 18.

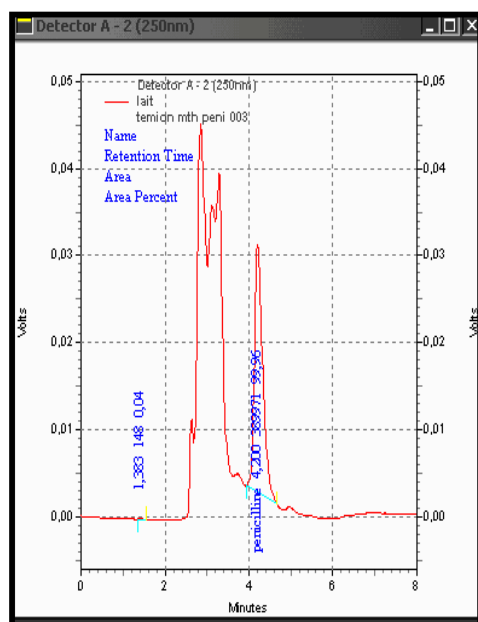


Figure n° 17 : échantillon de lait dopé avec le standard de pénicilline G.

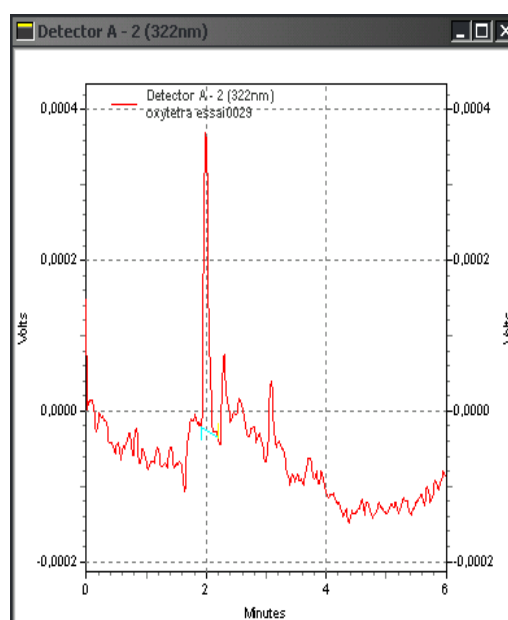


Figure n° 18 : échantillon de lait dopé avec le standard d'oxytétracycline.

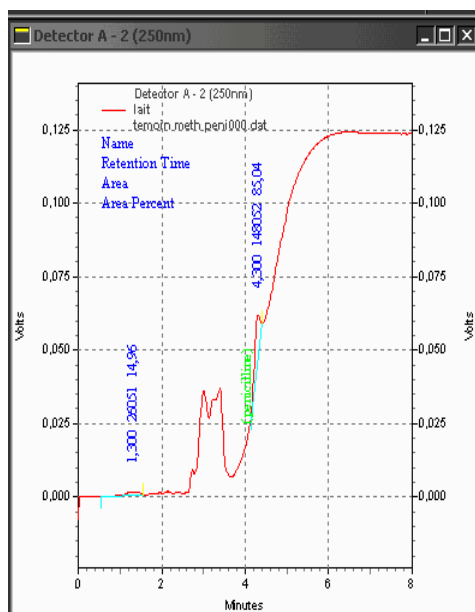


Figure n° 19 : échantillon de lait témoin

Pour le troisième échantillon témoin (figure n° 19), le chromatogramme est caractérisé par l'absence de pics caractéristique par rapport au résultat obtenu sur un lait dopé.

Par conséquent on peut considérer que la méthode d'extraction adoptée est fiable et peut être appliquée sur un échantillonnage large, pour extraire les antibiotiques et les doser par HPLC, dans nos conditions d'analyse.

Les antibiotiques suivent donc la phase aqueuse du lait. En effet, après avoir écrémé et déprotéinisé du lait entier contaminé par les antibiotiques, on trouve une plus forte concentration de médicament dans le lait écrémé et une concentration moindre dans la crème (Jepsen, 1996). Donc après écrémage et déprotéinisation du lait, les résidus d'antibiotiques se concentrent davantage dans la partie aqueuse.

Nombreuses sont les méthodes d'extractions pouvant être appliquées pour la déprotéinisation et la purification des échantillons de lait. Certaines sont proches de la notre comme par exemple : en 2010, Ergin Kaya et Filazi ont mélangé le lait avec l'acétonitrile-méthanol-eau dans les proportions suivantes 40 :40 :20, le tout est centrifugé pendant 10 min à 3000 tours. D'autres auteurs, ont optés pour l'extraction solide en utilisant des colonnes SPE spécialement conçus à cet effet, comme : Boison et Keng, 1998 ; Nouws *et al.*, 1998 ; Takeba *et al.*, 1998 ; Luo *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 1997 ; Tarbin *et al.*, 1995; Terada et Sakabe, 1985; Boison *et al.*, 1994; Munns *et al.*, 1985.

Le tableau n° 32 regroupe de nombreuses méthodes d'extractions citées dans la littérature.

Tableau n° 32 : Exemples de méthodes d'extraction rapportées dans la littérature

Auteurs	Méthodes d'extractions
Loksuwan (2002)	2 mL de tampon EDTA-NaCl sont ajouté à 2 mL de lait, le tout est mis au vortex pendant 10 min puis centrifugé 30 min à 5000 tours. Les surnageants sont filtrés avec la membrane nylon de 0,45 µm puis injectés directement dans l'appareil.
Fritz, Zuo, (2007)	Mélange de 10 mL de lait avec 30 mL de tampon McIlvane/EDTA. Le tout est homogénéisé au vortex pendant une minute puis centrifugé pendant 15 min jusqu'à la déprotéinisation. Le surnageant est ensuite utilisé pour une seconde extraction en phase solide.
Rassouli <i>et al.</i> , (2010)	Mélange de 5 ml de lait avec 1 ml d'HCl et 24 mL d'acétonitrile. Le tout est mélangé manuellement pendant 5 min. le mélange est ensuite filtré et ajouté à 30 ml d'hexane et 15 mL de dichloromethane. Ce mélange est secoué à son tour manuellement pendant 5 min. les surnageants sont récupérés et le volume est ajusté à 4 mL avec de l'eau distillé. Le tout est filtré avec la membrane nylon à 0.45 µm.
Kaale <i>et al.</i> , (2008)	2 mL de lait sont ajouté à 3 mL d'acide trichloracétique. Le tout est centrifugé pendant 15 min et 20 µL des surnageants sont injectés directement dans l'appareil.
Koesukwiwat <i>et al.</i> , (2007)	5 g de lait sont mélangés avec 2 mL d'acide trichloracétique et vortexés pendant 2 min. en suite 20 mL de tampon McIlvain sont ajoutés et le tout est vortexés pendant 3 min. le mélange est ajusté à pH 4.5 avec une solution d'hydroxyde de sodium. Le tout est centrifugé 20 min à 3800 tours. Et enfin soumis à l'extraction solide avec des colonnes SPE.
Zhenfeng <i>et al.</i> , (2006)	5 g de lait sont mélangés avec un tampon McIlvain et vortexé pendant 1 min. le mélange est refroidi à 4° puis centrifugé 10 min à 5000 tours. Les surnageants sont filtrés avec le filtre Wattman puis placé dans une colonne pour une extraction solide (colonne OASIS).
Dimitrieska-Stojkovic <i>et al.</i> , (2011)	Ici l'extraction s'est faite à l'aide du tampon McIlvain puis une extraction solide dans des colonnes OASIS. La solution est enfin diluée dans l'acide oxalique et filtrée à la membrane nylon 0.45 µm.
Ferraz Spisso <i>et al.</i> , (2009)	5 ml de lait sont mélangés avec 15 mL de tampon McIlvain. Centrifugé et les surnageants sont mélangés avec de l'acide oxalique. Le mélange est centrifugé à nouveau pendant 5 min à 4500 tours à 4°C. et enfin placé dans une colonne SPE Oasis pour une extraction solide.
Sun <i>et al.</i> , (2009)	10 mL de lait sont mélangés avec 40 mL de la solution 5 % HClO ₄ . La solution est refroidie pendant 6 h et ensuite centrifugée 10 min à 4000 tours. Les surnageants sont filtrés avec une membrane nylon de 0.22 µm.
Ghidini <i>et al.</i> , (2002) Khaskheli <i>et al.</i> , (2008)	5 mL de lait sont mélangés au vortex avec 400 µL de la solution 10 % acide acétique. Le lait acidifié est centrifugé 10 min à 4000 tours à 4°C. Les surnageants sont filtrés à la membrane nylon 0.45 µm.
P,nar (2007)	5 mL de lait sont mélangé avec 2 mL d'acide trichloractique. A ce mélange sont ajoutés 20 mL de la solution tampon McIlvaine. Le tout est centrifugé 20 min à 4000 tours. Les surnageants sont soumis à une extraction solide ensuite mélangés avec 1 ml d'acide oxalique et enfin filtrés à la membrane nylon 0.45 µm.
Junqueira and Brito (2006)	10 mL de lait sont ajoutés et mélangés avec 20 mL du tampon McIlvaine plus 5.8 mL d'acide sulfurique et 6 mL de Tungstate de sodium à 5 %. Le tout est centrifugé 20 min à 1800 tours à 10 °C. Les surnageants sont recueillis et le pH est ajusté à 8.1 avec le tampon H ₃ BO ₃ .KCl ó NaOH. Le tout est centrifugé à nouveau 20 min à 1800 tours à 10 °C, puis transféré vers une colonne C18 pour une extraction solide.
Popelka <i>et al.</i> (2004)	Ici l'extraction passe tout d'abord par une dérivation à l'aide de benzoate anhydride et le mélange thiazole-chlorure mercurique. Ensuite un ajustement de pH à 9 avec le tampon phosphate et enfin une purification avec une colonne C18 (extraction solide).

2.5. Résultats de l'étude de la cinétique des antibiotiques après injection par voie parentérale

Dans cette partie, nous avons recherché la molécule d'oxytétracycline dans le lait, après injection de l'antibiotique par voie intramusculaire. Les échantillons sont récoltés à J4, J7 et J12.

Après dosage des échantillons par HPLC, et en appliquant les paramètres d'analyse précédemment optimisés pour la recherche de l'oxytétracycline dans le lait, nous avons repéré la molécule sur les chromatogrammes au même temps de rétention (temps précédemment fixé au cours de l'étape d'optimisation). La figure n° 20 représente l'échantillon prélevé à J4, la figure n° 21 représente l'échantillon prélevé à J7 et sur la figure n° 22 l'échantillon prélevé à J12.

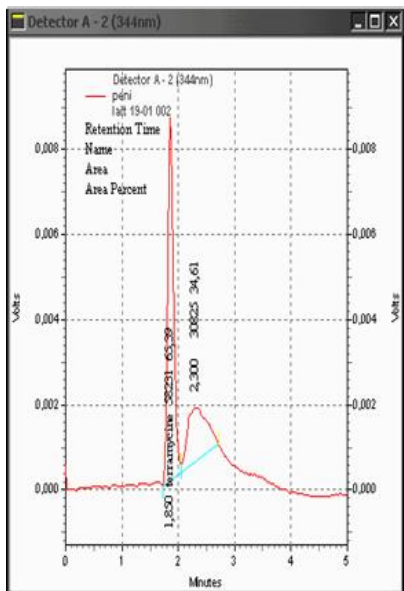


Figure n° 20 : échantillon de lait prélevé à J4

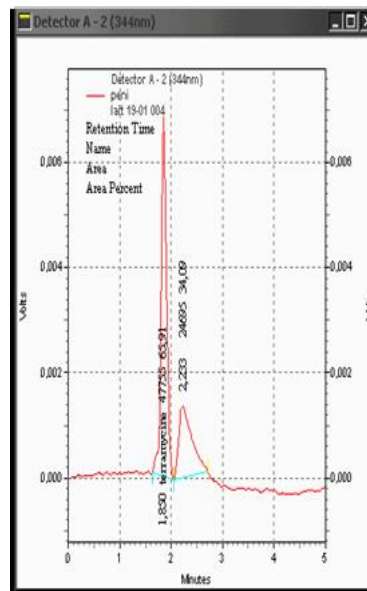


Figure n° 21 : échantillon de lait prélevé à J7

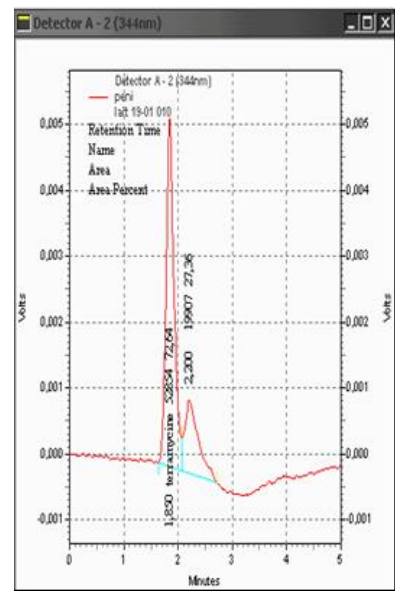


Figure n° 22 : échantillon de lait prélevé à J12

Le délai d'attente préconisé pour la molécule d'oxytétracycline dans le lait est de 7 jours après une injection parentérale, en respectant rigoureusement les conditions d'administration de la molécule. L'oxytétracycline est mesurée à J4, soit 3 jours avant le délai d'attente, à J7 et à J12, soit 5 jours après l'écoulement du délai d'attente.

Afin d'obtenir la concentration de la tétracycline dans l'échantillon de lait, des standards avec des concentrations connues sont injectés dans l'appareil. Ensuite les concentrations des échantillons sont extrapolées à la courbe d'étalonnage du standard.

Les quantités d'oxytétracycline retrouvées sont comme suit : 65 µg/L à J4, 45 µg/L à J7 et 40 µg/L à J12.

Nous remarquons que la quantité de l'antibiotique retrouvée dans le lait entre J4 et J12 décroît progressivement, reste présente dans les échantillons de lait, même après l'écoulement du délai d'attente (J7), mais à une concentration inférieure à la limite maximale des résidus. De part cette expérience, nous retiendrons deux points :

Premièrement la molécule d'oxytétracycline présente dans la formule commercialisée possède le même temps d'apparition que le standard utilisé au cours de l'étape d'optimisation et peut ainsi être détectée et quantifiée par HPLC.

Le deuxième point à retenir, c'est la fiabilité de la méthode d'extraction préalablement adoptée. Cette expérimentation témoigne d'avantage de la possibilité d'application de cette méthode sur un échantillonnage large.

2.6. Résultats de l'analyse quantitative des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache commercialisé à Constantine

2.6.1. Analyse d'oxytétracycline

2.6.1.1. Lait de vache

Les 36 échantillons contenant l'oxytétracycline, ayant fait l'objet d'une recherche par méthode ELISA (se conférer au chapitre III) sont analysés en vue d'une confirmation par HPLC.

Par ailleurs, les 48 échantillons révélés positifs et douteux après analyse par le Delvotest® (se conférer au chapitre II) ont également fait l'objet d'une recherche de l'oxytétracycline par HPLC.

Sur la totalité des échantillons analysés (48 au total), 22 contenaient de l'oxytétracycline, soit un pourcentage de 45.83 % des échantillons révélés positifs lors de la recherche qualitative des résidus d'oxytétracycline.

Le pourcentage de contamination par l'oxytétracycline sur la totalité des échantillons de lait de vache analysés (120 échantillons) est de l'ordre de 18 %.

Les concentrations obtenues sont comprises entre 7,74-76,24 µg/L. Ce sont donc des valeurs inférieures à la limite maximale de l'oxytétracycline dans le lait, qui est de 100 µg/L.

En analyse HPLC, l'échantillon est considéré comme positif lorsque le temps de rétention est le même que celui du standard. Le temps de rétention est considéré ainsi comme le seul point d'identification caractéristique de la molécule (Abebew Syit, 2011 ; Cinquina *et al.*, 2003 ; Ding et Mou, 2000).

Qualitativement, le pic d'oxytétracycline apparaît à 2.20 ± 0.10 min. Quelques exemples de chromatogrammes sont représentés ci-dessous.

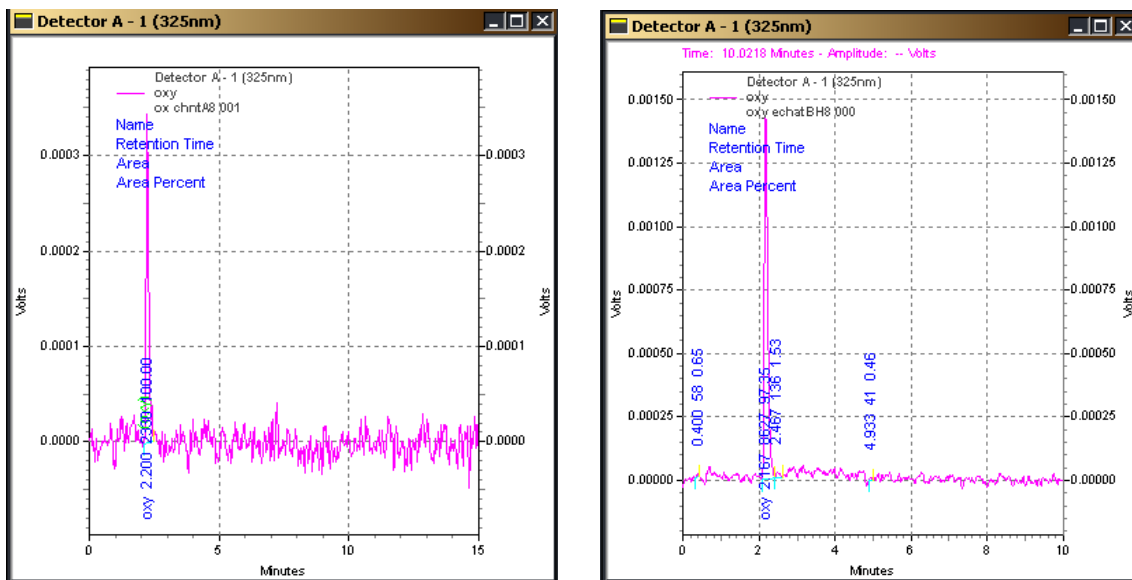


Figure n° 23 : exemples d'échantillons de lait de vache positifs à l'oxytétracycline

La quantification, quant à elle, se fait en extrapolant les valeurs de pics (surfaces) obtenus en injectant l'échantillon, aux valeurs obtenues en injectant le standard d'oxytétracycline (Kamberi, Sulaj, 2012 ; Loksuwan, 2002).

Les concentrations obtenues, par échantillon de lait analysé ainsi que les surfaces de pics correspondantes sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau n° 33 : résultats de l'analyse HPLC des échantillons de lait de vache local

Echantillons	Surface de pics	Quantification (µg/L)
A1	Néant	
A5	Néant	
A6	2662	25.42
A8	2330	22.25
A9	Néant	
B4	Néant	
B10	Néant	
H2	2800	26.74
H3	1673	45.98
H4	Néant	
H7	Néant	
H9	Néant	
H10	Néant	
J3	811	7.74
J8	6736	64.34
J10	1541	14.72
C1	Néant	
C6	Néant	

C3	Néant	
C4	Néant	
C8	néant	
C9	Néant	
C10	Néant	
D1	Néant	
D2	Néant	
D3	Néant	
D6	Néant	
D7	Néant	
D8	2311	22.07
D9	Néant	
E1	1266	42.09
E3	Néant	
E5	3126	29.86
E6	5453	52.09
E9	Néant	
F1	3704	35.83
F2	1149	20.97
F3	Néant	
F4	4620	44.13
F6	3710	35.44
F7	4184	50.86
F8	6546	62.53
F9	1660	15.85
G10	1826	17.44
G9	Néant	
G4	3313	31.46
G6	7981	76.24
G5	1860	17.76

L'annexe V regroupe tous les chromatogrammes obtenus au cours de la recherche de l'oxytétracycline.

2.6.1.1.1. Comparaison entre les résultats obtenus par HPLC et par méthode ELISA

Sur les 36 échantillons révélés positifs lors de la recherche de l'oxytétracycline par méthode ELISA, seuls 22 sont confirmés par HPLC. Cependant, pour plus de précision et de crédibilité, nous avons comparé les concentrations obtenues en analyse HPLC avec celles précédemment retrouvées par méthode ELISA, et cela pour les mêmes échantillons.

Nous avons calculé, la moyenne, l'écart-type, et la variance (tableau n° 34) pour pouvoir appliquer le test de comparaison des moyennes de Student.

Tableau n° 34 : comparaison des valeurs obtenues par analyse HPLC et celles obtenues par ELISA pour la quantification de l'oxytétracycline

échantillons	HPLC	ELISA	Moyenne	Ecart-type	variance
A6	25,42	22	23,71	2,41830519	5,8482
A8	22,25	20	21,125	1,59099026	2,53125
H2	26,74	25	25,87	1,2303658	1,5138
H3	45,98	42	43,99	2,81428499	7,9202
J3	7,74	5,3	6,52	1,72534055	2,9768
J8	64,34	65	64,67	0,46669048	0,2178
J10	14,72	18	16,36	2,31931024	5,3792
D8	22,07	15	18,535	4,99924494	24,99245
E1	42,09	45	43,545	2,05768073	4,23405
E5	29,86	25	27,43	3,43653896	11,8098
E6	52,09	46	49,045	4,3062803	18,54405
F1	35,83	30	32,915	4,12243253	16,99445
F2	20,97	22	21,485	0,72831998	0,53045
F4	44,13	40	42,065	2,92035101	8,52845
F6	35,44	40	37,72	3,22440692	10,3968
F7	50,86	52	51,43	0,80610173	0,6498
F8	62,53	60	61,265	1,78898016	3,20045
F9	15,85	12	13,925	2,72236111	7,41125
G5	17,76	18	17,88	0,16970563	0,0288
G6	76,24	74	75,12	1,58391919	2,5088
G9	31,46	30	30,73	1,0323759	1,0658
G10	17,44	15	16,22	1,72534055	2,9768
t = 0,74					

En comparant la totalité des échantillons, les résultats des deux tests sont assez proches, pas de différence significative entre les deux. La valeur du test calculée est égale à 0,74 ; soit une valeur inférieure à celles de la table de Student qui sont de 2,07 au risque de 5 % et 2,81 au risque de 1 %.

Cependant, en prenant les échantillons un par un, nous constatons que dans la plupart des cas (68%), les valeurs apportées par analyse HPLC sont légèrement supérieures à celles obtenues par ELISA.

La différence de résultats entre les deux tests s'explique par le fait que l'HPLC est une méthode qui présente une extrême sensibilité et permet de quantifier les résidus d'antibiotiques à l'échelle du nanogramme. En contre partie, l'ELISA est une méthode spécifique, car elle permet de caractériser la molécule à doser mais visiblement de sensibilité diminuée par rapport à l'HPLC.

2.6.1.2. Lait en poudre

L'analyse des échantillons de la poudre de lait n'a révélé aucun pic d'oxytétracycline, au temps de rétention correspondant à la molécule. 95 % des échantillons de lait en poudre analysés par le Delvotest® étaient négatifs, de même la recherche de l'oxytétracycline n'a révélé aucun résultat positif par analyse immuno-enzymatique « ELISA ». Ce qui est confirmé d'avantage en analyse HPLC.

Quelques exemples de chromatogrammes obtenus lors de la recherche de l'oxytétracycline sur le lait en poudre sont représentés ci-dessous.

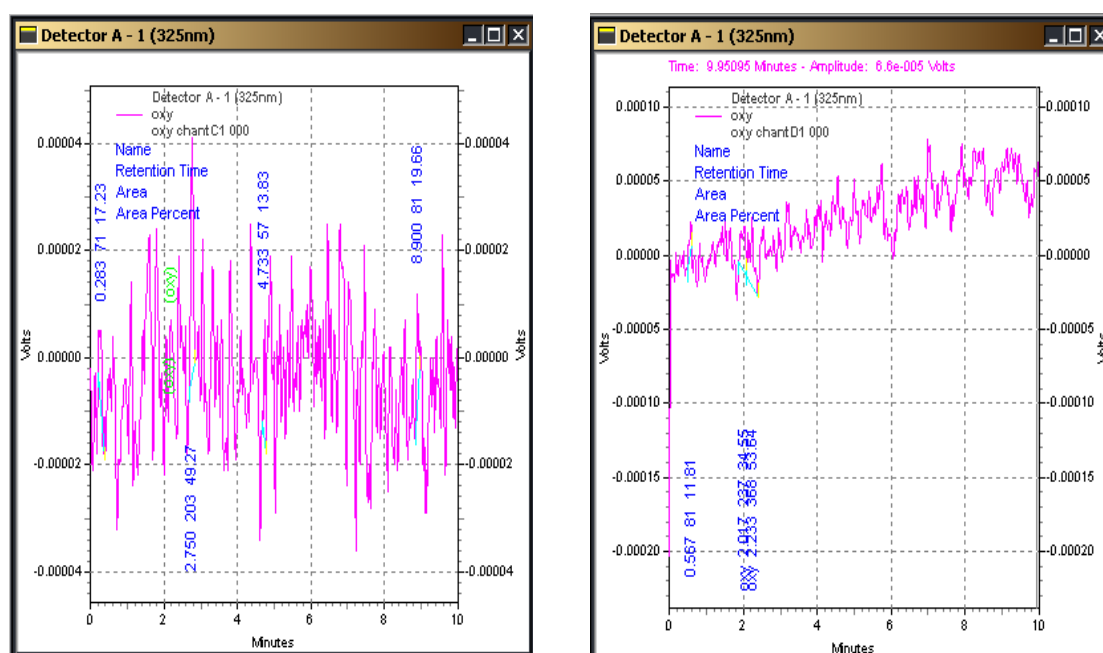


Figure n° 24 : exemples de chromatogrammes d'échantillons de lait en poudre négatifs à l'oxytétracycline

A travers le monde, plusieurs travaux sont réalisés dans le cadre de la recherche de l'oxytétracycline dans le lait par HPLC.

Nous avons remarqué une similitude entre notre méthode de travail et celle d'autres chercheurs. Ainsi en 2012, Kamberi et Sulaj, ont tout d'abord utilisé l'ELISA comme méthode de détection qualitative, ensuite l'HPLC pour la quantification de l'oxytétracycline. Sur 161 échantillons, 5 sont positifs, et seulement 2 (1.4 %) dépassent la LMR à des valeurs égales à 290 g/L et 1600 g/L.

Et pour Abebew Syit (2011), les échantillons retrouvés positifs avec le Delvotest®, sont analysés avec HPLC pour la quantification. Ils ont recherché la pénicilline et l'oxytétracycline dans des échantillons de lait de vache.

Dans cette étude, l'oxytétracycline a été identifiée sur tous les échantillons avec des concentrations allant de 27-251 g/L où 73.91 % des échantillons étaient au dessus de la LMR.

Dans plusieurs travaux, la recherche de l'oxytétracycline par HPLC aboutit à des valeurs supérieures aux LMR. Ainsi Ergin Kaya et Filazi en 2010 ont détectés une concentration de 150.4 g/L d'oxytétracycline dans le lait.

Dans une étude réalisée par Dimitrieska-Stojkovic en 2011, la concentration maximale était de 149,1 µg/L. Cependant la concentration moyenne des tétracyclines est cinq fois inférieure à la LMR.

Rassouli *et al.* en 2010 ont analysé 90 échantillons de lait pasteurisé, 6 (6.7 %) contenaient l'oxytétracycline à des valeurs inférieurs aux LMR, et un seulement contenait 138.8 ppb, soit une valeur supérieure à la LMR.

Pour Fritz et Zuo en 2007, l'oxytétracycline a été identifié sur tous des échantillons, avec des concentrations allant de 13 à 106 µg/L.

Zhenfeng *et al.* en 2006 ont travaillé sur 117 échantillons, 5 ont des valeurs supérieures à la LMR.

Aux États-Unis, Zhao *et al.* (2004) ont retrouvé des concentrations de 13-106 g/L d'oxytétracycline.

Dans d'autres travaux la molécule est détectée à des seuils inférieurs aux LMR ; comme pour Navrátilová *et al.*, 2009, où l'oxytétracycline a été identifié sur 86 échantillons soit plus de 50 % du nombre total, mais à des valeurs inférieures à la limite maximale des résidus.

Kaale *et al.* (2008) ont recherché l'oxytétracycline sur 100 échantillons, 2 étaient positifs mais à des valeurs inférieures aux LMR. Dans ce cas l'auteur précise que la contamination vient du mélange de laits de vaches traitées et de vache non traitées.

Enfin, Pinar en 2007, a analysé 46 échantillons de lait pour la recherche des tétracyclines. 9 se sont révélés positifs par Charm II. Quatre d'entre eux sont confirmés positifs après analyse HPLC. Les concentrations varient de 22,1-58,5 ppb, soit des valeurs inférieures aux LMR.

D'après ces travaux, nous remarquons que la molécule d'oxytétracycline est très recherchée dans le lait et souvent détectée. La méthode HPLC est largement utilisée pour l'identification et surtout la quantification de telle molécule. Souvent utilisée comme méthode de confirmation car elle permet de détecter et de quantifier des valeurs supérieures ou inférieures aux LMR.

2.6.2. Analyse de la pénicilline G

2.6.2.1. Lait de vache

L'HPLC est une technique d'analyse qui a été développée et appliquée pour la recherche des bêta-lactamines dans le lait. La sélectivité, la spécificité, l'exactitude et la précision ont été approuvées par plusieurs auteurs (Boison *et al.*, 1994 ; Boison *et al.*, 1998 ; Schenck et Callery 1998 ; Verdon et Couedor 1998).

Dans notre travail, les échantillons, révélés positifs ou douteux par le Delvotest®, ont tous fait l'objet d'une analyse HPLC, en vue d'une éventuelle identification puis quantification de la pénicilline G dans le lait.

A l'issue des analyses, la pénicilline n'a été décelée sur aucun échantillon. Cela s'explique par le fait que le Delvotest® est une méthode sensible à tous les antibiotiques à noyau bêta-lactame, aux sulfamides et à la tylosine (Navratilova, 2008 ; Althaus *et al.*, 2003 ; Botsoglou et Fletouris 2001).

Puisque l'HPLC est une méthode très sélective et sensible pour un antibiotique donné, la positivité du Delvotest® est donc expliquée par la présence d'antibiotiques autres que la pénicilline G.

Aucun pic n'est décelé aux alentours de 4.00 minute (temps de rétention de la molécule précédemment fixé) sur les chromatogrammes, après application des paramètres validés au cours de l'étape d'optimisation. Ci-dessous, quelques chromatogrammes témoignant l'absence du pic de la pénicilline G sur les échantillons de lait de vache produits localement.

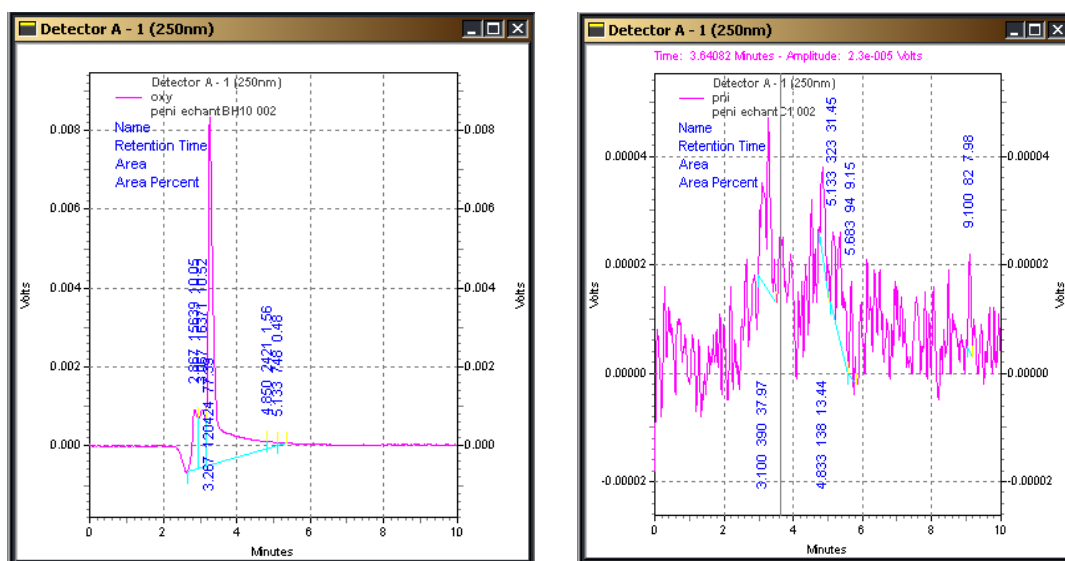


Figure n° 25 : exemples de chromatogrammes d'échantillons de lait de vache négatifs à la pénicilline G

2.6.2.2. Lait en poudre

Pour le lait en poudre, nous avons constaté la même chose c'est à dire une absence totale de la molécule de pénicilline G sur tous les échantillons analysés. Les échantillons positifs et douteux ont été analysés. Là aussi, il paraît que ce n'est pas la pénicilline G qui est responsable de la positivité du Delvotest® mais bien d'autres molécules précédemment cités.

Ci-dessous quelques chromatogrammes témoignant l'absence de la pénicilline G sur les échantillons de lait en poudre.

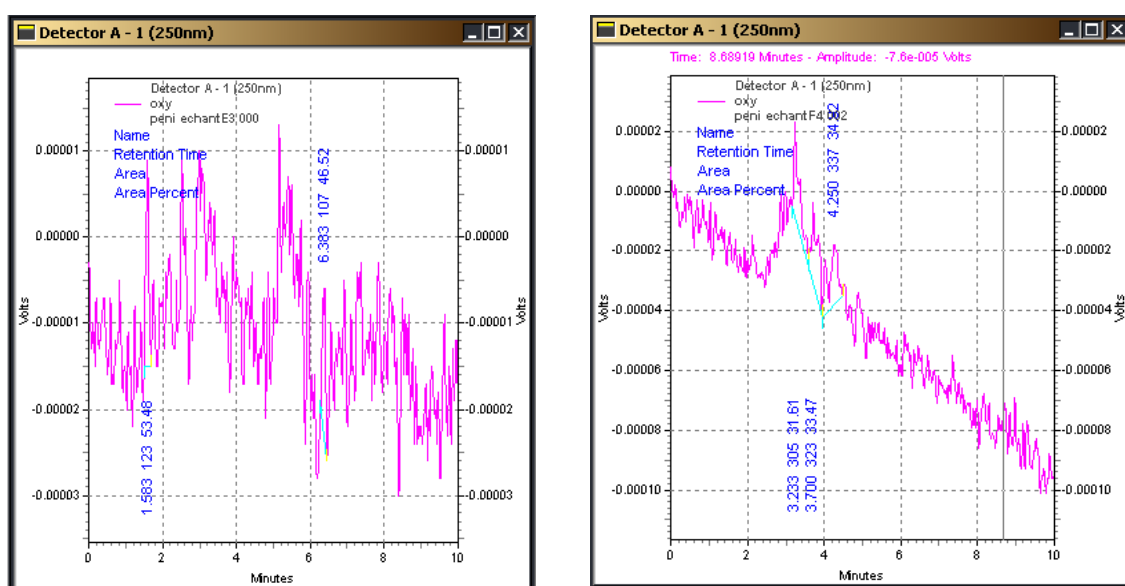


Figure n° 26 : exemples de chromatogrammes d'échantillons de lait en poudre négatifs à la pénicilline G

L'annexe V regroupe tous les chromatogrammes obtenus au cours de la recherche de pénicilline G.

En théorie plusieurs travaux sont réalisés sur la pénicilline G. La limite maximale des résidus de cette molécule diffère d'une région à l'autre. Ainsi la réglementation de l'union européenne fixe une valeur de 4 µg/ L (Ghidini *et al.*, 2002), or aux États-Unis la fédération US FDA (Food and Drug Administration) fixe la valeur de 5 µg/L (Holstage *et al.*, 2002). Un autre auteur rapporte une valeur de 3 µg/L (Junqueira et Brito, 2006).

Ainsi, par ordre chronologique, plusieurs travaux sont réalisés sur la recherche de la pénicilline G par HPLC :

En 2011, pour Abebew Syit la pénicilline, était retrouvée sur 17.39 % des échantillons, à des valeurs supérieures à la LMR (4.77 g/l). Les concentrations étaient de 0-47 g/L.

En 2010, Movasag *et al.* en Iran, avaient signalé une contamination de 5 % par les bêtalactamines dans le lait sans préciser les concentrations.

Toujours en 2010, une étude est réalisée en Turquie par Kaya et Filazi. Ils confirment la présence des bêtalactamines sur 44 % des échantillons sur un total de 200. Avec une concentration maximale de 33,5 µg/L.

Selon Khaskheli *et al.*, en 2008, sur 50 échantillons, 32 sont contaminés avec les résidus de pénicilline (64 %). Les valeurs varient de 0,4 à 400 µg/L.

Pinar en 2007, a analysé 81 échantillons avec le Charm II pour la recherche des bêtalactamines et 9 se sont révélés positifs.

Dans une étude menée par Shitandi en (2004), la pénicilline était l'antibiotique le plus retrouvé dans le lait. Avec des niveaux excédant les LMR (4µg/L) dans une fourchette de 0-47 g/L.

Pour Popelka *et al.*, 2003, l'expérimentation était faite pour suivre la cinétique de la pénicilline. La valeur retenue après 12:00 d'administration parentérale de pénicilline était égale à 2693.5 g/L.

En 2002, Ghidini *et al.*, rapportent que 29 échantillons sur un total de 53 sont contaminés par la pénicilline G à des valeurs comprises entre 3.1-6240 µg/L.

Enfin pour Moats en 1999, la pénicilline était retrouvée dans 37 % des échantillons mais les concentrations ne sont pas précisées.

3. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons, tout d'abord, optimisé les paramètres d'analyse avec lesquels, nous avons recherché la pénicilline G et l'oxytétracycline dans le lait.

La fiabilité de la méthode est vérifiée par des tests de validation qui sont : la répétabilité, la reproductibilité et la linéarité de la courbe d'étalonnage. Le tout est soumis aux tests statistiques.

Parallèlement, une méthode d'extraction des résidus d'antibiotiques est adoptée. Cette dernière est une extraction de type liquide-liquide qui a permis une purification et une déprotéinisation complète des échantillons de lait.

Sur la totalité des échantillons de lait de vache analysés (48 échantillons) par HPLC, la présence d'oxytétracycline est confirmée sur 22 échantillons (soit 45.83 % de la totalité des échantillons).

En revanche, la pénicilline est absente sur la totalité des échantillons analysés après recherche par HPLC.

La chromatographie liquide haute performance est ainsi une méthode de choix pour la détection et la quantification des résidus d'antibiotiques, car extrêmement sensible et spécifique, elle offre par conséquent une quantification précise de la molécule à doser. C'est une méthode qui pourra ainsi être utilisée pour contribuer à la protection de la santé du consommateur.

Conclusion générale et perspectives

Malgré l'importance de l'antibiothérapie dans le monde animal et son importance dans la préservation du cheptel et l'amélioration des conditions sanitaires, il n'en demeure pas moins que l'usage de ces antibiotiques présente de grands risques pour la santé publique.

Les taux élevés de contamination du lait cru, par les inhibiteurs en général et les résidus d'antibiotiques en particulier, sont expliqués, d'une part par l'usage massif et incontrôlé des préparations pharmaceutiques pour le traitement et la prévention des pathologies bovines et le non respect des délais d'attente après traitement, et d'autre part par un ajout volontaire des inhibiteurs de croissance des germes (antibiotiques, antiseptiques) dans le lait de commerce dans le but de freiner la croissance des bactéries et stabiliser le lait.

Malgré cela, le lait reste dans la mémoire collective un excellent produit doué de qualités nutritionnelles importantes et est, généralement, considéré comme un allié important de la santé. Le lait a également su échapper à la méfiance des consommateurs malgré des informations de contamination du lait de vache par des agents infectieux (comme celui de la tuberculose bovine).

Néanmoins, la présence d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale doit constituer une préoccupation majeure, vu les risques encourus pour le consommateur vis-à-vis de ces produits et leurs dérivées, ainsi que les pertes économiques considérables au niveau de la transformation laitière. Il est devenu impératif de prévenir ces risques, d'instaurer une législation explicite et rigoureuse relative à ce problème.

Ce travail avait pour but d'estimer le taux de contamination des laits consommés dans la région de Constantine par méthodes qualitatives, semi-quantitatives et quantitatives.

A l'issue de nos investigations, il s'est avéré que 40 % des échantillons de lait local étaient contaminés par les résidus d'antibiotiques. Ce chiffre est assez préoccupant, et doit interpeller les pouvoirs publics pour prendre les dispositions réglementaires nécessaires telles que d'établir une limite maximale de résidus (LMR) propre aux antibiotiques utilisés en Algérie.

Les taux de contamination sur la poudre de lait (5%) restent relativement bas par rapport à la contamination locale, mais cela n'empêcherait pas le renforcement des contrôles aux frontières.

La mise en place de tests analytiques en particulier la chromatographie liquide haute performance (HPLC) est un moyen de contrôle très efficace pour les résidus d'antibiotiques

dans le lait. Etant une méthode qui permet de quantifier les résidus d'antibiotiques à l'échelle du nanogramme, elle représente, de ce fait, une méthode de choix qui pourra être utilisée pour le contrôle sanitaire aux niveaux des laboratoires de contrôle de la qualité.

Les méthodes immuno-enzymatiques, comme l'ELISA, peuvent également être employées pour une détection précise des résidus d'antibiotiques dans le lait.

Parallèlement à ces méthodes d'analyses relativement lourdes, les méthodes rapides sont d'une grande utilité, car elles permettent de dépister les résidus d'antibiotiques à des seuils proches des LMR.

Par ailleurs, l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, utilisés en pratique vétérinaire, doit faire l'objet d'une préoccupation sérieuse, en instaurant un plan de pharmacovigilance. Les vétérinaires praticiens doivent raisonner les traitements à base d'antibiotiques. Ces derniers doivent être dirigés vers les germes cibles limitant ainsi l'utilisation des antibiotiques à large spectre.

Perspectives

Pour une meilleure maîtrise de la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait, un certain nombre de mesures doivent être prises :

Ce travail pourra être poursuivi par la recherche d'autres molécules d'antibiotiques pouvant être retrouvées dans le lait, tels les pénicillines A, les macrolides et les sulfamides í

Le contrôle du lait doit être appliqué d'une manière rigoureuse. Tous les collecteurs doivent s'équiper avec des tests rapides de détection des résidus d'antibiotiques dans le lait, afin de les effectuer au niveau même de la ferme.

L'instauration d'une législation rigoureuse en appliquant des mesures coercitives envers les éleveurs ne se conformant pas aux mesures réglementaires (exemple, laissé passer dans le tank du lait contaminé, ne pas signaler les vaches soumises à un traitement antibiotiques,í).

Le renforcement des capacités des laboratoires de contrôle et d'expertise en les dotant de méthodes de pointe telle que l'HPLC.

Les associations de consommateurs doivent être plus sensibles et montrer une réelle implication dans la contribution à la protection de la santé publique, surtout vis-à-vis des résidus d'antibiotiques ; notion très souvent négligée.

Il faut également instaurer un plan de pharmacovigilance en association entre le secteur de la santé animale et le secteur de la santé publique.

Les vétérinaires et pharmaciens vétérinaires doivent être plus rigoureux dans la délivrance des ordonnances et la vente des antibiotiques.

Les vétérinaires praticiens doivent s'équiper de laboratoires de microbiologie afin d'isoler les germes et cibler ainsi les traitements à base d'antibiotiques.

Il faut par ailleurs limiter l'utilisation des antibiotiques, en élevage, en favorisant l'action sanitaire et les mesures prophylactiques. Il est nécessaire de respecter des normes établies pour la conception et la réalisation des bâtiments d'élevage ainsi que la prise de certaines mesures sanitaires qui permettent d'éviter la contamination des animaux, et donc le déclenchement d'épisodes d'infection. En parallèle, des protocoles vaccinaux ou de chimio-préventions doivent être envisagés.

Au niveau de la ferme, le contrôle doit être strict. Les éleveurs doivent être particulièrement sensibilisés. C'est la mission des vétérinaires de sensibiliser les éleveurs aux divers risques qui peuvent survenir lors de tout manquement pouvant engendrer la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait. Un certain nombre de mesures doit ainsi être pris :

- Identifier chaque animal à la ferme (animaux malades, sous traitements, tarisí).
- Appliquer les traitements chimiques conformément aux instructions,
- calculer les doses rigoureusement et respecter les délais d'attente requis.
- Disposer de procédures pour détecter et soigner les animaux malades ainsi que pour utiliser les médicaments vétérinaires.
- S'assurer que toutes les personnes qui travaillent dans l'élevage laitier ont reçu une formation suffisante pour s'acquitter de leurs tâches ; entre-autres transmettre les consignes d'un trayeur à l'autre en cas de traitement isolé.
- Eliminer systématiquement le lait des vaches sous antibiothérapie pendant la durée du délai d'attente.
- Ecarter le lait de tous les quartiers pendant tout le délai d'attente, lors de traitement d'un seul quartier.
- Prendre en compte des modulations faites sur la prescription (allongement de la durée ou augmentation de la dose) car cela allongerait le délai d'attente.
- Eviter la contamination avec le matériel de traite, ce dernier doit être rincé afin d'éviter la contamination du tank.
- Isoler les animaux taris, pour éviter une traite « accidentelle ».

Tenir compte de certains facteurs susceptibles d'occasionner un résultat positif comme :

- le ralentissement du rythme d'élimination du médicament, car le métabolisme de l'animal malade peut être plus long que la normale
- Le recours à une combinaison de médicaments pour traiter un animal peut rallonger la durée d'attente pour un médicament en particulier.
- L'utilisation d'un médicament en dérogation des directives de l'étiquette peut influencer sur son rythme d'élimination.

L'application de mesures d'hygiène et de contrôle à des denrées alimentaires largement consommées tel que le lait, aboutira à une meilleure protection de la santé du consommateur.

Références bibliographiques

- 1) **Aarestrup .F. M (1999)**. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *J. Antimicrob. Agents*. n° 12, p 279-285.
- 2) **Abebew Syit. D (2011)**. Detection and determination of oxytetracycline and penicillin g antibiotic residue levels in bovine bulk milk from debrezeit and nazareth dairy farms, Proceedings of the 1st International Technology, Education and Environment Conference septembre 2011 (c). African Society for Scientific Research (ASSR). p 325-346.
- 3) **Abhishek Gaurav. J. P. S, Gill. R. S, Aulakh et Bedi J. S (2014)**. ELISA based monitoring and analysis of tetracycline residues I cattle milk in various districts of Punjab, *Veterinary World*, Vol7, 26-29. www.veterinaryworld.org/Vol.7/Jan-2014/7.pdf, date de consultation le 23-05-2014.
- 4) **Abidi. K (2004)**. Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson. Thèse : Médecine vétérinaire, École nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie, p 6-23.
- 5) **Acar J.F, Bouanchaud D.H, Buu-Hoï A (1989)**. Résistance bactérienne aux antibiotiques. In : *Bactériologie médicale*, 2ème éd. Paris : Flammarion. 1989, p 213-223.
- 6) **Adesiyun. AA, LA. Webb et Balbirsingh. V (1997)**. Prevalence of antimicrobial residues in preprocessed and processed cows' milk in Trinidad. *J. Food Safety*, 16, p 301-310.
- 7) **Adrian. J, Potus. J, Frangne R. (1995)**. La science alimentaire de A à Z, Lavoisier TEC & DOC, Paris, p 477.
- 8) **AFSSA (2006)**. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. In : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Site de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. [enligne], Janvier 2006, p. 214 [http://www.afssa.fr/ftp/afssa/35821-35822.pdf] date de consultation le 29-08-2012.
- 9) **Aga D.S, R. Goldfish et Kulshrestha. P (2003)**. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *The Analyst* 128, p 658-662.
- 10) **Aggad. H, Mahouz. F, Ahmed Ammar. Y, Kihal. M (2009)**. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l'ouest algérien. *Méd. Vét.*, 2009, 160, 12, p 590-595.
- 11) **Aghuin-Rogister. G (2005)**. Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse. *Annal de médecine vétérinaire*, n°149, p 183-187.
- 12) **Airieu. B et al., groupe institut d'élevage, (2000)**. Livre maladie des bovins, 3^{ème} édition. France Agricole, p 14-78.

- 13) **Allain. P (2006)**. Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines, Extrait du livre "Les médicaments" 3^{ème} édition, <http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output> Date de consultation le 16/11/2012.
- 14) **Alomirah. H, Al-Mazeedi. H, Al-Zenki. S, Al-Aati. T, Al-Otaibi. J, Al-Batel. M et Sidhu. J (2007)**. Prevalence of antimicrobial residues in milk and dairy products in the state of Kuwait. Journal of Food Quality., 30, p 745-763.
- 15) **Althaus. R.L, Torres. A, Montero. A, Balasch. S et Molina. M.P (2003)**. Detection Limits of Antimicrobials in Ewe Milk by Delvotest Photometric Measurements. J. Dairy Sci, 86, p 457-463.
- 16) **Amellal. R (1995)**. La filière lait en Algérie : entre objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance, Revue : Options Méditerranéennes, Série B, n°14, p 229-230.
- 17) **Anifantakis. E.M (1980)**. Influence de la pénicilline sur la technologie et la qualité du fromage Feta fabriqué à partir du lait de brebis. Le Lait, p 525-531.
- 18) **Anonyme, (2012)**. Recueil des méthodes internationales d'analyses OIV Résidus potentiellement allergéniques de protéines de collage dans le vin Méthode OIV- -MA-AS315-23 www.oiv.int/...%204%20Methodes%20d%20analyses/.../OIV-MA-AS31... date de consultation, 05-10-2013.
- 19) **Anonyme. (2007)**. La chromatographie liquide haute performance http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chrom_08.htm, Date de consultation le 05/02/2011.
- 20) **Anonyme. a (2006)**. Concepts de limite de quantification, Club de Spectrométrie Atomique http://www.formation-conseil.com/seminaires_clubs/documents/Mermet-Limitequantification.pdf, Date de consultation le 20/04/2013.
- 21) **Anonyme. b (2006)**. La chromatographie liquide haute performance, Cours de chimie organique, minérale et structurale, Académie de Nancy, Metz , <http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/Physique/HPLC.htm>, Date de consultation le 25/02/2013.
- 22) **Apria. (1980)**. Les laits reconstitués-Leurs utilisations, Association pour la Promotion Industrie Agriculture, Paris. p 48-50.
- 23) **Archimbault. Ph, Aubert. A, Haas. P, Clément. M.C, Damaria. M, Petit. M, Thevenot. C (1978)**. Résidus de cloxacilline et de néomycine dans le lait après leurs administrations, en association, par voie galactophore. Recueil de médecine vétérinaire, n°154, p 951-956.
- 24) **Arrêté Ministériel (2003)**. Arrêté n° 2003-169 du 3 mars 2003 relatif au temps d'attente et aux limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine

animale au Maroc, Journal de Monaco, Bulletin principal de la principauté, n° 7951 du 21/03/2003.

- 25) **Arrêté Ministériel (1993)**. Arrêté interministériel (ministère de l'économie, ministère de l'agriculture et ministère de la santé et de la population) du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation, Journal officiel de la république algérienne.
- 26) **Arrêté ministériel (1983)**. Textes législatifs et réglementaires français Arrêté du 2 septembre 1983, Méthodes officielles pour la détection des antibiotiques et des sulfamides dans les laits destinés à l'alimentation humaine ou animale.
- 27) **Avezard. C.L et Lablee. J (1990)**. Laits et produits laitiers recombines, In *LUQUEE F.M.*, Laits et produits laitiers vache brebis chèvre, Tec et Doc, Lavoisier, Paris. p 536-539.
- 28) **Babic. S, A-perger. D, Mutavdffc. D, Horvat. A-J-M, Ka-telan-Macan. M (2006)**. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta* 70 (2006), p 732-738.
- 29) **Beldjil Ali. A, Benlahcen. K, Guessas. B, Aggad. H, Kihal. M (2013)**. Evaluation of microbiological and sanitary quality of ewe's raw milk in Western of Algeria and detection of antibiotic residue by Delvotest. *Advances in Environmental Biology*, 7(6), p 1027-1033.
- 30) **Belhadia. M, Saadoud. M, Yakhlef. H, Bourbouze A (2009)**. La production laitière bovine en Algérie : Capacité de production et typologie des exploitations des plaines du Moyen Cheliff. *Revue Nature et Technologie*. n° 01/Juin 2009. p 54-62.
- 31) **Bencharif. A (2001)**. Stratégie des acteurs de la filière lait en Algérie : état des lieux et problématiques. *Option Méditerranéenne. Série. B/n⁰32-les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée*. p 28.
- 32) **Bendali. F, chastant. S, cleric. B, delacroix. M, farlout. B, gourreau. J-M, guillot. J, maillard. R, Millemann Y, ravy-plumioën. B, schelcher. F, (2008)**. Livre maladie des bovins 4^{ème} édition, édition France Agricole, p. 208-535.
- 33) **Benelkadi. K (2007)**. Industrie du lait en Algérie, *Journal el Watan*, édition du 7 mai 2007.
- 34) **Bergogne-Bérézin. E et Dellamonica. P (1999)**. Antibiothérapie en pratique clinique Édition MASSON, p. 2-13.
- 35) **Berrah. A (1984)**. Collection mathématique Université des sciences techniques Houarri Boumediene, 1^{ère} édition, 1984.
- 36) **Berthe. T, Moisan. A, Carrie. J (2006)**. Résidus d'antibiotiques dans les aliments 1^{ères} rencontres des laboratoires publics de l'ouest, Avril 2006, Ploufragan, France.

- 37) **Bilandfi . N, Kolanovi 1. B. S, Varenina1. I, Jurkovi . Z (2011).** Concentrations of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia. *Veterinary drug residues in milk*, *Mljekarstvo* 61 (3), p 260-267.
- 38) **Billon. J (1981).** Détection des antibiotiques dans le lait. *Semaine vétérinaire*. n° 203, p 7.
- 39) **Boatto. G, Cerri. R, Pau. A, Palomba. M, Pintore. G, Giovanna Denti.M (1998).** Monitoring of benzylpenicillin in ovine milk by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 17, Août1998, p 733-738.
- 40) **Bogialli. S. (2006).** A Rapid Confirmatory Method for Analyzing Tetracycline Antibiotics in Bovine, Swine, and Poultry Muscle Tissues: Matrix Solid- Phase Dispersion with Heated Water as Extractant followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(5), p 1564-1570.
- 41) **Boison. J.O et Keng. L.J.Y (1998).** Multiresidue liquid chromatographic method for determining residues of mono and dibasic penicillins in bovine muscle tissues. *Journal of AOAC International*, 81, p 1113-1120.
- 42) **Boison. J.O, Keng. L.J, MacNeil. J.D (1994).** Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. *J AOAC Int*. 1994 May-Jun;77 (3), p 565-70.
- 43) **Borges, T., Santana, P., Mesquita, J., Mesquita, P., Silva, F., Nunes, V. (2000).** Antibiotic residues in pasteurized milk produced and marketed in Goias, Brazil. *Cienc. Anim. Brasileira.*, 1, p 59-63.
- 44) **Bories. G (1993).** résidus alimentaires dans les laits animaux et l lait de la femme. *Biologie de la lactation*, éditions INSERM/INRA, p 557-579.
- 45) **Bories. G, Louisot. P, (1998).** Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale. Rapport effectué par le président de la Commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale et la président du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Conseil supérieur d'hygiène publique de France, p. 3-21.
- 46) **Botsoglou N.A., Fletouris D.J. (2001).** *Drug Residues in Foods, Pharmacology. Food Safety, and Analysis*. Marcel Dekker, New York.
- 47) **Bouaziz. O (2005).** Contribution a l'étude des infections intramammaires de la vache laitière dans l'est algérien. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat d'état. Université Constantine, Algérie. p 5-73.
- 48) **Bouchot. Mc, Catel. J, Chirol. C, Ganiere. JP, Le Menec. M. (1985).** L'antibiogramme et le traitement des infections mammaires des bovins. *Rec. Méd. Vét.*, 1985, 161 (6-7), p 587-601.

- 49) **Broes. A, Boutin. R (2003)**. Antibiorésistance : que faire pour les producteurs de porc ? Congrès du porc du Québec 2003.
- 50) **Brouillet .P, (1994)**. Maîtrise de la présence d'antibiotiques dans le lait. Recueil de médecine vétérinaire, n° 170, Juin-Juillet 1994, p. 443-454.
- 51) **Brouillet. P (2002)**. Résidus de médicaments dans le lait et tests de détection. Bulletin des GVT n°15. Mai-Juin 2002, p 25-41.
- 52) **Brouillet. P (2011)**. Antibiothérapie sous haute surveillance afin de préserver la santé publique et animale. Presse contact news, n° 28, mai 2011, p 1-3.
- 53) **Broutin. C (2005)**. Maîtrise de la qualité dans la transformation laitière. Guide de bonnes pratiques d'hygiène, p 29-31.
- 54) **Burgat-Sacaze. V (1981)**. Risque d'accidents allergiques dus aux résidus. Rec. Méd. Vét., 1981, 157, (2), p 187-190.
- 55) **Burgot. G et Burgot .J-L, (2002)**. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales. Éditions TEC & DOC p 26, 27.
- 56) **Catella. S (2003)**. Evaluation de l'efficacité de BaytrilND 5% solution injectable dans le traitement d'une infection respiratoire à Mycoplasma bovis chez le veau. Thèse de doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil. p 5-32.
- 57) **Cazet. L. M. D, (2007)**. Bilan du taux de contamination et étude Préparatoire au dosage de résidus de produits Phytosanitaires dans le lait de grand mélange Bovin, thèse pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire, université Claude-Bernard - Lyon I, p. 44-121.
- 58) **Cerniglia. C.E, kotarski. S (2005)**. Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2005, 28, (1), 3-20p.
- 59) **Ceyhan. I et Bozkurt. M (1987)**. Ankara piyasasında satılan sütlerde penisilin araştırılması. TürkHij. Den. Biyol. Derg., p 44: 1-5.
- 60) **Chang- Soo. K, Sung-Kwon. L, Tae- Oh. K et Sin óH. K (1996)**. Détermination of sulfonamide residues in raw milk from southern Kyeonggi area. Korean J. Vet. Serv., 19, p 39-45.
- 61) **Charfaoui. M.I, Mekersi. S, Amroun. M (2003)**. Le programme national de réhabilitation de la production laitière : objectifs visés, contenu, dispositif mise en oeuvre et impact obtenus, p 12.
- 62) **Châtaigner. B, Stevens. A (2005)**. Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar, Institut Pasteur de Dakar, p 6-9.

- 63) **Chen. H, Zuo. Y, et Deng. Y (2001)**. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 913, p 3876395.
- 64) **Chatellet. M. C (2007)**. modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou, thèse de doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, 11-149.
- 65) **Chopra. I et Roberts. M, (2001)**. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2001. **65**(2), p. 232-260.
- 66) **Chris, M.L., C. Luke, et A.V. Dietrich (1999)**. Rapid analysis of tetracycline antibiotics by combined solid phase microextraction/high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **13**(17): p 1744-1754.
- 67) **Cinquina. L, Longo. F, Anastasi. G, Giannetti. L, Cozzani. R (2003)**. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the détermination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *Journal of Chromatography A*, 987 (2003), p 2276233.
- 68) **Cloekaert. A, Baucheron. S, Doublet. B, Mouline. C, Payot-Lacroix. S, PraudEquipe. K (2003)**. Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, p 49-54.
- 69) **CNIEL / FAO (2011)**. FIL (fédération internationale de laiteries) Canada Situation mondiale de l'industrie laitière 22 mars 2011, http://www.dairyinfo.gc.ca/pdf/FIL-IDF2011-%20World%20Dairy%20Situation%20-%20Benoit%20Rouyer_fra.pdf, date de consultation le 15/10/2013.
- 70) **Corpet. D.E, Brugere. H.B (1995)**. Résidus antibiotiques dans les aliments d'origine animale : conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effet chez l'homme. *Revue de médecine vétérinaire*, n°146, 2, p 73-82.
- 71) **Courtet Leymarios. F (2010)**. Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse pour le doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, p 18-37.
- 72) **Coyne. R, Bergh. Ø, Samuelsen. O-B (2004)**. One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytétracycline in fish muscle, Short communication. *Journal of Chromatography B*, 810 (2004), p 3256328.
- 73) **Craplet. C, Thibier. M, Duplan. J-M (1973)**. livre la vache laitière, édition Vigot Frères, p 645.

- 74) **Davies .J. E (1997)**. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In: Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread. Ciba Foundation Symposium n° 207, p 15-35.
- 75) **Delatour. P (1981)**. Les médicaments vétérinaires susceptibles de laisser des résidus dans le lait. Semaine vétérinaire, n° 203, Février 1981, p 10.
- 76) **Deng. D.Y, Yu. S.B, Liang. J.T (2004)**. Investigation into the residual status of antibiotics in milk and milk powder in Foskan City, Guangong Province. Editorial Department of China Tropical Medicine. <http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx>, date de consultation le 6-6-2010.
- 77) **Diaz. T. G, Cabanillas. A. G (2007)**. Rapid Determination of Sulfathiazole, Oxytetracycline and Tetracycline in Honey by High-Performance Liquid Chromatography. Analytical Letters, n°23 (4), p 607-616.
- 78) **Díez. V, Pérez. JE, Olivera Ángel. M, Restrepo. JG, Villar. D (2013)**. Evaluation of screening tests for antimicrobial residues in milk from individual cows treated with a combination of penicillins G and streptomycin. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (2), p 52-60.
- 79) **Dimitrieska-Stojkovic. E, Hajrulai-Musliu. Z, Stojanovska-Dimzoska. B, Sekulovski. P, Uzunov. R (2011)**. Screening of veterinary drug residues in milk from individual farms in macedonia. Mac. Vet. Rev. Vol 34, No. 1, p 5 ó 13.
- 80) **Ding. X, et Mou. S (2000)**. Ion chromatographic analysis of tetracyclines using polymeric column and acidic eluent. J. Chromatography. A., 897, p 205ó214.
- 81) **Dolliver. H, Kumar. K, Gupta. S et Singh. A (2008)**. Application of enzyme-linked immunosorbent assay analysis for determination of monensin in environmental samples. Journal of Environmental Quality 37, p 1220-1226.
- 82) **Dosogne. H, Arendt. J, Gabriel. A, Burvenich. C (2000)**. Aspect physiologiques de la sécrétion laitière par la mamelle bovine. Ann. Med. Vet., 144 ,(6), p 357-382.
- 83) **Doucet. J. F (1998)**. Traduction de l'introduction de la première publication de Fleming sur la pénicilline. Édition Landbruksforlaget, Oslo, 1998, p. 80-82.
- 84) **Dziedzic. E (1988)**. Les résidus de médicaments vétérinaires anthelminthiques. Thèse de Doctorat vétérinaire. Université Claude Bernard, Lyon, 1988, n°99, p 192.
- 85) **El Watan (2012)**. Filière lait : 711 vaches laitières importées en avril, journal quotidien el Watan, n° 135, édition du 15-05-2012.
- 86) **Elizabeta. D, Zehra. H, Biljana. S, Pavle. S et Risto. V (2011)**. Screening of veterinary drug residues in milk from individual farms in Macedonia. Mac. Vet. Rev. 34(1), p 5 - 13.

- 87) **Enjalbert. F (2002).** Qualité nutritionnelle et diététique du lait en alimentation humaine. Bulletin des GVT, n°15, Avril-Mai-Juin, 2002, p 57-58.
- 88) **Ergin Kaya. S, Filazi. A (2010).** Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 16 (Suppl-A), p 31-35.
- 89) **Espinasse. L, Agrimer. F, Francois. M, Lescop. M, Mahaut. B, Rigal. G (2011).** Guide d'utilisation des kits immunoenzymatiques format microplaques (kits ELISA). IRTAC (Institut de Recherches Technologiques Agro-Alimentaires des Céréales), p 4-23.
- 90) **European Community (EC) (2001).** Notice to applicants and note for guidance. Establishment of maximum residue limits for residues of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, p 4-10.
- 91) **Fabre. J.M et Joyes. D (2000).** Résidus dans le lait : observation des inhibiteurs bien utiliser les médicaments proceedings : lait, qualité et santé, p 10-12.
- 92) **Fabre. J.M, Bouquet. O, Petit. C (2006).** Extrait du livre : Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, p 25-47.
- 93) **Fabre. J.M, Gardey. L, Lherbette. L, De Boisseson. M, Berthelot. X (2000).** Détection des résidus de céfalexine dans le lait en cas d'allongement de la durée du traitement par voie intramammaire. Revue de médecine vétérinaire, n°151, p 965-968.
- 94) **Fabre. J.M, Lepoutre. D (2002).** Changement de méthode de détection des inhibiteurs : les conséquences pour les vétérinaires et les éleveurs. Bulletin des GVT, n°15. Avril-Mai-Juin 2002, p 33-34.
- 95) **Fabre. J.M, Moretain. J.P, Ascher. F, Brouillet. P, Berthelot X (1996).** Les principales causes d'inhibiteurs dans le lait. Résultats d'une enquête dans un millier d'élevages français. Bull. Group. Tech. Vét., 1996-3-B.-522, p 27-31.
- 96) **Fabre. J.M, Moretain. J.P, Berthelot. X (2002).** Évolution de la méthode interprofessionnelle de recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait. Bulletin des GVT, n°15. Avril-Mai-Juin 2002, p 26-28.
- 97) **FAO (1998).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine, Collection FAO: Alimentation et nutrition n° 28, ISBN 92-5-20534-6, <http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F00.htm#Contents>, date de consultation 16-02-2012.
- 98) **FAO/OMS (1995).** Résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires). Codex Alimentarius. Volume n°3. 2^{ème} édition.

- 99) **Faroult. B, Alno. JP (1999)**. Réflexions pour de meilleures pratiques de l'antibiothérapie vétérinaire. Journées nationales GTV-INRA, 1999, p 163-164.
- 100) **Faroult. B, Lepoutre. D, Brouillet. P, Le Page. P (2004)**. Mammmites des bovins (cliniques et subcliniques) : démarches diagnostiques et thérapeutiques. La Dépêche technique, supplément technique n°87 à La Dépêche du 20 décembre 2003 au 2 janvier 2004, p 39.
- 101) **Federicci-Mathieu. C (2000)**. Résidus dans le lait et sécurité alimentaire : quels risques ? quels moyens de maîtrise ?. Bulletin des GVT, n°7, Avril-Mai 2000, p 21-22.
- 102) **Ferraz Spisso. B, Marcus. A.G, alves A.J, Alves Monteiro. M, Mara Belém Lima. A, Ulberg Pereira. M, Alves Luiz. R, Wanderley da Nóbrega. A (2009)**. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Analytica Chimica Acta* 656, p 72684.
- 103) **Pereira. M, Alves Luiz. R, Wanderley da Nóbrega. A (2009)**. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto-enol tautomerism and epimerization phenomena. *Analytica Chimica Acta* 656, p 72684.
- 104) **Fiscus-Mougel. F (1993)**. Les résidus d'antibiotiques à usage vétérinaire dans le lait et la viande. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Claude Bernard, Lyon, 1993, n°53, p 84.
- 105) **Follet. G (2007)**. Utilisation des antibiotiques chez l'animal : Problèmes et Actions, Rencontres Parlementaires "Santé - Société - Entreprise",Assemblée Nationale du 12 novembre 2007 en France.
- 106) **Form. G (2003)**. Les résidus inhibiteurs dans le lait. Evolution des méthodes de détection-Facteurs de risques en région Rhône-alpes. Thèse Méd. Vét., p 20-105.
- 107) **Fritz. J.W et Zuo. Y (2007)**. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. **105**(3), p 1297-1301.
- 108) **FSA (2001)**. Food Standard Agency of UK, Report of the national study on the microbiological quality and heat processing of cows` milk. <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/milksurvey.pdf#page=2>, date de consultation le 12-6-2010.
- 109) **Furusawa. N (2000)**. Rapid liquid chromatographic determination of residual penicillin G in milk. *Fresenius J Anal Chem* 2000. n°368, p 6246626.

- 110) **Furusawa. N (2003).** Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent. *Talanta*. 59 (1), p 155-159.
- 111) **Furusawa. N (2013).** A 100% Water Mobile Phase HPLC-PDA. Analysis of Tetracycline Antibiotics. *American Chemical Science Journal*, 3(4), p 500-506.
- 112) **Garcia. A.S, Garcia, M.H, Franco. J.L, Perea. G.M, Rojas. M.J.V, Cardador. E.M (2001).** Riesgos de residuos en leche debido a tratamientos indebidos. Comunicación XVIII Reunion G-temcal, COVAP. http://www.solomamitis.com/.../COMUNICACION_COVAP_G-TEMCAL.pdf. date de consultation 10-6-2010.
- 113) **Gatermann. R et Bruns .S (2004).** Résidus d'antibiotiques dans l'alimentation humaine et animale : état des lieux et perspective. *EUROFINS*, n°15. Mai 2004, p 2.
- 114) **Gaudin. P (1999).** Origines et conséquences des substances dites inhibitrices dans la filière lait : étude au niveau d'un groupe laitier. Thèse doctorat vétérinaire, école vétérinaire de Nantes, année 1999, p 26.
- 115) **Gaynes .R. et Monnet .D (1997).** The contribution of antibiotic use on the frequency of antibiotic resistance in hospitals. In: *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. Ciba Foundation Symposium, n° 20, p 47-56.
- 116) **Gedilaghine. V, (2005).** La rationalisation du traitement des mammites en exploitation laitière-conception et réalisation d'une enquête d'évaluation de la mise en place de l'action GTV partenaire dans le département de la manche, thèse pour le doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil. p 9-73.
- 117) **Gehring, Smith, (2006).** An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparation used to treat bovine mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy* (2006), n° 29, p. 237-241.
- 118) **Ghaoues. S (2011).** Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est Algérien, Mémoire de Magister en Sciences Alimentaires. Institut de La Nutrition, de L'alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires, Constantine, p 19-25.
- 119) **Ghazi. K et Niar1. A (2011).** Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie), *TROPICULTURA*, 2011, 29, 4. p 193-196.
- 120) **Ghidini. S.M, Zanardi. E, Varisco. G et Chizzolini. R (2002).** Prevalence of Molécules of - lactam Antibiotics in Bovine Milk. In *Lombardia and Emili Romagna (Italy)*. *Ann. Fac. Medi. Vet. di Parma*, vol 22, p 245-252.

- 121) **Ghidini. S.M, Zanardi. E, Varisco. G et Chizzolini. R (2003).** Residues of 13 - lactam Antibiotics in Bovine Milk: Confirmatory Analysis by Liquid Chromatography Tends Mass Spectrometry after Microbial Assay Screening. Food Addit. Contam., 20, p 528-534.
- 122) **Giraudet. C.G.G (1978).** Étude et prophylaxie des accidents de fromagerie dus à une contamination du lait à la ferme par les germes de souillure. Thèse doctorat vétérinaire (1978) école nationale vétérinaire de Toulouse, p 16-19.
- 123) **Gómez-Jimenez. S, Espinosa-Plascencia. A, Valenzuela-Villa. F, Bermúdez-Almada. M (2008).** Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment, page 23-28. Aquaculture 274, p 24629.
- 124) **Griffoul. B (2007).** Une production laitière fortement dépendante des importations. Réussir Lait Élevage Avril 2007. p 2-3.
- 125) **Guetarni. D (2006).** Stratégie pour l'amélioration de la qualité et de la quantité du lait cru en Algérie. Procéd. Journées scientifiques sur la production laitière. Tiaret, Algérie, 2006, p 26-43.
- 126) **Guillemot. M.D et al (2006).** Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Document AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments), p 49-55.
- 127) **Guillemot. M.D (2006).** Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, Document AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments), p 49-55.
- 128) **Guenguen. L, (1995).** Apports minéraux par le lait et les produits laitiers. Cah , nutr diet .1995,3, p 213-217.
- 129) **Guy. P, Royer. D, Mottier. P, Gremaud. E, Perisset. A, Stadler. R (2004).** Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, n°1054 (2004), p 3656371.
- 130) **Gysi. M (2006).** Antibiotiques utilisés en production laitière en 2003 et 2004. Suisse Agric. n°38 (4), p 215-220.
- 131) **Hanzen. C (2008).** La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Approche individuelle Année 2007-2008 http://eap.mcgill.ca/AgroBio/ab_head.htm date de consultation : 14/07/2013.

- 132) **Heeschen W.H., Blüthgen A (1990).** Veterinary drugs and pharmacologically active compounds, Residues and contaminants in milk and milk products, 1990, IDF special issue 9101, p16-39.
- 133) **Helali. A (1999).** Pharmacologie fondamentale et clinique à l'usage des étudiants en médecine. Édition ENG, p. 135.
- 134) **Helio. A, Martins. J, Tereza. A, Kussumi. A, Wang. D, Lebre. T (2007).** A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Journal of the Brazilian Chemical Society, volume 18, n°2 São Paulo. Mars-Avril 2007, p 52-71.
- 135) **Hennel. C. K (2006).** Pharmacovigilance vétérinaire : application aux médicaments anti-bactériens, anti-inflammatoires et antiparasitaires disponibles en médecine équine. Thèse de Doctorat vétérinaire, année 2006, faculté de médecine de Créteil, p. 83-99.
- 136) **Hillerton. J.E, Berry E.A (2004).** Quality of the milk supply: European regulation versus practice. NMC 43rd Annual Meeting Proceedings, 207-214, Charlotte, NC, USA, 1-4. February, 2004. www.nmconline.org/articles/qualityeuro.pdf, date de consultation le 16-6-2010).
- 137) **Holstage. D.M, Punchner. B, Whitehead. G et Galey. F.D (2002).** Screening and mass spectral confirmation of 13 - lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS, J. Agric. Food Chem., 16, 50, p 406-11.
- 138) **Honkanen-Buzalski. T, Reybroeck W (1997).** Antimicrobials. Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. IDF Special Issue 9701. International Dairy Federation, Brussel, p 26633.
- 139) **Honkanen-Buzalski. T, Suhren. G (1999).** Residues of antimicrobial agents in milk and their significance to public health and milk processing. Bulletin IDF No 345. International Dairy Federation, Brussel, p 11612.
- 140) **Hulsen. J et Lam. T, (2007).** Signe de mamelle, édition RoodBont, p 4-38.
- 141) **Jeon. M, kim. J, Paeng. K.j, Park. S.W, Paeng. I.R (2008).** Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. Microchemical Journal, 2008, 88, (1), p 26-31.
- 142) **Junqueira. R.G et Brito. R.B (2006).** Détermination of I3-Iactam Residues in Milk by High Performance Liquid Chromatography. Brazilian Arch. Biol. Technol., 49, p 41-46.
- 143) **Jurdi D.A et Asmar J.A (1981).** Use of a simple fermentation test to detect antibiotic residues in milk. J. Food Prot. 44, p 674-676.

- 144) **Kaale. E, Chambuso. M, Kitwala. J (2008).** Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. *Food Chemistry* 107, p 1289-1293.
- 145) **Kamberi. M, Sulaj. K (2012).** Detection of oxytetracycline residues in milk of cows in rural area in Tetovo. Macedonia. *International Conference on BioScience: Biotechnology and Biodiversity, Step in the Future. The Forth Joint UNS ó PSU.* p 78-81.
- 146) **Kantati.Y. (2011).** Détection des résidus d'antibiotiques dans les viandes de bovins prélevées aux abattoirs de Dakar. Mémoire de master qualité des aliments de l'homme, école Inter-états des Sciences et Médecine vétérinaires (EISMV) de Dakar, p 8.
- 147) **Karamibonari. A.R et Movassagh. H.M (2011).** Détermination of Tylosin Residues by ELISA in Pasteurized Milk Marketed in Tabriz *Global Veterinaria* 6 (6), p 527-529.
- 148) **Karst. C (1984).** Les résidus du chloramphénicol : leur rôle dans les anémies aplasiques humaines. *La semaine vétérinaire*, n° 332, Avril 1984, p 19.
- 149) **Katz. S.E (1982).** Report on antibiotics. *J. AOAC*, 6, p 358-359.
- 150) **Kaya, S.E. et Filazi. A, 2010.** Détermination of antibiotic residues in milk samples. *Kafkas Univ Vet FakDerg*, 16, p 31-35.
- 151) **Kelley. W.N (1982).** Qualitative ampule and multitest for beta-lactam residues in fluid milk products: collaborative study. *J. AOAC*, 65, p 1193-1207.
- 152) **Kelto D.F; Peterson C.S ; Leslie K.E ; Hanzen D. (2001).** Associations between clinical mastitis and pregnancy on Ontario dairy farms. 2nd international symposium on mastitis and milk quality. Vancouver, Bc, Canada. p 13-15.
- 153) **Khaskheli. M, Malik. R.S, Arain. M.A, Soomro. A.H, et Arain. H.H (2008).** Détection of ft - Lactam Antibiotic Residues in Market Milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 7 (5), p 682-685.
- 154) **Koesukwiwat U, Jayanta. S, Leepipatpiboon. N (2007).** Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *Journal of Chromatography A*. 1140 (2007), p 147-156.
- 155) **Konig. C, Simmen. P, et Blasser. J (1998).** Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid--implications for bactericidal activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 42:227,p 32.
- 156) **Konte. M (1999).** Le lait et les produits laitiers, développement de systèmes de production, intensive en afrique de l'ouest

<http://www.sist.sn/gsd/collect/publi/index/assoc/HASHd42a/962d68ac.dir/doc.pdf>, date de consultation le 02/02/2011.

- 157) **Labie. Ch (1981)**. Dispositions législatives destinées à éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait. Recueil de médecine vétérinaire, n°157, p 161-167.
- 158) **Labie. Ch (1985)**. Denrées d'origine animale : Actualité sur les résidus dans les aliments. Revue de médecine vétérinaire, n°2, février 1985, p 99.
- 159) **Labioui. H, Elmoualdi. L, Benzakour. A, El Yachioui. M, Berny .Eh, Ouhsine. M, (2009)**. Étude physicochimique et microbiologique de laits crus. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 2009, 148, p 7-16.
- 160) **Lagrange. L (1989)**. La commercialisation des produits agricoles et agroalimentaires, Lavoisier TEC & DOC, Paris, p 333.
- 161) **Larson. B.L, Smith V.R (1974)**. Lactation: a comprehensive treatise, Voll: The mammary gland / development and maintenance, ACADEMIC PRESS, New-York, p 516.
- 162) **Laurentie. M, Sanders. P (2002)**. Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait. Bulletin GVT, n°15, Avril-Mai-Juin 2002, p 51-55.
- 163) **Lazak. M, Mâamar. G (1978)**. Contrôle de la qualité du lait commercialisé par les crémières de Constantine : étude physico-chimique et pollution chimique. Mémoire d'ingénieur d'état en industrie alimentaire, Constantine, p 2-3.
- 164) **Le Breton, M.-H., M.-C. Savoy-Perroud, J.-M. Diserens (2007)**. Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. Analytica Chimica Acta, 2007. **586** (1-2), p 280-283.
- 165) **Le Talec. J.I (1981)**. Les médicaments susceptibles de laisser des résidus dans le lait. Semaine vétérinaire, n° 203, p 7.
- 166) **Lepage. P (2003)**. Les moyens de diagnostic des infections mammaires en exploitation. Journées Nationales GTV-INRA , Nantes. p 319-33.
- 167) **Lescoeur. E (2003)**. Le tarissement. GDS (Groupement de défense Sanitaire de l'Isère), p. 35.
- 168) **Lecoq R, (1965)**. Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Paris, édition, tome II, 1965, 491p.
- 169) **Loksuwan. J, (2002)**. The Effect of Heating on Multiple Residues of Tetracyclines in Milk, Thammasat Int. J. Sc. Tech., Vol.7, No.3, Sept-Dec 2002, p 17-21.
- 170) **Luo. W, Hansen. E. B, Ang. C. Y. W, Deck. J, Freeman. J. P et Thompson. H. C (1997)**. Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in bovine milk by HPLC with fluorescence detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **45**, p 1264-1268.

- 171) **Luquet. F.M (1985).** Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre). Édition Tec.Doc. Lavoisier, tome 1, p 410-412.
- 172) **Maghuin-Rogister. G, Janosi. A, Helbo. V, Van Peteghem. C, Sanders. E, Van Eeckhout. E, Cornelis. M et Jouret. M (2001).** Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires, Services scientifiques du premier Ministre Affaires scientifiques, techniques et culturelles (SSTC) France. Rapport Final SSTC, p 13-58.
- 173) **Maillard. R, (2002).** Antibiothérapie respiratoire. La Dépêche Vétérinaire, 2002, 80, p 15-17.
- 174) **Mamart. M (2007).** Filière lait en Algérie : Pour quand l'autosuffisance ? Journal el Watan, édition du 7 mai 2007.
- 175) **Marcoz. N (2003).** Étude de stabilité des solutions injectable d'amiodarone. Mémoire pour le travail de diplôme d'analyse pharmaceutique, université de Genève, p 10-11.
- 176) **Marignan. M (2011).** Bronchite vermineuse : maladie respiratoire d'été. GDS info / Edition 2011 p. 28.
- 177) **Martel J-L., Vandaele. E (1999).** Epidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez les bovins. Point Vét., 1999, 30 (198), p 195-202.
- 178) **Mathieu J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. Lavoisier TEC&DOC, Paris, p 220.
- 179) **Merad. M et Merad. R (2001).** Toxicité des antibiotiques. Médecine du Maghreb 2001, n°91, p. 17.
- 180) **Mietton. B, Desmazeaud. M et Deroissart. H (1994).** Les bactéries lactiques. Édition Lavoisier, volume 2, p 55-134.
- 181) **Milhaud. G (1981).** Appréciation de la nuisance des résidus d'antibiotiques : toxicité directe du chloramphénicol. La Semaine vétérinaire, n° 203, p 8.
- 182) **Milhaud. G, Pinault. L, Person. J.M, Bodin. G, Puyt. J. D, Enriquez. B et Euzeby. J (1982).** Les antibiotiques, École nationale vétérinaire d'Al Fort et de Nantes, p. 2-135.
- 183) **Mitchell. M (2005).** Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait de chèvre. Artificial Intelligence, n° 170(18), p 1194-1212.
- 184) **Moats, W.A. (2000).** Determination of Tetracycline Antibiotics in Beef and Pork Tissues Using Ion-Paired Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **48**(6): p 2244-2248.

- 185) **Moats.W. A (1999)**. Confirmatory test results on milk from commercial sources that tested positive by β -lactam antibiotics screening tests. *Journal of AOAC International*, **82**, p 1071-1076.
- 186) **Moretain. J.P (2000)**. La recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait. *Proceedings lait, qualité et santé*, p 19-22.
- 187) **Moulin. G (1999)**. Code de bon usage des antibiotiques en élevage, Conférence : the use of antibiotics in animals ensuring the protection of public health , Mars 1999 OIE, paris, France.
- 188) **Mourot et Loussouarn (1981)**. Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire. *Recueil de médecine vétérinaire*, n°157, p 155-157.
- 189) **Mourot. D (1981)**. Appréciation de la nuisance des résidus d'antibiotiques : la nuisance technologique. *Semaine vétérinaire*, n° 203, p 8.
- 190) **Movassagh. HM, Karami. AR (2010)**. Determination of Antibiotic residues in Bovine Milk in Tabriz, Iran. *Global Veterinaria*, 5, p 195-197.
- 191) **Msagati. T, Nindi. M (2005)**. Determination of β -lactam residues in foodstuffs of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* 100 (2007), p 836-844.
- 192) **Nascimento. G.G.F, Maestro. V., Campos. M.S.P (2001)**. The occurrence of antibiotic residues in milk in commercial establishments in the city of Piracicaba, Sao Paulo. Brazil. *Rev. Nutr.* 14 (2), p 119-124.
- 193) **Navratilova, P., Borkovcova, I., Drackova, M., Jan-tova, B and Vorlova, L. (2009)** Occurrence of tetracycline chlortetracycline, and oxytetracycline residues in raw cow's milk, *Czech J. Food Sci.*, 27: 3796385.
- 194) **Navratilova. P (2008)**. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk ó a review. *Czech J. Food Sci.*, 26, p 3936401.
- 195) **Navratilova. P, Borkovcova. I, Drackova. M, Jan-tova. B et Vorlova. L (2009)**. Occurrence of tetracycline chlortetracycline, and oxytetracycline residues in raw cow's milk. *Czech J. Food Sci.*, 27, p 3796385.
- 196) **Nikoli . N, Mirecki. S, Blagojevi . M, (2011)**. Inhibitory substances in raw milk, *Mljekarstvo* 61 (2), p 182-187.
- 197) **Nouws. J, Loeffen. G, Schouten. J, Van Egmond. H, Keukens. H, et Stegeman. H (1998)**. Testing of Raw Milk for Tetracycline Residues. *J Dairy Sci* 81, p 234162345.
- 198) **Okolo M.I (1986)**. Bacterial drug resistance in meat animals : a review. *International Journal of Zoonoses*, 1986, 13, (3), p143-152

- 199) **Oliveira. R, De Pietro. A, Cass. Q (2006).** Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup. *Talanta* n° 71, p 1233-1238.
- 200) **Oruç. H, Sonal. S (2005).** Determination of Oxytetracycline, Penicillin G and Sulphadimidine Residues in Cow Milks in Bursa (Turkey). *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* N° 24, p 11-13.
- 201) **Ouellette. D (2004).** Du bon lait pour du bon fromage, Conférence : symposium sur les bovins laitiers, 21 octobre 2004, hôtel des seigneurs, saint-hyacinthe, Québec, Canada.
- 202) **Panaiva. L (2006).** Techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites, Conférence Eurocopter, 1^{er} Juin 2006, Marseille, France.
- 203) **Pena, A. (2007).** Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Edible Swine Tissues by Liquid Chromatography with Spectrofluorometric Detection and Confirmation by Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. **55**(13), p 4973-4979.
- 204) **Pepin. G, Boudene. Cl (1977).** Traitement des femelles laitières par voie galactophore à l'aide d'une nouvelle pénicilline semi synthétique. *Recueil de médecine vétérinaire*, n°153. p 565-571.
- 205) **Person. J. M (1984).** Influence des résidus d'antibiotiques sur la flore digestive du consommateur. *La Semaine vétérinaire*, n° 203, Février 1981, p 8.
- 206) **Phillips. I, Casewell. M, Cox. T, De groot. B, Friis. C, Jones. R, Nightingale. C, Preston. R et Waddell. J (2004).** Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother*, 53, p 28-52.
- 207) **Pinar. A (2007).** the confirmation of the commercial kits used in the detection of antibiotics in milk with hplc (high pressure liquid chromatography), master of science In food engineering, school of Engineering and Sciences of Zmir, Turkey, p 10-44.
- 208) **Popelka P.E, Nagy. J, Popelka P.A, Sokol. J, Hajurka. J, Cabadaj. R, Marcinák. S et Bugarský. A (2003).** comparison of various methods for penicillin residue detection in cow milk after, intramammary and parenteral treatment, *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47, p 203-209.
- 209) **Popelka. P, Nagy. J, Popelka. P, Marcincak. S, Rosanska. H, Sokol. J (2004).** Comparison of Sensitivity of various screening assays and liquid chromatography technique for penicillin residue detection in milk. *Bull Vet Inst Pulawy* 48, p 273-276.

- 210) Pougheon. S, (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse Pour l'obtention du grade de docteur vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, p 14-15.
- 211) **Poutrel. B (2002)** Actualités sur les méthodes de diagnostic des mammites. Journées nationales GTV INRA, Tours, p 157-162.
- 212) **Poutrel. B (1985).** Généralités sur les mammites de la vache laitière : processus infectieux, épidémiologie, diagnostic, méthodes de contrôle. Rec. Méd. Vét., 1985, **161** (6-7), p 497-511.
- 213) **Pujol-Dupuy. C (2004).** Accidents alimentaires d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et produits laitiers. Thèse doctorat (médecine-pharmacie) université Claude-Bernard - Lyon I. p 20-25.
- 214) **Puyt. J.D (2003).** Des résidus de médicament très surveillés. Revue : Réussir Lait Élevage, Réussir Bovins Viande : Dossier spécial médicaments vétérinaires, Décembre 2003.
- 215) **Raskin. P, Romnee. J.M, Kerrou. M, Dufrasne. I, Istasse. I (2007).** Inhibitory substances of bacillus steothermophilus var.calidolactis present in milk of cow with no antibiotic treatment. Renc. Rech. Ruminants, n°4, p 291.
- 216) **Rassouli. A, Abdolmaleki. Z, Bokae. S, Kamkar. A et Shams. Gh.R (2010).** A cross-sectional study on Oxytetracycline and Tetracycline residues in pasteurized milk supplied in Tehran by an HPLC method. International Journal of Veterinary Research. 4, p 1-5.
- 217) **Reed . L-A, Siewicki . T-C, Shah . J-C (2004).** Pharmacokinetics of oxytétracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, Aquaculture 232 (2004), p 11 ó28.
- 218) **Rexach. L, Petransxiene. D (1987).** Détection et identification des antibiotiques dans le lait au moyen de récepteur de fixation microbien (Chram test II). Revue : Science des aliments, Volume 7 N° Hors série VII, 1987, édition LAVOISIER, p 275-278.
- 219) **Reybroeck. W (2004).** Résidus d'antibiotiques dans le lait : Utilisation des kits de dépistage des inhibiteurs. Le Point Vétérinaire, n° 242, Janvier-Février 2004, p 52-57.
- 220) **Riantou. B. A (2008).** Contrôle des résidus : exemple des antibiotiques dans les aliments au senegal. Conférence de l'OIE sur les médicaments vétérinaires en Afrique « harmonisation et enregistrement de la distribution et du contrôle de qualité », Dakar 25-28 Mars 2008.
- 221) **Robb. Ed (2006).** Pour un fromage de meilleure qualité. Pour l'amour des vaches, Volume 5, n°1, p 6.

- 222) **Romnee .J.M, Raskin. P, Istasse. L, Laloux. J, Guyot. A (1999).** Incidence des facteurs alimentaires sur l'obtention de résultats faux positifs lors de la détection des antibiotiques dans le lait par la méthode Delvotest SP. Lait, n°79. Inra/Elsevier, Paris, p 341-346.
- 223) **Romnee. J.M (2007).** Le contrôle des antibiotiques à la ferme : hier et aujourd'hui. Laboratoire national de référence, lait et produits laitiers, Journée d'étude le 7 mai 2007, AFSCA.
- 224) **Romnee. J.M (2009).** Potentialités des tests microbiens et de la spectrométrie infra-rouge dans la recherche d'antibiotiques dans le lait, Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique, p 50-190.
- 225) **Ruegg, P.L. (2005).** Relationship between bulk tank milk somatic cell count and antibiotic residues. NMC Annual Meeting Proceedings, 28-35. January 16-19 2005, Orlando, Florida. <http://www.nmconline.org/articles/residues.pdf>, date de consultation le 14-6-2010.
- 226) **Rybinska. K, Postupolski. J, Szczesna. M (1995).** Residues of antibiotics and other inhibitory substances in milk. Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 46 (3), p 239-241.
- 227) **Ryckaert. I (2003).** 42 questions sur le lait. Édition IMP Bruxelles, septembre 2003, p 13-56.
- 228) **S>alomskien. E, J., Z> virdauskien. E, R, et Orz>ekauskien. E (2002).** Naujo preparato inhibitoriams piene nustatyti k_urimas ir jo palyginimas su analogais (Development and comparative analysis of a preparation for determining inhibitors in milk). Maisto Chemija ir Technologija (Food Chemistry and Technology), 36, p 199-206.
- 229) **Sachot. D, Puyt .J.D (2001).** Les différents calculs du temps d'attente. Le point vétérinaire, n° 212, Janvier-Février 2001. p 48-51.
- 230) **Samanidou. V (2005).** Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. Journal of Separation Science, 2005. **28**(17), p 2247-2258.
- 231) **Samanidou. VF, Nisyriou. SA, Papadoyannis. IN (2007).** Development and validation of an HPLC method for the determination of penicillin antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union Decision 2002/657/EC. J Sep Sci. 2007, n°30 (18), p 193-201.
- 232) **Sanders. P (2005).** L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. Bulletin de l'académie vétérinaire de France, tome 158, n°2, p 139-140.

- 233) **Saunier. C et Godin. L (2013)**. Activité technologique en analyse biochimique, E.T.S.L paris, p. 5-50., <http://ligodin.free.fr>, date de consultation le 27/11/2010.
- 234) **Schelcher. F, Valarcher J.-F (1999)**. Bronchopneumonies infectieuses des bovins, Renc. Rech. Ruminants, 1999, 6, p 177-182.
- 235) **Schenck. F.J., Callery P.S (1998)**. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. J. Chromatogr. A, 1998, **812**, p 99-109.
- 236) **Schneider. M-J, Braden . S-E, Reyes-Herrera. I, Donoghue. D-J (2007)**. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection, page 9-12. Journal of Chromatography B, 846, p 8-13.
- 237) **Schwarz. S, Kehrenberg. C (2001)**. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, 17, (6), p 431-437.
- 238) **Scippo. M.L, Maghuin-Rogister. G (2006)**. Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse : méthodes biologiques de dépistage. Annale de médecine vétérinaire, n°150, p 125-130.
- 239) **Seegers H, Menard JL, Fourichon C. (1997)**. Mammites en élevage bovin laitier : importance actuelle, épidémiologie et plans de prévention. Rencontres Rech. Ruminants, 1997, **4**, p 233-242.
- 240) **Sérieys. F, (2004)**. Antibiothérapie des infections mammaires quelle(s) voie(s) de traitement ?. Bulletin des GVT, n°24, Mars-Avril, 2004, p 42-45.
- 241) **Shalini. J (2002)**. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, n° 28, p 7956809.
- 242) **Shitandi. A (2004)**. Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. J. Food Prot., 67, p 3996402.
- 243) **Shrick F.N, Hockett M.E; Saxton A.M, Lewis M.J; Dowlen H.H, Oliver S.P. (2001)**. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. J. dairy. Sci. Jun, 84(6). p 1407-1412.
- 244) **Siousarran. V (2003)**. Hygiène du lait cru en zone urbaine et périurbaine de Niamey, Niger, Rapport de stage, p 42-43.
- 245) **Sorensen. L. K, Rasmussen. B. M, Boison. J. O et Keng. L (1997)**. Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high performance liquid chromatographic method. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, **694**, p 383-391.

- 246) **Sraïri M.T, Hasni. I, alaoui. A, Hamama, Faye. B (2004).** Qualité physico-chimique et contamination par les antibiotiques du lait de mélange en étables intensives au Maroc. Renc. Rech. Ruminants, n°11, p 116-117.
- 247) **Sternesjo, A., Johnsson, G. (1998):** A novel rapid enzyme immunoassay for detection of β lactam residues in farm raw milk. J. Food Prot., 61: 808-811.
- 248) **Stolker. A. M, Rutgers. P, Oosterink. E, Lasaroms J. J. P, Peters J. B, Van Rhijn J. A, Nielen W.F (2008).** Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC β ToF-MS. Anal Bioanal Chem, 391, p 230962322.
- 249) **Stoltz. R, (2008).** Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : évaluation et maîtrise de ce danger, thèse de doctorat vétérinaire, université Claude-Bernard - Lyon I (médecine - pharmacie), p 11-79.
- 250) **Sudershan. V et Bhat. R (1998).** A survey on veterinary drug use and residues in milk in Hyderabad. Food Addit. Contam., 12, p 645-650.
- 251) **Suhren. G (1995).** Possibilities and limitations of microbiological inhibitor tests. In: Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. IDF Special Issue No. 95 05. Kiel, Germany. IDF, Brussel, p 1596171.
- 252) **Sun. X, He. X, Zhang. Y, Chen. L (2009).** Determination of tetracyclines in food samples by molecularly imprinted monolithic column coupling with high performance liquid chromatography, Talanta 79, p 9266934.
- 253) **Sylvestre. F, Boucher. D, Labrecque. O, Côté. G, (2008).** Les infections associées à *mycoplasma bovis* chez les bovins laitiers, Raizo bulletin zoo-sanitaire, No 58, juillet 2008, p 1-3.
- 254) **Takeba. K, Fujinuma. K, Miyazaki. Tn et Nakazawa. H (1998).** Simultaneous determination of β -lactam antibiotics in milk by ion-pair liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 812, p 205-211.
- 255) **Tarbin. J. A, Farrington. W. H, Shearer. G (1995).** Determination of penicillins in animal tissues at trace residue concentrations Part I. Determination of benzylpenicillin in milk by reversed-phase liquid chromatography with solid phase extraction and liquid Chromatographic fractionation clean-up. Analytica Chimica Acta, Volume 318, p 95-101.
- 256) **Tolentino, R.G., M.N. Perez, G.D. Gonzalez, S.V.Y. Léon, M. Gonzalz, G.P. Flore (2005).** Détermination de la présence de 10 antimicrobiens résiduels dans le lait pasteurisé mexicain. Interciencia, 30, p 291-294.
- 257) **Toma. B, Dufour. B et Sanaa. M (2001).** Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. 2ème éd. :AEEMA, p 696.

- 258) **Unusan, N. (2009).** Occurrence of chloramphenicol, streptomycin and tetracycline residues in ultra-heat treatment milk marketed in Turkey. *Int J Food Sci Nutr.*, 60(5), p 359-64.
- 259) **Van Den Bogaard A.E. (2001)** Human health aspects of antibiotic use in food animals : a review *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 2001, 126, (18), p 590-595.
- 260) **Vénéreau. E (2011).** Les pathologies respiratoires en élevages. **GDS info / Edition 2011.** p 34.
- 261) **Verdon. E, Couedor. P (1999).** Multiresidue analytical method for determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed phase HPLC after precolumn derivatization. *J. AOAC Int.*, 1999, **82**, p 1083-1095.
- 262) **Verhnes. R, Vandaele. E (2002).** Détection rapide des inhibiteurs dans le lait. *Le point vétérinaire*, n° 227, Juillet-Août 2002, p 16-17.
- 263) **Wang. Q Liu. Q, Li. J (2004).** Tissue distribution and elimination of oxytétracycline in perch *Lateolabrus janoicus* and black seabream (*Sparus macrocephalus*) following oral administration page 32-39. *Aquaculture* 237 (2004), p 31640.
- 264) **Wattiaux. M.A (1997).** Dairy essentials (1st edition) : Nutrition and feeding. Université de Wisconsin-Madison, p 1-28.
- 265) **Wehrmuller. K ; Ryffel. S (2007).** Produits au lait de chèvre et alimentation, 2007, ALP actuel, N° 28.
- 266) **Weisen. J.P (1974).** La prophylaxie des mammites. Édition Vigot frères, p 16-19.
- 267) **Yala. D, Merad. A. S, Mohamedi. D, Ouar Korich .M. N (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb* 2001, n°91.
- 268) **Zanditenas. M (1999).** L'usage des antibiotiques par les vétérinaires praticiens : enjeu sanitaire et socioéconomique, conséquences pour la santé publique et évolution prévisible de la profession vétérinaire, Thèse de Doctorat vétérinaire, Créteil, 1999, n°88, p 124.
- 269) **Zhang. Y. D, Zheng. N, Han. R.W, Zheng. B. Q, Yu. Z.N, Li. S.L., Zheng. S.S et Wang. J.Q (2014).** Occurrence of Tetracyclines, Sulfonamides, Sulfamethazine and Quinolones in Pasteurized milk and UHT milk in China's Market. *Food Control.*, 36 (1), p 238-242.
- 270) **Zhao. F, Zhang. X, et Gan. Y (2004).** Determination of tetracyclines in bovine milk by highperformance liquid chromatography with coulometric electrode array system. *J. Chromatography A.*, 15, p 1096114.
- 271) **Zhenfeng. Y, Yueming. Q, Xiuyun. L, Caini. J (2006).** Determination of Multi-Residues of Tetracyclines and Their Metabolites in Milk by High Performance Liquid

Chromatography-Tandem Positive-ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chin J Anal Chem*, 34(9), p 1255-1259.

- 272) **Ziadi. H, (2010).** Essai d'amélioration du taux de rétention de la tétracycline dans un polymère à empreinte moléculaire formé de co-polymères fonctionnalisés de l'acide lactique, Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître en sciences pharmaceutiques, Université de Montréal, 1-57.
- 273) **Zinedine. A, Faid. M, Benlemlih. M, (2007).** Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique. *REMISE*, volume 1, n°1, p 1-9.
- 274) **Zuo. Y, Chen. H, et Deng. Y (2002).** Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and Pu-Erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57, p 307-316.
- 275) **ivirdauskiene. R, Aldauskiene. J, Urb-iene. L (2004).** Inhibitori grupi nustatymas flaiame karvi piene mikrobiologiniais metodais. *Maisto chemia ir technologija* 38 (2), p 55-62.
- 276) **Zvirdauskiene. R et Salomskiene. J (2007).** An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk. *Food Control*, 2007. 18 (5), p 541-547.