

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière Sciences Biologiques

**Option : Biologie et physiologie de la reproduction**

**Thème**

Etude rétrospective des facteurs affectant les résultats de dosage de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé et leur impact sur la reproduction chez la vache gestante

Présenté par :

Mme SEKHRI LILA  
Melle RIGHI SAMIA

**Date de soutenance : 18/07/2022**

**Devant le jury :**

<b>• Nom</b>	<b>Grade</b>	<b>Qualité</b>
Mme CHAICHI W.	MCA/USDB <sub>1</sub>	Présidente
Mme BRADEA MS.	PR/ USDB <sub>1</sub>	Examinatrice
Mme KHELILI A.	DOCTEUR/CRD	Promotrice
Mr DOUKARA K.	MCA / USDB <sub>1</sub>	Co-promoteur

**Promotion : 2021-2022**

## REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions le bon Dieu, tout puissant pour nous avoir accordé la fois, la santé, la patience, le courage, la force, afin de pouvoir accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude envers les personnes qui ont rendu ce travail possible.

D'abord un grand remerciement à Madame Benabdelaziz Aldjia (Epse Khelili) Docteur notre promotrice pour tout le soutien qu'elle nous a porté, pour sa disponibilité, sa confiance et surtout sa gentillesse, qu'elle trouve ici notre reconnaissance et notre profond respect.

Monsieur Doukara Kamel Maitre-assistant à l'université de Blida notre Co promoteur, nous le remercions vivement et nous lui demandons de trouver ici l'expression de notre profond respect.

Madame Chaichi Maitre assistante à l'université de Blida de nous avoir honoré en présidant le jury de ce modeste travail.

Madame Bradage Maria Stella Maitre assistante à l'université de Blida d'accepter d'examiner ce mémoire.

Monsieur Khelili Rachid pour ses conseils et son encouragement, nous l'assurant de notre profonde reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos enseignants de l'institut des sciences de la nature et de la vie (Blida). Un remerciement particulier à Madame Hadjaj Dalila, la responsable du PFE et nos ami(e)s et collègues pour tous les moments que nous avons vécu et partagé avec eux durant cette année.

## Dédicaces

*A la mémoire de mes parents et mon frère*

*A toute ma famille, source d'espoir et de motivation*

*A tous mes amis, tout particulièrement Hakim et liliya*

*A tous mes amis de promotion de master 2 en physiologie de la reproduction*

*Je dédie ce travail à tous ce qui a participé à ma réussite*

*Toute personne qui occupe une place dans mon cœur*

*A vous cher lecteur*

**Samia Righi**

## Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à ceux que je ne cesserai jamais de les aimer à mes chers parents que dieu les protège. Ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant de l'amour, tendresse et une éducation digne de confiance.*

*A mes chers frères et sœurs pour leurs encouragements permanents, aide et leur soutien moral particulièrement ma sœur Fatiha qui a toujours été à mes coté et m'a soutenu tout le long de mon master*

*A mes adorables neveux et nièce que j'aime beaucoup surtout Sabrina, Sarah et Inès*

*A mon marie pour tout le soutien qui m'a porté, sa patience et son encouragement*

*A mes deux jolies filles, celles qui m'ont donné de la joie et du courage Djamila et Nesrine*

*A tous mes amies*

**Lila Sekhri**

## Liste des abréviations

GnRH : Gonadotrophin releasing hormone

LH : Luteinizing hormone ou hormone lutéinisante

r : Coefficient de corrélation

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

PH : Potentiel hydrogène

TA : Température ambiante

C° : Degré Celsius

< : Inférieur

> : Supérieur

% : Pourcent

P : Probabilité

Prog : Progestérone

P4 : Progestérone

ng/mL : Nanogramme par millilitre

Nmol/L : Nano môle par litre

Cpm : Coup par minute

PVC : PolyVinylChloride

QC : Contrôle qualité

## Liste des tableaux

### Partie bibliographique :

**Tableau n°01** : Niveau de progestérone (ng/mL) dans le sang ou le lait écrémé en fonction de l'état physiologique femelle .....18

**Tableau n°02** : Classification des méthodes de dosage immunologiques .....22

### Partie expérimentale :

**Tableau n°03** : Matériels et réactifs .....27

**Tableau n°04** : Mode opératoire du dosage RIA de la progestérone.....29

**Tableau n°05** : Constitution des sous lots de l'expérimentation.....31

### Partie résultats et discussion

**Tableau n°06** : La variation de la progestérone en (Nmol/L) et le PH dans le lait entier en fonction des facteurs de variation étudiés : traitement des échantillons-température et la durée de stockage.....33

**Tableau n°07** : La variation de la progestérone en (Nmol/L) et le PH dans le lait écrémé en fonction des facteurs de variation étudiés : traitement des échantillons-température et la durée de stockage. ....34

**Tableau 08** : Résultats des effets des facteurs de variation et des interactions inter facteurs (P) sur les variables mesurées progestérone et PH.....39

## Liste des figures

### Partie bibliographique :

<b>Figure n°01</b> : Formule développée de la progestérone.....	14
<b>Figure n°02</b> : Représentation schématique de la synthèse de la progestérone et de sa régulation au sein de la cellule lutéale.....	15
<b>Figure n°03</b> : Exemple typiques de profil progestéronémique chez la vache.....	20
<b>Figure n°04</b> : Principe de la méthode immun dosage par compétition.....	23
<b>Figure n°05</b> : Principe de la méthode immun dosage non compétitif.....	24

### Partie résultats et discussion:

<b>Figure n°06a</b> : Variation de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé non traité en fonction de la température et la durée de stockage.....	35
<b>Figure n°06b</b> : Variation du pH dans le lait entier et le lait écrémé non traité en fonction de la température et la durée de stockage.....	35
<b>Figure n°07a</b> : Variation de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé traité à l'Azide de sodium en fonction de la température et la durée de stockage.....	36
<b>Figure n°07b</b> : Variation du pH du lait entier et du lait écrémé traité à l'Azide de sodium en fonction de la température et la durée de stockage.....	36
<b>Figure n°08a</b> : Variation de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé traité au Bichromate de potassium en fonction de la température et la durée de stockage.....	37
<b>Figure n°08b</b> : Variation du pH du lait entier et du lait écrémé traité au Bichromate de potassium en fonction de la température et la durée de stockage.....	37
<b>Figure n°09</b> : Comparaison de l'effet des traitements sur les concentrations de la progestérone...	40
<b>Figure n°10</b> : Interaction des effets traitements et jours de stockage sur la progestérone.....	41
<b>Figure n°11</b> : Comparaison de l'effet des traitements sur les pH.....	42

**Figure n°12** : Comparaison de l'effet des températures de stockage sur les concentrations de la progestérone.....44

**Figure n°13** : Comparaison de l'effet des températures de stockage sur les PH.....45

**Figure n°14** : Comparaison de l'effet des jours de stockage sur les concentrations de la progestérone en fonction des traitement.....46

**Figure n°15** : Comparaison de l'effet des jours de stockage sur le PH en fonction des traitements.....48

**Figure 16** : Comparaison de l'effet des jours de stockage sur le pH en fonction des températures de stockage.....48

## **Table des matières**

Remerciements.....	01
Liste des abréviations.....	04
Liste des tableaux.....	05
Liste des figures.....	06
Résumés.....	10
Introduction.....	13

### **Chapitre 1 : Partie Bibliographique**

<b>I .1. Généralités sur la progestérone .....</b>	<b>14</b>
<b>I .1.1. Structure de la progestérone .....</b>	<b>14</b>
<b>I .1.2. Propriétés physiques .....</b>	<b>14</b>
<b>I .1.3. Propriétés chimiques .....</b>	<b>14</b>
<b>I .1.4. Métabolisme de la progestérone .....</b>	<b>15</b>
a) Biosynthèse .....	15
b) Diffusion et stockage .....	16
c) Elimination .....	16
d) Lieux de synthèse .....	16
<b>I .1.5. Propriétés physiologiques de la progestérone .....</b>	<b>16</b>
<b>I .2. Evolution de la progestéronémie .....</b>	<b>18</b>
<b>I .3. L'intérêt de doser la progestérone et son importance dans la reproduction .....</b>	<b>19</b>
<b>I .4. Les techniques d'immunodosage de la progestérone .....</b>	<b>21</b>
<b>I .4.1. Méthode par compétition ou avec réactif limitant : méthode indirecte .....</b>	<b>22</b>
a) Le principe .....	23
<b>I .4.2. Méthode sans compétition ou avec un excès de réactif : méthodes</b>	
Immunométriques ou méthodes directes .....	23
a) Le principe .....	23
b) Caractéristiques de la méthode .....	24
<b>I .5. Stabilité de la progestérone dans les différents fluides biologiques .....</b>	<b>24</b>

## **Chapitre 2 : Partie Expérimentale**

<b>II .1.</b> Échantillonnage .....	27
<b>II .2.</b> Description des conservateurs utilisés .....	28
<b>II .2.1.</b> Azide de Sodium .....	28
<b>II .2.2.</b> Le Bichromate de potassium .....	28
<b>II .3.</b> Méthodes de travail .....	28
<b>II .3.1</b> Protocole de dosage RIA de la progestérone .....	28
<b>II .3.2.</b> Traitements .....	30
<b>II .4.</b> Analyse statistique des données expérimentales .....	31

## **Chapitre 3 : Partie Résultats et discussion**

<b>III .1.</b> Variation des concentrations de progestérone .....	38
<b>III .2.</b> Effets des facteurs étudiés .....	38
<b>III .3.</b> Effet du Traitement sur la variation des concentrations de progestérone .....	39
<b>III .4.</b> Effet du Traitement sur la variation du pH .....	41
<b>III .5.</b> Effet de la Température de stockage sur la concentration de progestérone .....	43
<b>III .6.</b> Effet de la Température de stockage sur la variation du pH .....	44
<b>III .7.</b> Effet de la Durée de stockage sur la concentration de progestérone .....	45
<b>III .8.</b> Effet de la Durée de stockage sur la variation du pH .....	46
Conclusion générale et perspectives .....	49
Référence bibliographiques.....	51

## **Résumé :**

L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact de l'utilisation d'agents de conservation tels que l'Azide de sodium et le Dichromate de potassium et de trois températures de stockage (4°C, 25°C et 37°C) sur la stabilité de la progestérone et du pH du lait entier et du lait écrémé de vache (P4) pendant une durée de stockage de un (01) mois. Ceci afin de pouvoir fixer la procédure d'échantillonnage de lait entier et écrémé, la plus adaptée d'un point de vue simplicité et précision, permettent d'aboutir à un résultat de dosage de progestérone fiable. Ce travail a été effectué sur un échantillon de lait provenant de deux (02) vaches gestantes. La progestérone a été mesurée par radioimmunos dosage et le pH par pH-mètre.

L'analyse de la variance a révélé l'effet très hautement significatif ( $p < 0,0001$ ) du traitement, de la température et la durée de stockage, sur la variabilité de la progestérone et du pH du lait entier et du lait écrémé, à l'exception de la température de stockage, qui n'a pas enregistré d'effet significatif ( $p < 0.148$ ) sur la variation de la progestérone du lait écrémé. Les tests de Newman et Keuls au seuil 5% pour le facteur traitement, a fait ressortir pour le lait entier, l'efficacité du conservateur Dichromate de potassium avec les trois températures de stockage et pour le lait écrémé, dont les fluctuations de progestérone ont été atténuées, l'efficacité égale des deux conservateurs utilisés par rapport au lot témoin. Quant au facteur température de stockage, le test de comparaison des moyennes classe la température de stockage de 4°C la plus favorable à la stabilité de la progestérone dans le lait, surtout entier. Pendant la durée de stockage de 28 jours, les concentrations de progestérone dans le lait entier restent plus ou moins stables durant les 6-7 premiers jours de stockage puis baissent graduellement à 18 jours de stockage et se stabilisent. Pour le lait écrémé, la progestérone reste stable jusqu'aux 11ème jours de stockage avec les conservateurs, puis se dégrade lentement. Le suivi de l'évolution du pH du lait entier et écrémé par rapport à la dégradation de la progestérone a montré des valeurs du coefficient de corrélation de Pearson, calculé pour chaque traitement et pour chaque température de stockage, inférieures à 0.80, indiquant des relations positives modérées entre ces deux variables mesurées.

**Mots clés : stabilité de la progestérone, pH du lait, lait entier, lait écrémé, conservation, radioimmunos dosage**

## **Abstract:**

The aim of this study is to determine the impact of the use of preservatives such as sodium Azide, potassium Dichromate and three different storage temperatures (4°C, RT and 37°C) on stability of progesterone and pH of whole and skimmed milk, collected from pregnant cows, during a storage period of 1 month. This in order to be able to set the procedure for sampling whole and skimmed milk, the most suitable from a point of view of simplicity and precision, making it possible to achieve a reliable progesterone assay result. This work was carried out on a sample of milk from two pregnant cows. The progesterone was measured by radioimmunoassay and pH by pH meter.

The analysis of variance revealed very highly significant ( $p < 0.0001$ ) effect of processing, temperature and storage time on the variability of progesterone and pH of whole milk and skimmed milk. , with the exception of storage temperature, which did not register a significant effect ( $p < 0.148$ ) on the variation of skim milk progesterone.

The Newman and Keuls tests at the 5% threshold for the processing factor, highlighted for whole milk, the efficiency of the potassium dichromate preservative with the three storage temperatures and for skimmed milk, the progesterone fluctuations were attenuated, the equal efficiency of the two preservatives used compared to the control batch. As for the storage temperature factor, the middle class comparison test has the storage temperature of 4°C most favorable to the stability of progesterone in milk, especially whole milk.

During the storage period of 28 days, the concentrations of progesterone in whole milk remain more or less stable during the first 6 and 7 days of storage then gradually drop at 18 days of storage and stabilize. For skimmed milk, progesterone remains stable until the 11th day of storage with preservatives, and then slowly degrades.

The monitoring of the evolution of the pH of whole and skimmed milk in relation to the degradation of progesterone showed values of the Pearson correlation coefficients, calculated for each treatment and for each storage temperature, below 0.80, which indicates moderate positive relationships between these two measured variables.

**Key words: progesterone stability, milk pH, whole milk, skimmed milk, preservation, radioimmunoassay**

## ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تأثير استخدام المواد الحافظة مثل أزيد الصوديوم وثاني كرومات البوتاسيوم ودرجات حرارة التخزين الثلاث (4 درجات مئوية و25 درجة مئوية و37 درجة مئوية) على ثبات البروجسترون ودرجة الحموضة للحليب كامل الدسم. وحليب البقر منزوع الدسم (P4) خلال فترة تخزين لمدة شهر (01). هذا من أجل التمكن من ضبط إجراءات أخذ العينات للحليب الكامل والخالي من الدسم، وهو الأنسب من وجهة نظر البساطة والدقة، مما يجعل من الممكن تحقيق نتيجة فحص هرمون البروجسترون الموثوقة. تم تنفيذ هذا العمل على عينة لبن من (02) بقرة حامل. تم قياس البروجسترون عن طريق المقاييس المناعية الشعاعية (مجموعات RIA progesterone DPC los Angeles) ودرجة الحموضة بواسطة مقياس PH الهيدروجيني.

التأثير المعنوي ( $P < 0.0001$ ) للعلاج، لدرجة الحرارة و مدة التخزين على التقلبات في تركيزات البروجسترون ودرجة الحموضة لكل من الحليب كامل الدسم والحليب منزوع الدسم، ما عدا درجة حرارة التخزين لم يكن هناك تأثير معنوي ( $p < 0.148$ ) على تقلبات في تركيزات البروجسترون بالنسبة لحليب منزوع الدسم. مقياس Newman-Keuls ودرجة 5% أظهر ان عامل الحافظ المستعمل في الحليب الكامل ان ثمة إيجابية حافظ ثاني كرومات البوتاسيوم مع قيمة الثلاث درجات الحرارة المستعملة. بالنسبة للحليب منزوع الدسم هناك تخفيف التقلبات في تركيزات البروجسترون، كذلك اظهر فعالية متساوية للمادتين الحافظة المستخدمتين مقارنة مع دفعة التحكم غير المعالجة. فيما يخص عامل درجة حرارة التخزين أظهر تحليل متوسط تركيز البروجسترون الذي تم الحصول عليه، يصنف درجة حرارة التخزين 4 درجات مئوية هي الأكثر ملاءمة لاستقرار البروجسترون في عينات الحليب، وخاصة الحليب كامل الدسم. خلال مدة التخزين التي تقدر ب 28 يوم تظل تركيزات البروجسترون في حليب كامل الدسم مستقرة إلى حد ما خلال أول 6-7 أيام من التخزين ثم تنخفض تدريجيا إلى 18 يوم من التخزين ثم تستقر. أما بالنسبة لحليب منزوع الدسم فان تركيزات البروجسترون تظل مستقرة إلى حد ما خلال 11 يوم من التخزين بوجود المواد الحافظة ثم تنخفض تدريجيا. أظهر رصد درجة حموضة حليب كامل الدسم والحليب المنزوع الدسم بالتوازي مع مراقبة تدهور هرمون البروجسترون، أن قيمة 'Pearson 'r المحسوبة لكل من نوع الحافظ المستعمل ولكل من قيمة درجة الحرارة التخزين المستعملة اقل من 0.80 تؤكد ان هناك علاقة إيجابية بين هذان العاملين اللذان تم قياسهما.

**الكلمات المفتاحية:** بروجسترون الحليب، ثبات البروجسترون، الحليب كامل الدسم، الحليب منزوع الدسم، ظروف التخزين، المقاييس المناعية الإشعاعية.

## Introduction

La gestion de la reproduction par des techniques modernes (synchronisation et insémination artificielle) constitue un préalable important pour la production laitière. Néanmoins les problèmes constatés dans nos élevages tels que l'infécondité et l'infertilité ont des conséquences économiques négatives, engendrés entre autres, par le manque de suivi régulier de l'itinéraire zootechnique et sanitaire, entraînant souvent des surcoûts pour l'éleveur résultant de traitements vétérinaires, de distribution de rations alimentaires inadéquates, des réformes et de faibles rendements laitiers **(Benyoucef & Abdelmoutaleb 2010)**.

La maîtrise des paramètres de la reproduction représente la clé de la rentabilité des élevages, permettant à l'éleveur d'atteindre ces objectifs, à savoir l'obtention d'un veau par vache et par an dans le cas d'élevages laitiers.

La connaissance du profil progestéronémique des femelles d'élevage est un des outils permettant de mieux identifier et caractériser les cycles de reproduction. En effet, le dosage de ce biomarqueur, à des intervalles réguliers, permet de déterminer la présence d'un corps lutéal fonctionnel ou de l'ovulation, de réaliser des diagnostics précoces de non gestation, d'identifier les cas d'infertilité et bien d'autres avantages pour l'éleveur et le technicien. De telles analyses aident à mieux gérer la fonction de reproduction et à améliorer par conséquent leur rentabilité économique, pour cette raison, l'usage d'un tel outil se doit d'être une pratique courante et routinière dans nos élevages.

Cependant, mis à part le contrôle de la qualité de la technique de dosage, les résultats de dosage de la progestérone ne sont pas seulement affectés par le stade physiologique des animaux, de la race, des conditions de l'environnement, mais aussi ils sont tributaires des conditions de l'échantillonnage. Ce dernier peut être réalisé soit dans le sang ou le lait et leurs différentes fractions. .

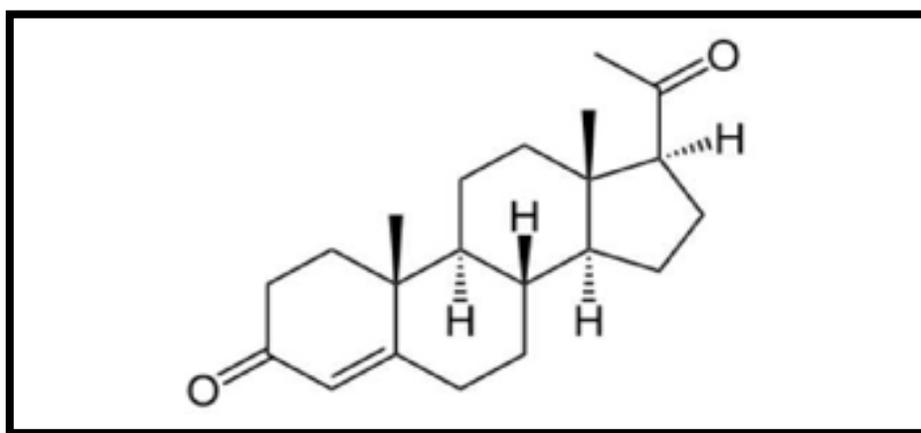
L'objectif de cette contribution a pour but de quantifier l'effet de l'usage de conservateurs et de la température et de la durée de stockage des échantillons de lait entier et de lait écrémé sur la stabilité de la concentration de la progestérone et du pH.

# ***Chapitre 1 : Partie Bibliographique***

## I.1. Généralités sur la progestérone :

### I.1.1. Structure de la progestérone :

La progestérone (P<sub>4</sub>), encore appelée 4 pregnène 3,20-dione, est une hormone stéroïdienne à 21 atomes de carbone, de formule C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> (**Figure 1**). Elle possède deux fonctions cétone (O=) au niveau du carbone (C3) et (C20), deux fonctions méthyle (-CH<sub>3</sub>) au niveau du carbone (C10) et (C13), une double liaison en C4=C5 et un groupement COCH<sub>3</sub> en C17. La progestérone est une substance cristalline, incolore, sa masse moléculaire est de 314,46g/mol et sa demi-vie est de dix à 15 minutes (**Taieb et al.,2011**).



**Figure 1** : Formule développée de la progestérone (**Taieb et al., 2011**).

### I.1.2. Propriétés physiques :

La progestérone est une structure cristalline incolore de poids moléculaire faible. Elle n'est pas antigénique. Elle est peu soluble dans l'eau mais très soluble dans de nombreux solvants organiques (éther, essence, ...) (**Beaudouin-Reinartz., 1985**).

### I.1.3. Propriétés chimiques :

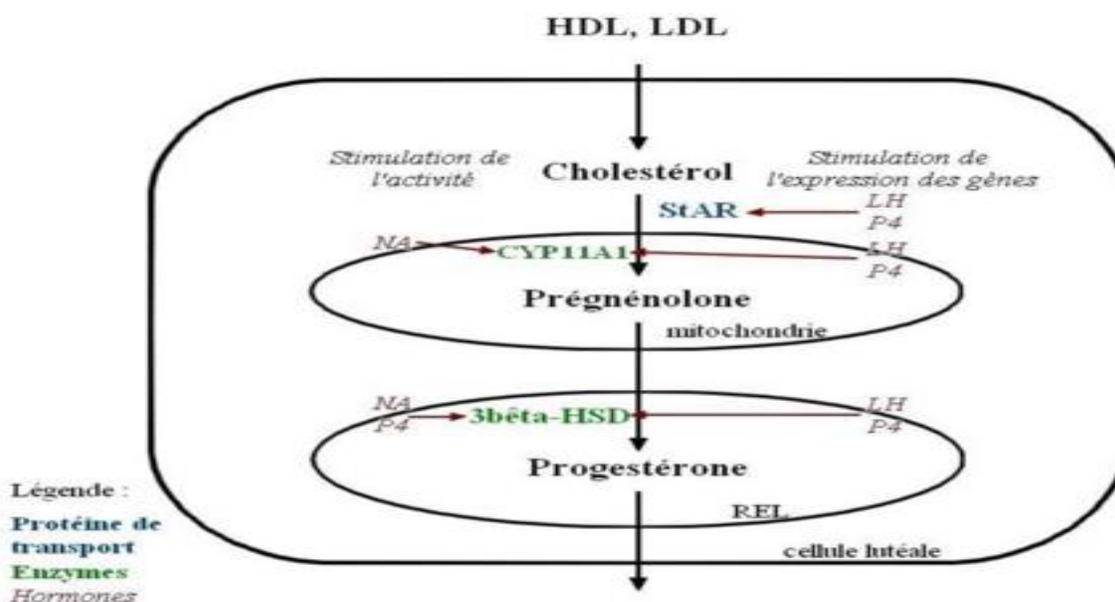
Les propriétés chimiques sont peu nombreuses. Il faut noter quelques dérivés d'addition et de substitution (utilisés notamment comme substance contraceptive) et la réduction aisée par des enzymes spécifiques telles que la 20- $\alpha$ -hydroxystéroïdogénase dans le métabolisme de la progestérone. Soulignons également que la progestérone étant peu polaire, sa migration chromatographique sera importante (**Beaudouin-Reinartz.,1985**).

## I .1.4. Métabolisme de la progestérone :

### a) Biosynthèse :

La progestérone est synthétisée dans toutes les glandes stéroïdogènes (ovaire, testicule, corticosurrénale, placenta), à partir de la prégnénolone qui provient du cholestérol (C27) fourni par les lipoprotéines (LDL), par coupures oxydative de la chaîne latérale. La transformation de la prégnénolone en progestérone se fait sous l'action de  $3\beta$  -hydroxy stéroïde-déshydrogénase et a lieu dans les glandes stéroïdogènes et les tissus périphériques, notamment le foie. La progestérone est un précurseur jouant le rôle d'intermédiaire dans la biosynthèse des estrogènes et des corticoïdes. Elle est formée à titre d'intermédiaire dans la biosynthèse de diverses hormones stéroïdiennes comme les hormones surrénaliennes, dans ce cas, ce stéroïde ne sort pas des cellules formatrices. Par contre, au niveau des cellules de la granulosa de l'ovaire, la progestérone est sécrétée dans la circulation sanguine (Bayard et al., 1981).

La figure 2 décrit une représentation schématique de la synthèse de la progestérone et de sa régulation au sein de la cellule lutéale.



**Figure 2** : Représentation schématique de la synthèse de la progestérone et de sa régulation au sein de la cellule lutéale. (Rekawiecki et al. 2008)

**HDL = High Density Lipoprotein, LDL = Low Density Lipoprotein, StAR = Steroidogenic Acute**

**Regulatory Protein, CYP11A1 = cytochrome P450 11A1, 3 $\beta$ -HSD = 3 $\beta$ -hydroxysteroid**

**dehydrogenase/isomerase, LH = Luteinizing Hormone, P4 = progestérone, NA = noradrénaline,**

**REL= réticulum endoplasmique lisse.**

#### **b) Diffusion et stockage :**

Dans le sang, la progestérone quelle que soit son origine, est transportée liée aux protéines vectrices, à savoir la transcortine ou CBG (corticosteroid binding globulin) et l'albumine sérique (approximativement 98%). Le reste est sous la forme non liée (libre) (**Wood et al.,2010**). Le rôle de ces protéines est d'une part d'assurer le transport de l'hormone jusqu'à l'organe cible, d'autre part de constituer une réserve circulante de progestérone permettant ainsi une régulation du taux de progestérone libre disponible pour les tissus récepteurs.

#### **c) Elimination :**

La progestérone est métabolisée dans le foie, il s'agit d'un catabolisme réducteur aboutissant à la formation de multiples métabolites par des hydrogénations successives de la double liaison 4-5 et des fonctions cétone en 3 et 19 d'où la formation du prégnandiol, qui sera conjugué par le foie avec l'acide glucuronique et ensuite éliminé par voie de la bile (30%) ou par voie urinaire (60 %), d'où elle repasse dans un cycle entérohépatique (**Borel et al.,1997**).

#### **d) Lieux de synthèse :**

La progestérone est une hormone synthétisée essentiellement par le corps jaune des ovaires. Avant l'ovulation, au niveau des cellules non vascularisées de la granulosa et après ovulation, au niveau des cellules lutéinisées de la granulosa. Le placenta, au niveau du syncytiotrophoblaste (**Massé-Laroche.,2010**), prend le relais de façon plus au moins marquée selon les espèces, à partir d'un stade donné de la gestation (**Edward et al.,1985**). Elle est donc présente dans le sang et/ou le lait pendant la phase lutéale du cycle œstral et lors de la gestation. Les surrénales et les testicules produisent aussi la progestérone, mais à de faibles quantités.

### **I.1.5. Propriétés physiologiques de la progestérone :**

Après sa liaison à son récepteur spécifique, la progestérone exerce son action à différents niveaux, à savoir :

-Son action au niveau de l'ovaire commence par activer une collagénase qui détruit les fibres de collagène, ce qui diminue la cohésion entre les cellules dans le follicule et augmente la sécrétion

de liquide folliculaire, ce qui augmente les tensions dans le follicule, et augmente les forces de rupture d'où la libération de l'ovocyte, c'est la ponte ovulaire (**Eveno, 2010**).

-Au niveau de l'endomètre utérin, la progestérone prépare la muqueuse utérine à la nidation de l'œuf, en cas de fécondation, l'endomètre devient glandulaire, sa vascularisation s'enrichit et il y a des dépôts de glycogène. Elle assure l'absence des contractions rythmiques des muscles utérins (**Eveno, 2010**).

-La progestérone provoque le stockage de précurseurs d'acides gras dans l'endomètre. A partir de ces précurseurs, l'œstradiol induit la synthèse de prostaglandines utérines  $PGF2\alpha$ , qui seront ensuite libérées par l'action de l'ocytocine lutéale sur ses récepteurs utérins. Leur effet lutéolytique aura pour conséquence d'un point de vue hormonal la diminution progressive de la progestéronémie (**Meredith et al., 1995**).

-Au niveau du col, elle provoque une sécrétion épaisse ou bouchon muqueux empêchant la progression des spermatozoïdes (**Eveno, 2010**).

-Au niveau des glandes mammaires, elle est responsable de la croissance des acini (important pour la lactogénèse) (**Eveno, 2010**).

-Elle a aussi un contrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Elle agit sur les neurones de la GnRH en abaissant la fréquence des décharges de GnRH. Une progestéronémie élevée lors une phase lutéale, exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH, donc sur la libération de l'hormone LH. Il en résulte une réduction de la synthèse d'œstradiol par le follicule mature dominant et par conséquent, son atrophie. Si la progestérone se maintient à un niveau élevé, une troisième vague de croissance folliculaire apparaît. Si par contre, la progestéronémie diminue alors que le follicule dominant de la deuxième vague est en phase de croissance, il ovule, et le cycle ne comporte que deux vagues (**Drion et al., 1996**).

-Aussi, il faut savoir que la progestérone seule est peu active, ses effets n'apparaissent que s'il y a eu auparavant imprégnation oestrogénique, puisque la synthèse du récepteur de la progestérone

étant stimulée par les œstrogènes (Eveno, 2010).

-Elle possède également un effet analgésique pour ses dérivés et un effet hyperthermisant, ceci explique que chez 70% des femelles, on observe une chute thermique de 1°C environ suite à la diminution de la progestéronémie pré-partum (Bertrand et Chartre, 1976).

## I.2. Evolution de la progestéronémie :

Le cycle sexuel est caractérisé par deux phases bien distinctes. La phase folliculaire (pro-œstrus et œstrus) qui correspond à la croissance folliculaire terminale et à l'ovulation. La phase lutéale (met-œstrus et le di-œstrus) correspond au développement d'un corps jaune à partir du follicule qui a ovulé et régression de ce dernier en l'absence de la fécondation.

Durant un cycle, plusieurs vagues de croissance folliculaire sont entamées et le follicule ovulatoire est issu de la dernière vague. La variation de ce nombre de vagues détermine la longueur des cycles constatés (Sahmi.,2013).

La concentration en progestérone dans le sang et/ou le lait est caractéristique de l'état physiologique des femelles de l'élevage (Thimonier.,2000). Elle évolue au cours du cycle œstral sous la dépendance des gonadotrophines, elle est à son niveau inférieur pendant la période péri-ovulatoire (phase folliculaire), puis augmente graduellement pendant les premiers jours qui suivent l'ovulation correspondant au stade metoestrus, pour atteindre un plateau, qui persiste pendant le stade dioestrus de la phase lutéale (Figure 3). A l'état gravide, le taux de progestérone reste élevé pendant toute la gestation, alors que pendant l'anoestrus vrai, il est à son niveau le plus bas.

Les seuils en progestérone dans le sang et le lait écrémé déterminant les différents états physiologiques sont illustrés par le **tableau 1**. Ils sont communs à toutes les bibliographies.

**Tableau 1** : Niveau de progestérone (ng/mL) dans le sang ou le lait écrémé en Fonction de l'état physiologique de la femelle.

Espèces	Phase folliculaire		Phase lutéale		Gestation	Inactivité Ovarienne
	Sang	Lait écrémé	Sang	Lait écrémé		
Vache, Brebis Chèvre, Jument	0.5-1	< 1-2	> 1	> 1-2	> 2	< 1

(Timonier., 2000).

### **I.3. L'intérêt de doser la progestérone et son importance dans la reproduction :**

La progestérone est une hormone dite de la reproduction. Sa variation chronologique au cours du cycle œstral, a fait de son dosage un outil fiable de suivi et de détermination du statut physiologique des femelles d'élevage. Les délais entre les prélèvements et leur nombre dépendent des informations disponibles sur la conduite du troupeau (**Thimonier.,2000**). Le dosage de la progestérone dans le lait et/ou le sang chez diverses espèces animales a été utilisé à différentes fins :

- Pour étudier la cyclicité des femelles pendant les saisons (**Christensen et al.,2014**)
- Déterminer l'entrée en puberté des jeunes femelles (**Yu, et Li, 2001**)
- La mise en évidence d'une activité ovarienne chez les femelles cyclées (**Banu et al.,2012**)
- Suivi de la reprise de l'activité ovarienne post-partum (**Rabiee et al.,2002**)
- Appuis pour l'insémination artificielle et le transfert embryonnaire (**Shamsuddin et al.,2006**)
- Diagnostic précoce de non gestation et suivi de la gestation (**Regal et al.,2012**)
- Évaluation de l'efficacité des traitements hormonaux (**Ergene., 2012**)

La (**figure 3**), illustre quelques exemples typiques de profils progestéronémiques post-partum obtenus chez des vaches. Ils représentent en plus d'un profil normal, différents cas d'anomalies touchant la cyclicité chez la vache, à savoir :

- des profils de progestérone correspondent à une phase lutéale prolongée ou de corps jaune persistant, dans ces cas la sécrétion de progestérone est prolongée au-delà de la durée normale (16 à 17 jours). Elle représente 12 à 35% des profils post-partum. Le corps jaune qui persiste suit le plus souvent une première ovulation précoce et peut sécréter de la progestérone très au-delà de cinquante jours de lactation (**Zerkane., 2018**).

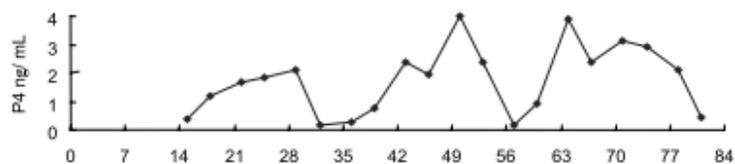
- des profils de progestérone représentant une absence d'une activité ovarienne. Une vache est considérée en activité lutéale dès lors qu'elle présente au moins deux valeurs de dosages de progestérone (prélevée deux fois par semaine) dans le lait supérieur ou égal à 1 ng/mL ou un dosage supérieur à 5ng/ml . Cette inactivité représenterait 10 à 20% des animaux. L'inactivité ovarienne prolongée touche essentiellement les primipares, notamment celles qui vèlent avec

des difficultés de vêlage, les non délivrances, les mauvaises involutions utérines et les métrites perturbent la reprise de la cyclicité post-partum et sont autant de facteurs de risque connus d'inactivité ovarienne (**Zerkane., 2018**).

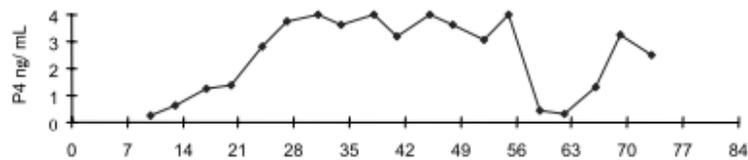
- des profils de progestérone représentant une phase lutéale courte La sécrétion de progestérone a lieu pendant moins de 10 jours. C'est un cas plus rare (moins de 5% des cas) et qui est jugé normal quand il intervient après la première ovulation (**Zerkane, 2018**).

- des profils de progestérone représentant une interruption de cyclicité Cessation d'activité après une première ovulation. On remarque une interruption de la sécrétion de progestérone pendant 12 à 14 jours. L'interruption de cyclicité est plus rare et touche 1 à 13% des animaux (**Zerkane., 2018**).

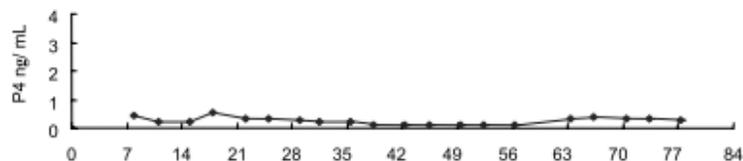
#### Cyclicité ovarienne normale

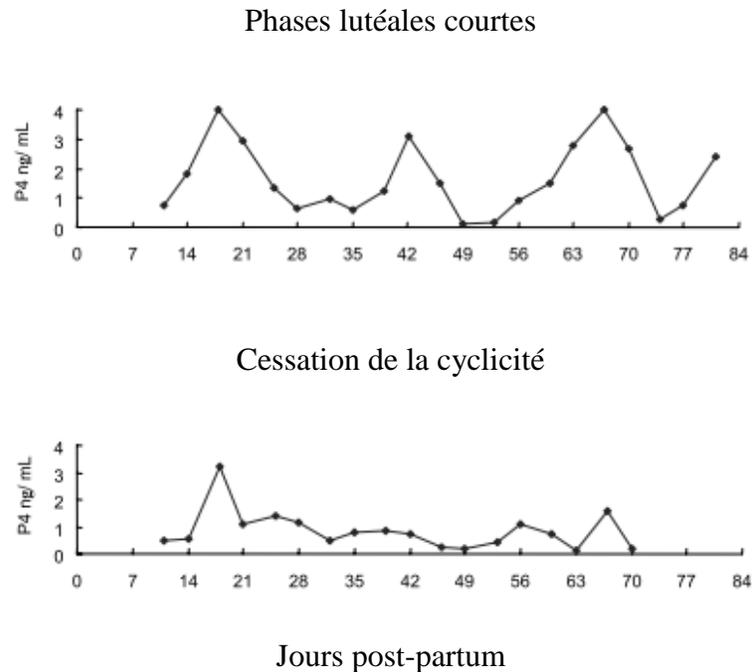


#### Phase lutéale prolongée



#### Inactivité ovarienne





**Figure 3** : Exemples typiques de profils progestéronimiques chez la vache (**Shrestha et al.,2004**).

#### **I.4. Les techniques d'immunodosage de la progestérone :**

En 1953, Yalow et Berson (**Yalow et al. 1959**) décrivait pour la première fois le dosage radio-immunologique par compétition. En 1968, Miles et Hales marquent l'anticorps et exposent la méthode de dosage immuno-radiométrique (IRMA).

En 1975, Köhler et Milstein (**Kohler et al.1975**), ont obtenu des anticorps monoclonaux dont l'utilisation a amélioré la spécificité et la sensibilité des techniques. Dès 1968, l'évolution des techniques d'immunodosage a porté essentiellement sur le type de marqueur utilisé et l'automatisation du dosage.

L'immunodosage était dans un premier temps dominé par les trousse avec un traceur radioactif (RIA). Les contraintes engendrées par l'utilisation de radioéléments ont poussé les scientifiques à utiliser d'autres marqueurs non isotopiques tels les enzymes (EIA) (**Miles et al.,1968 ,Kohler et al.,1975**), la fluorescence (FIA) (**Parini et al.,1985 ,Oku et al.,2011**) et la chimiluminescence (CLIA) (**Lee et al.,2010**). Malgré tout, les dosages RIA restent encore les plus utilisés pour des raisons de coût et de simplicité (**Benoist et al.2011**).

**Tableau 2 : Classification des méthodes de dosage immunologiques (Lafont., 2005)**

<b><u>Traceur</u></b>	<b><u>Dosage avec compétition</u></b> <b>(Anticorps limitant)</b>	<b><u>Dosage sans compétition</u></b> <b>(Anticorps en excès)</b>
<b>Radiomarqué</b>	Radio immunoassay (RIA)	Immuno radio metric assay (IRMA)
<b>Enzyme</b>	Enzymoimmunoassay (EIA)	Enzyme-labeled immune sorbentassay (ELISA)
<b>Fluorescent</b>	Fluoroimmunoassay (FIA)	Immunofluoro metric assay (IFMA)
<b>Luminescent</b>	Luminoimmunoassay (LIA)	Immunolumino metric assay (ILMA)

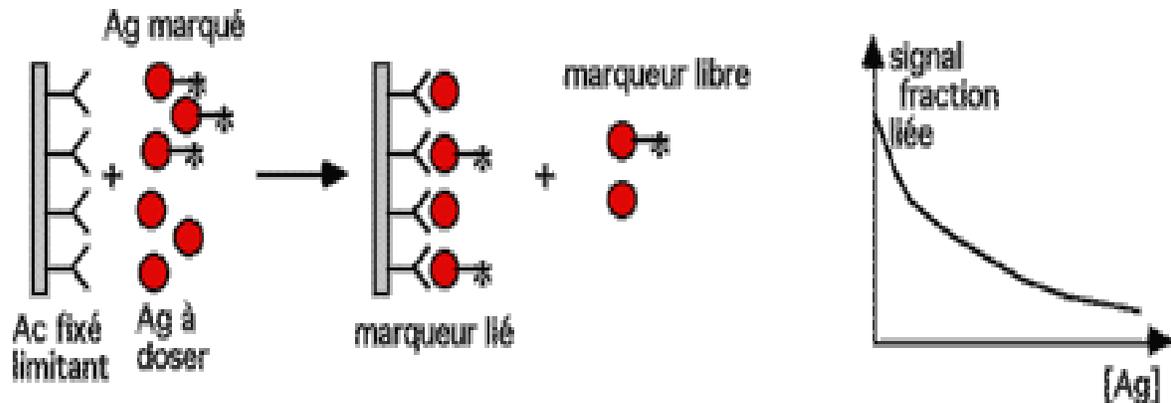
**René LAFONT : Techniques de dosage- Méthodes Physiques de Séparation et D'analyse et Méthodes de Dosage des Biomolécules, Biologie et Multimédia- Université Pierre et Marie Curie- UFR de Biologie 2005**

**I.4.1. Méthode par compétition ou avec réactif limitant : méthode indirecte :**

L'anticorps est présent en quantité limitée par rapport à la quantité d'antigène à doser.

Elle nécessite l'emploi d'un traceur, qui est une substance analogue à l'antigène à doser, repérable par diverses méthodes : la molécule de traceur (l'antigène) peut porter un atome radioactif (iode), une enzyme, (peroxydase) ou être chimioluminescente.

Elle s'applique à tous les antigènes quelle que soit leur taille, y compris les haptènes



**Figure 4 :** Principe de la méthode immunodosage par compétition (Lafont, 2005).

**a) Le principe :**

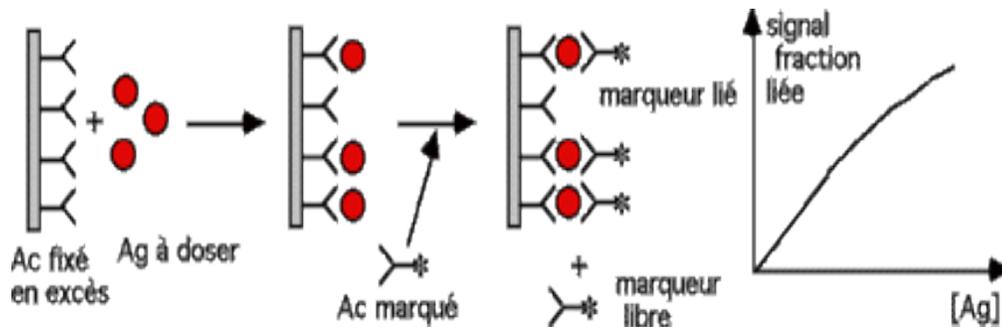
- L'antigène à doser (Ag) entre en compétition avec l'antigène marqué ( $Ag^*$ ) pour la liaison à l'anticorps (Ac)
- la totalité des sites anticorps disponibles se lient
- On mesure le signal de la fraction liée ( $Ag^*--Ac$ ) qui diminue exponentiellement avec l'augmentation de la concentration de l'Ag à doser.
- On peut doser en phase liquide homogène ou en phase solide hétérogène ;
- en phase solide hétérogène, la séparation des fractions libre et liée est facilitée.
- En phase liquide homogène, la mesure de la liaison  $Ag^*--Ac$  nécessite l'utilisation d'une méthode adéquate de séparation du traceur libre et du traceur lié.

**I.4.2. Méthode sans compétition ou avec un excès de réactif : méthodes Immunométriques ou méthodes directes**

**a) Le principe :**

Il repose sur le principe de la technique « sandwich » sur phase solide. La totalité de l'antigène à doser se lie à un premier anticorps qui se trouve en quantité illimitée, fixé sur la paroi du tube à doser. L'antigène à doser est ensuite révélé par un second anticorps marqué, se trouvant aussi en quantité illimitée et qui se fixe sur un second site antigénique éloigné du premier. L'antigène se trouvant dans les standards ou l'échantillon à doser est pris en sandwich entre les deux anticorps. L'excès de traceur est éliminé par une étape de lavage.

On mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène à doser (linéairement pour de faibles concentrations).



**Figure 05 :** Principe de la méthode immun dosage non compétitif (Lafont, 2005)

#### b) Caractéristiques de la méthode :

- Elle est applicable à des molécules comportant au moins deux épitopes suffisamment éloignés l'un de l'autre ;
- Cette méthode utilise deux épitopes (sites antigéniques) différents de l'antigène ; elle est donc inutilisable pour les haptènes ;
- Souplesse dans la réalisation du dosage pour éviter les réactions croisées ;
- Possibilité d'établir une stratégie de choix d'anticorps en vue d'un dosage donné ;
- Elle est spécifique et plus sensible ;

Pour les autres paramètres (préparation des substances marquées, récepteur spécifique, séparation des formes libre et liée) : elle est la même que pour la méthode par compétition.

Cette technique présente comme inconvénients, l'effet crochet pour les concentrations élevées et la nécessité de disposer d'un couple d'anticorps.

#### I.5. Stabilité de la progestérone dans les différents fluides biologiques :

La progestérone est un stéroïde qui circule dans le sang, mais parallèlement il est transporté dans les autres fluides biologiques dans lesquels il peut être dosé (Groschl et al.,2009, Rabiee et

**al.,2002, Lu et al.,1997).** Cependant en médecine vétérinaire, le sang (plasma/sérum) et le lait (entier/écrémé) représentent les fluides les plus utilisés en immunodosage, avec une préférence pour la matrice lait chez les femelles en lactation, en raison de la facilité de l'échantillonnage, celui-ci n'engendre aucun stress à l'animal prélevé (**Eissa et al.1995**).

Les concentrations de progestérone mesurées dans le sang reflètent fortement celles mesurées dans le lait écrémé (**Meisterling et al.1987**) ( $r=0.95$ ), (**Dobson et al.1976**) ( $r=0.88$ ). Cependant, étant donné sa nature lipophile, la progestérone est présente en concentration plus élevée dans le lait entier par rapport au lait écrémé (**Waldmann et al.1999, Ginther et al.1976, Allen et al.1988**).

Dans le sang entier, il a été montré que les enzymes présents dans des globules rouges du sang occasionnent une perte de la progestérone dans le cas d'échantillons de plasma non séparés. La température et le temps de stockage des échantillons de sang avant de séparer le sérum et le plasma affectent significativement les concentrations de progestérone dosées (**Nachreiner et al.1992**). **Delahaut et al. 1979**, préconisent de centrifuger les prélèvements de sang sans conservateur dans l'immédiat à 4°C ou additionner l'équivalent de 5mg/ml de sang, d'Azide de sodium, il permet de conserver 90% de la progestérone après quatre (04) jours de conservation à 20-22°C (**Delahaut et al. 1979**).

**Pulido et al.,1991**, ont observé dans des échantillons de sérum et de plasma héparinés, conservés avant centrifugation à des températures respectivement de 4°C, 17°C et 37°C, des chutes significatives du taux de progestérone à partir de 5h, 3h et 2h d'incubation pour le sérum et 6h, 2h et 1h d'incubation pour le plasma. Les mêmes observations ont été décrites par (**Inns et al.1989**).

Quant à Tahir et al. 2013, ils n'ont pas enregistré d'effet significatif des différents agents anticoagulant testés (silicone, lithium héparine et EDTA) sur la concentration de la progestérone (**Tahir et al.2013**).

Dans le lait, la présence de la progestérone s'explique par une filtration passive suivant le gradient de concentration du plasma vers le lait (**Olivier Bousquet., 1993**). Il a été montré que le froid intense (congélation) d'un échantillon de lait détruit les globules gras de la structure du lait de suite d'une cristallisation des triacylglycerols ou d'une pénétration des cristaux de glace dans les membranes primaires des globules gras du lait (**Meurant.G.,1995**). Ainsi, la concentration de

progestérone dans le lait écrémé est fortement augmentée quand l'échantillon de lait entier est préalablement stocké à de basses températures (0°C et 4°C) avant centrifugation et à mesure que la durée de stockage augmente (**Eissa et al.1995, Nachreiner et al.,1992**). Le froid semble diminuer la solubilité de la progestérone dans la fraction grasse du lait. Quant aux échantillons de lait entier et de lait écrémé, ils doivent être dosés dans les quelques heures qui suivent la collecte. La nécessité d'ajouter un conservateur dans les échantillons de lait entier, permet de les maintenir à une température ambiante pendant une période de 10 jours, sans aucune altération de la concentration de progestérone (**Pennington et al.,1981**). Aussi, pour des raisons d'asepsie, les premiers jets de lait doivent être éliminés et un échantillon de lait représentatif des quartiers seins doit être collecté. Il importe de savoir que Le pH est un indicateur de l'état de fraîcheur du lait. Un lait de vache frais a un pH compris entre 6,6 et 6,8. En cas d'une mauvaise conservation, il se produit une action des bactéries lactiques, une partie du lactose du lait sera dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>), selon l'équation  $pH = \log 1 / ([H_3O^+])$  et donc une diminution du pH. Le moment de l'échantillonnage pendant la traite constitue aussi un facteur de variation, qu'il soit avant ou après les traites, il doit être maintenu pendant toute l'étude, car la concentration de la progestérone est fortement liée au taux de matière grasse du lait (**Eissa et al.1995, Nachreiner et al.,1992**).

Pour remédier au problème de dégradation des prélèvements de lait entier pendant le transport, **Samsonova et al., 2015**, ont proposé de doser la progestérone chez les bovins dans des échantillons de lait séchés sur membranes poreuses.

Il s'avère donc que les conditions dans lesquelles est effectué l'échantillonnage de sang ou le lait (lieu et moment de prélèvement, les conservateurs utilisés) et le procédé de stockage des échantillons (nature, température et durée de stockage de l'échantillon juste après le prélèvement, pendant son acheminement au laboratoire, au niveau du laboratoire pendant sa centrifugation et avant le dosage) constituent un ensemble de facteurs de variations de la concentration de progestérone. Pour remédier à ce problème, il est préconisé d'homogénéiser ces paramètres toute au long de la durée de l'expérimentation, en optant pour un protocole d'échantillonnage qui permet d'assurer la conservation la plus longue possible de la concentration en progestérone dans la matrice de dosage.

## ***Chapitre 2 : Partie Expérimentale***

## II .1. L'échantillonnage :

Pour la réalisation de cette étude deux vaches gestantes de race Holstein ont été prélevées au niveau d'une ferme privée de vaches laitières, située au niveau de la Mitidja. Les deux litres de lait collectés ont été subdivisé selon un protocole expérimental bien déterminé.

Les instruments et équipements qui ont été utilisé lors de cette étude, ainsi que des réactifs sont illustrés par le **tableau 3**.

**Tableaux 3 : Matériels et Réactifs**

Matériels	Réactifs
<ul style="list-style-type: none"><li>-pH-mètre (HANNA instruments)</li><li>- Micropipettes (Eppendorf) 100µL et 1000µL</li><li>- Tubes en PVC</li><li>-Centrifugeuse réfrigérée JOUAN</li><li>-Vortex (genie2SCIENTIFIQUE INDUSTRIE)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Eau distillée stérile</li><li>- Azide de sodium Merck</li><li>- Bichromate de potassium Merck</li></ul>
<b>Dosage de la progestérone (calibration des étalons et validation de la trousse)</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>-Micropipettes (Eppendorf)</li><li>-Compteur à scintillation gamma</li><li>-Agitateur rotatif</li><li>Tubes en PVC</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Echantillons de lait</li><li>-Trousse radio immunologiques (RIA), de dosage de la progestérone dans le lait, acquises auprès de la compagnie DPC-direct (Diagnostic Product Corporation, USA)</li></ul>

## II .2. Description des conservateurs utilisés :

### II .2.1. Azide de Sodium :

L'Azide de sodium est le composé inorganique de formule  $\text{NaN}_3$ . Ce sel incolore est utilisé pour la préparation d'autres composés azotures . C'est une substance ionique , très soluble dans l'eau et extrêmement toxique.

L'Azoture de sodium a d'excellentes propriétés biocides et utilisé comme agent de conservation (donc en faible concentration) dans certaines solutions d'analyse et de fluides biologiques, dont :

Des réactifs de tests diagnostiques (laboratoires médicaux). Les échantillons de sérum, d'anticorps, ou autres solutions étalons de matériels biologiques (laboratoires médicaux et de recherche, particulièrement en immunologie).

### II .2.2. Le Bichromate de potassium :

Le Bichromate de potassium est un solide ionique reconnu comme étant un puissant agent oxydant.

Le Bichromate de potassium n'existe pas à l'état naturel. On en produit de grandes quantités par l'électrolyse de chlorure de potassium dans une solution de bichromate de sodium selon la formule :  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 2 \text{KCl} = \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 2 \text{NaCl}$ .

Le Dichromate de potassium, aussi appelé Bichromate de potassium, est un solide ionique orange de formule  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ .

Dans l'eau, il se dissocie en ions dichromate et en ions potassium.

L'ion dichromate (d'étant un puissant agent oxydant, ce produit est couramment dans les réactions d'oxydoréduction en laboratoire et dans l'industrie. Comme tous les composés du chrome hexa valent, le dichromate est dangereux pour la santé.

## II.3. Méthodes de travail :

### II.3.1. Protocole de dosage RIA de la progestérone :

Les échantillons de lait bovins sont dosés par Radioimmunos dosage de la progestérone en utilisant les trousse DPC et dont le protocole de dosage est résumé dans le tableau suivant :

- Remettre les réactifs de la trousse et les échantillons de lait à température ambiante.

- Reconstitution des standards et les contrôles de qualité (QC) par addition de 1 ml d'eau distillée dans chaque flacon et on laisse reposer 30 minutes.
- Agitation des échantillons de lait, les standards et les flacons de contrôle de qualité au vortex.
- Et pipetage de 100µl d'échantillon dans un tube revêtu d'anticorps, en vue du dosage.
- Addition de 1 ml de traceur (P4-I<sup>125</sup>) dans chaque tube.
- Fermeture des tubes à l'aide de parafilm et mise en incubation à 4°C pendant 24 heures.
- Décantation vigoureuse des tubes (sauf les TC) égouttage pendant 2 à 3 minutes sur papier absorbant.
- Passage des tubes au compteur gamma et comptage de la radioactivité pendant 1 minutes.

**Tableau 4** : Mode opératoire du dosage RIA progesterone

<b>Etape 1 : Répartition</b>	<b>Etape 2 : Incubation</b>	<b>Etape 3 : Comptage</b>
<p>Dans les tubes recouverts d'anticorps, Distribuer successivement 100µl d'étalon ou d'échantillon (en double) et 1000µl de traceur* (P4-I<sup>125</sup>) Agiter</p>	<p>Incuber pendant 24 heure à 4°C avec</p>	<p>Aspirer soigneusement le contenu de chaque tube (sauf les 2 tubes « cpm totaux ») Compter les cpm liés (B) et cpm totaux (T) pendant 1 minute</p>

\*

Ajouter 1000µl de traceur dans 2 tubes supplémentaires pour obtenir les cpm totaux

## II .3.2. Traitements :

Chacun des fractions (lait entier et le lait écrémé) a été divisé en trois (03) sous fractions égales, qui sont soumises à trois (03) différents traitements dont :

-S/ fraction1 : témoin (non traité),

-S/ fraction 2 : traité au conservateur Azide de sodium à raison de 80 mg/ 20 ml de lait ,

-S/ fraction 3 : traité au conservateur Dichromate de potassium à raison de 80 mg/ 20 ml de lait.

Ensuite, chaque sous fraction a été divisée en trois (03) lots, stocké chacun à une température de 4°C, température ambiante (22-25°C) et 37°C.

Pour chaque lot de température, un ensemble de dix (10) échantillons de lait distincts a été stocké.

Pour évaluer le facteur duré de stockage, un échantillon a été retiré chaque jour de dosage. Le **tableau 05** résume l'ensemble du dispositif expérimental.

**Tableau 5** : constitution des sous lots de l'expérimentation

<b>Fraction1</b> Lait entier	<b>S/fraction1</b> Non traité	4°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		TA : 22-25°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		37°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
	<b>S/fraction2</b> Conservé à l'Azide de sodium	4°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		TA : 22-25°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		37°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
	<b>S/fraction 3</b> Conservé au Bichromate de potassium	4°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		TA : 22-25°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		37°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
<b>Fraction 2</b> Lait écrémé	<b>S/fraction1</b> Non traité	4°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		TA : 22-25°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		37°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
	<b>S/fraction2</b> Conservé à l'Azide de sodium	4°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		TA : 22-25°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		37°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
	<b>S/fraction 3</b> Conservé au Bichromate de potassium	4°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		TA : 22-25°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour
		37°C	Dosage au : 4, 5, 6, 7, 11, 18, 22,25 et 28 <sup>ème</sup> jour

Lors cette étude, les paramètres mesurés sont le taux de progestérone dans le lait entier et écrémé et la détermination du pH des échantillons avant le dosage de la progestérone. Le pH est mesuré par un pH-mètre électronique.

#### **II .4. Analyse statistique des données expérimentales :**

Les analyses statistiques classiques des résultats obtenus sont réalisées à travers le calcul des moyennes, des écarts types et des coefficients de variation, la réalisation des régressions linéaires, l'évaluation des coefficients de corrélation, l'analyse de la variance et les tests de comparaison des moyennes. Les logiciels utilisés sont l'Excel Microsoft et ANOVA de Excel pour l'analyse de la variance.

## ***Chapitre 3 : Résultats et discussion***

Après valorisation des données, nous avons résumé l'ensemble des résultats obtenu sous forme de tableaux.

- Le **tableau n°6** représente la variation de la progestérone (en nm/L) et du pH dans les échantillons de lait entier en fonction des facteurs de variation : le traitement, la température et la durée de stockage
- Le **tableau n°7** représente la variation de la progestérone (en nm/L) et le pH dans les échantillons de lait écrémé en fonction des facteurs de variation : le traitement des échantillons, la température et la durée de stockage.

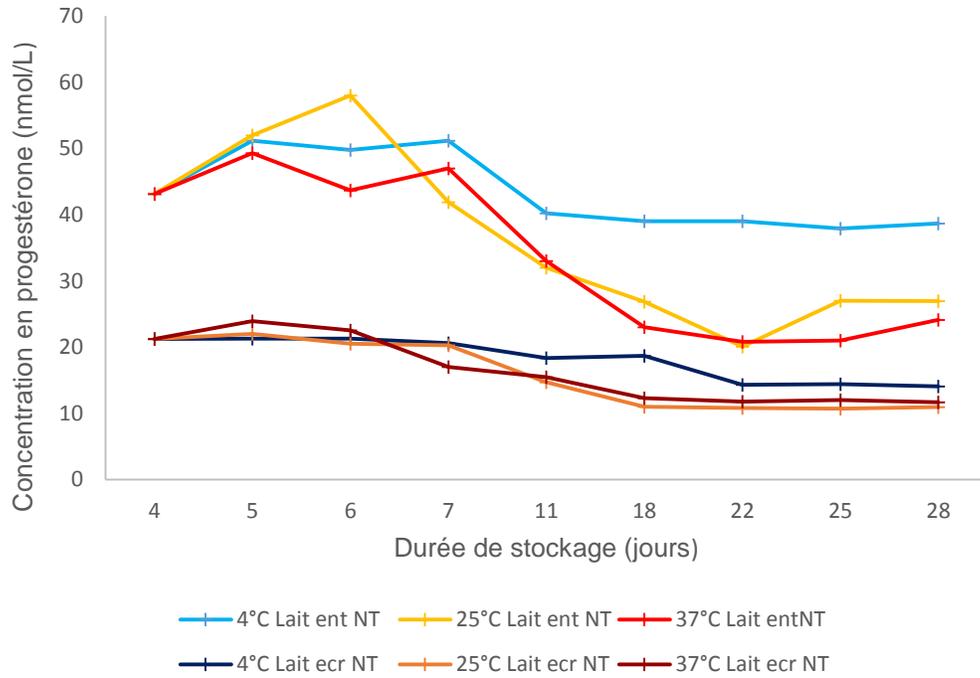
Ces données des tableaux 6 et 7 ont été par la suite illustrées sous forme de graphiques, représentant la variation du taux de progestérone et du pH pendant un mois (01) de stockage dans des conditions de température de 4°C, TA et 37°C, dans des échantillons de lait entier et de lait écrémé. Le lot non traité (**Figures 6a et 6b**), le lot traité à l'Azide de sodium (**Figures 7a et 7b**) et le lot traité au dichromate de potassium (**Figures 8a et 8b**).

**Tableau 6 :** La variation de la progestérone en Nmol/L et le pH dans le lait entier en fonction des facteurs de variation étudié : Traitement des échantillons-température et la durée de stockage.

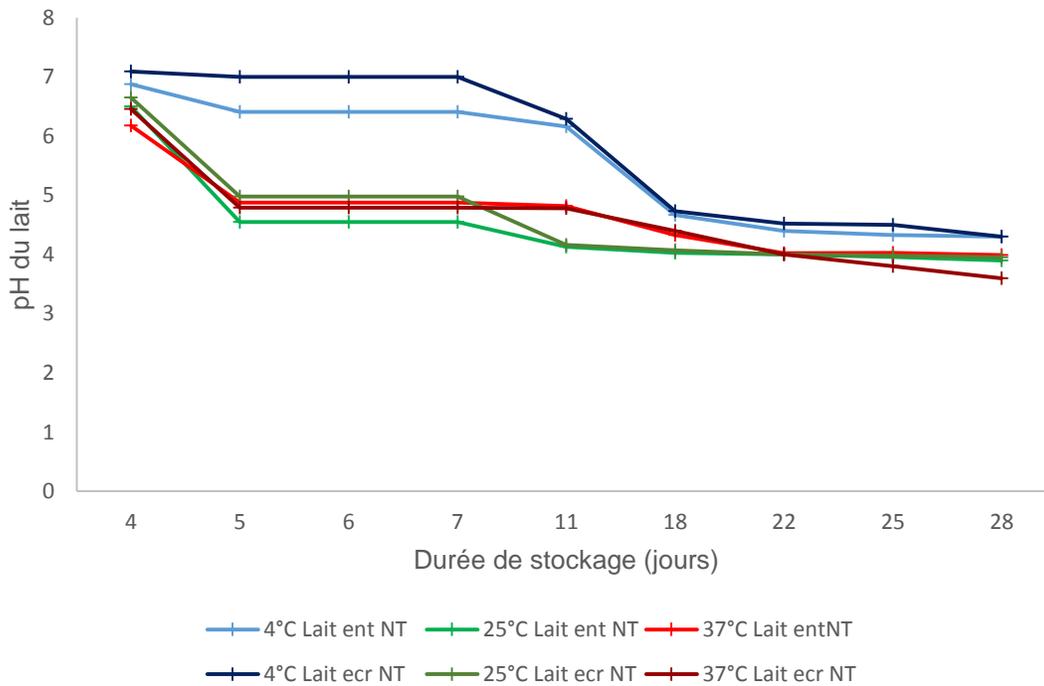
Jours de stockage			4	5	6	7	11	18	22	25	28	
traitements	Temp°C	Paramètres mesurés										
<b>Témoin :</b> <b>Sans traitement</b>	4	Prog	43.10	51.15	49.80	51.16	40.20	39.00	39.00	37.9	38.7	
		pH	6.88	6.41	6.41	6.41	6.16	4.67	4.40	4.33	4.3	
	TA	Prog	43.15	52.00	58.00	41.9	32.00	26.88	20.10	27.00	26.95	
		pH	6.5	4.55	4.55	4.55	4.13	4.03	4.00	3.96	3.90	
	37	Prog	43.15	49.30	43.70	47.00	33.00	23.00	20.8	21.00	24.10	
		pH	6.18	4.88	4.88	4.88	4.82	4.33	4.02	4.03	3.99	
	<b>Azide de sodium</b>	4	Prog	55.07	47.78	50.67	45.4	40.67	29.6	38.0	29.50	28.80
			pH	6.88	6.13	6.13	6.13	6.12	6.05	5.15	50.05	4.9
TA		Prog	55.07	45.93	49.53	36.96	26.21	23.65	25.50	27.1	27.40	
		pH	6.82	5.39	5.39	5.39	4.50	4.17	3.94	3.89	3.79	
37		Prog	55.07	43.18	48.76	37.54	32.25	21.50	27.00	20.80	20.30	
		pH	5.68	4.56	4.56	4.56	4.41	4.35	3.94	3.86	3.61	
<b>Dichromate de potassium</b>		4	Prog	41.30	48.73	50.65	51.38	46.57	39.30	41.30	43.90	41.00
			pH	6.86	6.48	6.48	6.48	6.43	6.41	6.38	6.37	6.37
	TA	Prog	41.30	49.05	51.05	47.66	39.56	30.20	31.00	30.6	31.0	
		pH	7.03	6.92	6.92	6.92	6.42	6.38	5.83	5.73	5.47	
	37	Prog	41.30	47.11	50.11	42.2	36.5	31.2	32.0	30.8	30.0	
		pH	6.04	5.82	5.82	5.82	5.76	5.66	5.02	4.44	4.05	

**Tableau 7 :** La variation de la progestérone en Nmol/L et le pH dans le lait écrémé en fonction des facteurs de variation étudié : Traitement des échantillons-température et la durée de stockage.

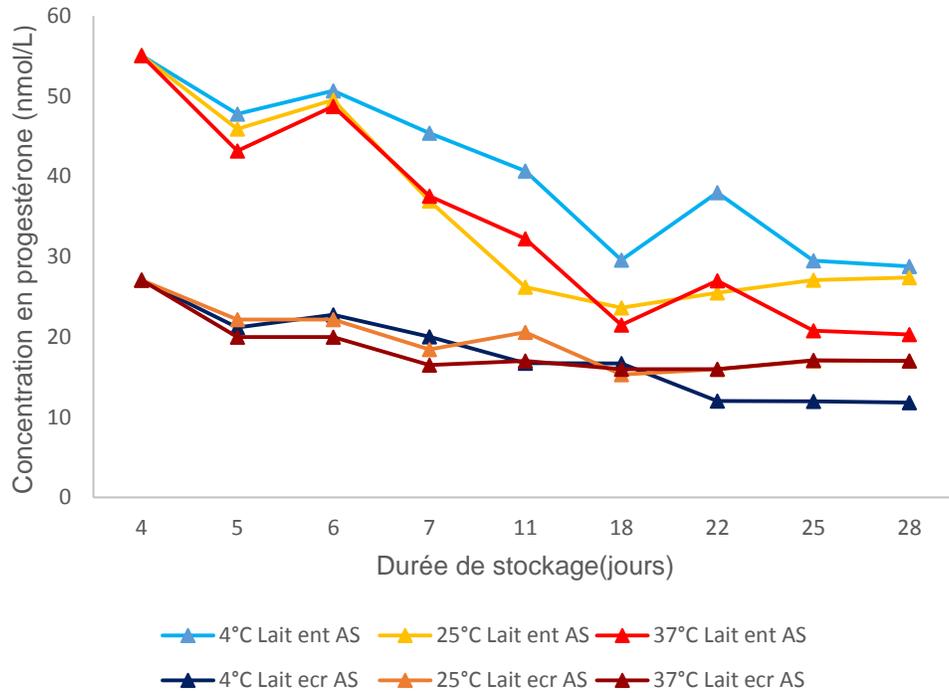
Jours de stockage			4	5	6	7	11	18	22	25	28	
traitements	Temp °C	Paramètres mesurés										
<b>Témoin :</b> <b>Sans traitement</b>	4	Prog	21.25	21.30	21.30	20.60	18.37	18.70	14.30	14.40	14.08	
		pH	7.09	7.0	7.0	7.0	6.29	4.73	4.52	4.50	4.30	
	TA	Prog	21.25	22.01	20.54	20.28	14.73	11.00	10.80	10.70	10.97	
		pH	6.65	4.98	4.98	4.98	4.16	4.07	4.00	3.98	3.95	
	37	Prog	21.25	23.92	22.52	17.01	15.46	12.30	11.80	12.0	11.7	
		pH	6.46	4.79	4.79	4.79	4.78	4.40	4.00	3.80	3.60	
	<b>Azide de sodium</b>	4	Prog	27.10	21.17	22.77	20.01	16.72	16.70	12.00	11.97	11.82
			pH	7.08	7.00	7.00	7.00	6.94	5.25	5.00	4.87	4.57
		TA	Prog	27.10	22.16	22.16	18.44	20.60	15.30	16.00	17.03	17.00
			pH	6.66	5.29	5.29	5.29	4.34	4.24	4.00	3.93	3.93
		37	Prog	27.10	19.98	19.99	16.51	17.00	16.00	16.00	17.09	17.00
			pH	6.49	4.75	4.75	4.75	3.85	3.75	3.70	3.70	3.49
<b>Dichromate de potassium</b>		4	Prog	24.00	20.47	20.47	20.36	20.14	17.60	17.00	16.53	16.10
			pH	7.06	6.96	6.96	6.96	6.80	6.79	6.74	6.66	6.36
		TA	Prog	24.00	21.82	21.82	21.88	20.31	14.70	16.60	17.07	16.03
			pH	7.00	6.96	6.96	6.96	6.38	6.08	5.49	5.47	5.45
		37	Prog	24.00	20.82	19.80	16.38	16.32	16.50	16.00	17.13	16.83
			pH	6.98	6.87	6.87	6.87	5.72	5.27	5.15	4.82	4.10



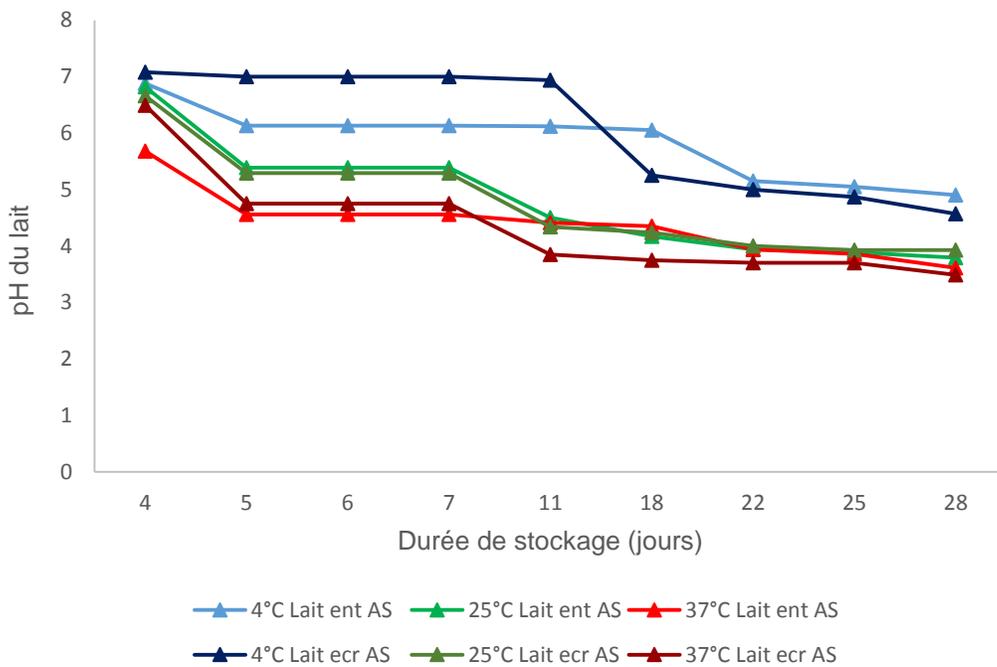
**Figure 6a :** Variation de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé non traité en fonction de la température et la durée de stockage.



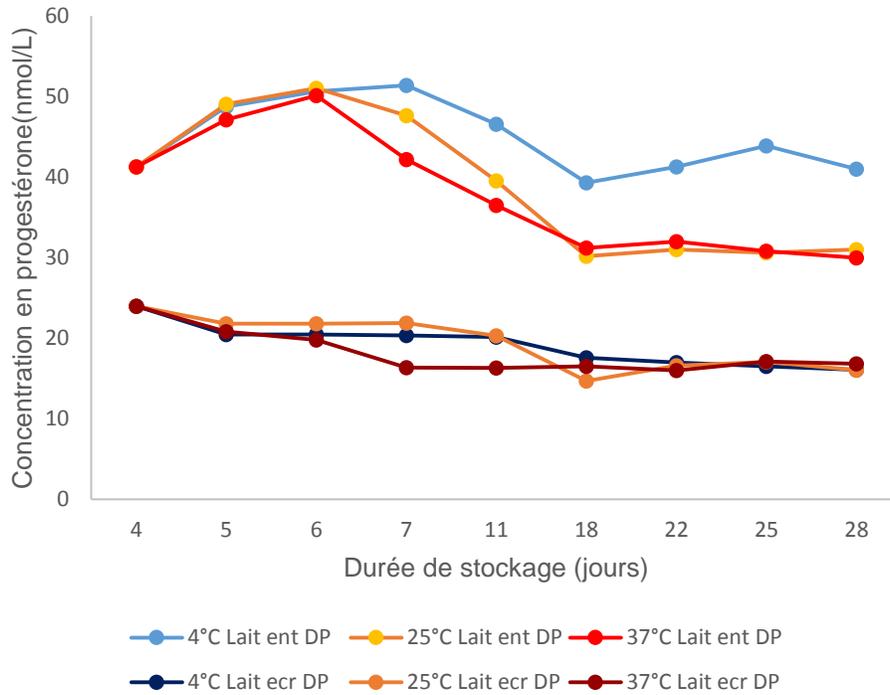
**Figure 6b :** Variation du pH du lait entier et du lait écrémé non traité en fonction de la température et la durée de stockage.



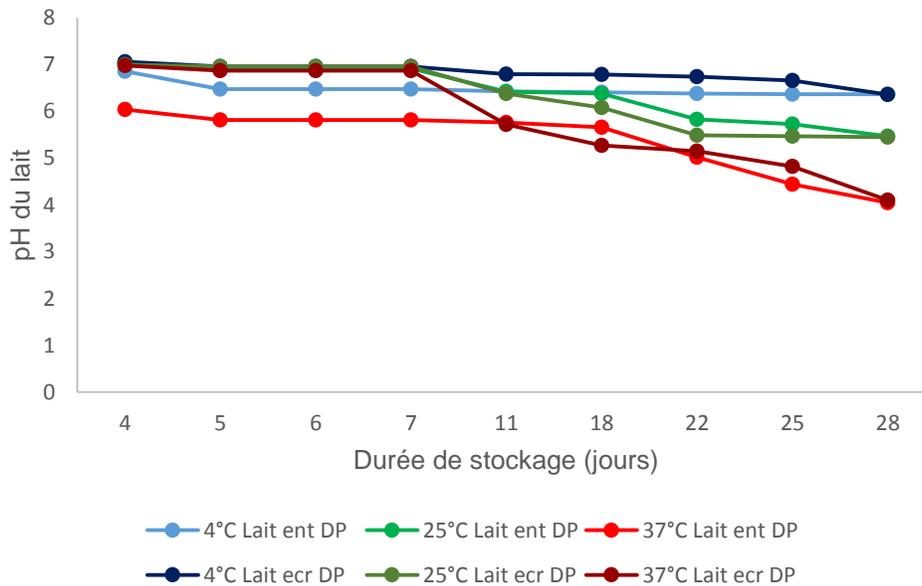
**Figure 7a :** Variation de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé traité à l’Azide de sodium en fonction de la température et la durée de stockage.



**Figure 7b :** Variation du pH du lait entier et du lait écrémé traité à l’Azide de sodium en fonction de la température et la durée de stockage.



**Figure 8a** : Variation de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé traité au Bichromate de potassium en fonction de la température et la durée de stockage.



**Figure 8b** : Variation du pH du lait entier et du lait écrémé traité au Bichromate de potassium en fonction de la température et la durée de stockage.

### **III .1. Variation des concentrations de progestérone :**

La première observation qui se confirme lors de cette étude (**figures 6a,7a,8a**) est que peu importe les conditions de stockage des échantillons de lait, les concentrations de la progestérone sont plus élevée dans le lait entier que le lait écrémé. En effet, selon **Olivier Bousquet 1993**, la concentration des stéroïdes ovariens est plus élevée dans le lait entier que le lait écrémé, en raison de l'affinité qu'a ce stéroïde avec les matières grasses. Les changements de concentration de la matière grasse est parallèle à celui de la progestérone et ils sont fortement corrélé (0.98) (**Ghinter et al., 76**)

La seconde observation concerne la variabilité des taux de progestérone mesurés durant toute la durée de stockage. Celle-ci, quelle que soit la température à laquelle est stocké l'échantillon de lait, fluctue fortement pour le lait entier par rapport au lait écrémé, qui est débarrassé de sa matière grasse. En effet, étant donné l'affinité de la progestérone pour la matière lipidique, cette dernière constitue un facteur engendrant des fluctuations lors du dosage de la progestérone dans le lait entier.

### **III .2. Effets des facteurs étudiés :**

L'analyse de la variance des résultats obtenus durant cette étude, montre l'effet de chacun des facteurs étudiés, à savoir le traitement, la température et la durée de stockage, ainsi que l'interaction de ces facteurs sur la variation des concentrations de progestérone et de pH d'échantillons de lait entiers et écrémés (**Tableau 8**).

**Tableau 8** : Résultats des effets des facteurs de variation et des interactions inter facteurs (p) sur les variables mesurées progestérone et pH.

Matrice de dosage	Lait entier		Lait écrémé	
	Progestérone	pH	Progestérone	pH
<b><u>Facteurs de variation :</u></b>				
Var Fac Traitement	0.0003***	0.0001***	0.0001***	0.0001***
Var Fac Température de stockage	0.0001***	0.0001***	0.1481(NS)	0.0001***
Var Fac Durée de stockage	0.0001***	0.0001***	0.0001***	0.0001***
<b><u>Interaction des facteurs :</u></b>				
Var Inter Trait-Temp stock	0.0009***	0.0032**	0.0419*	0.0087**
Var Inter Trait- Durée stock	0.0001***	0.5557(NS)	0.0060**	0.7967(NS)
Var Inter Temp stock-Durée stock	0.008**	0.9179(NS)	0.9030(NS)	0.0779(NS)

NS : Effet non significatif

P<0.05 : Effet significatif \*

P<0.01 : Effet hautement significatif \*\*

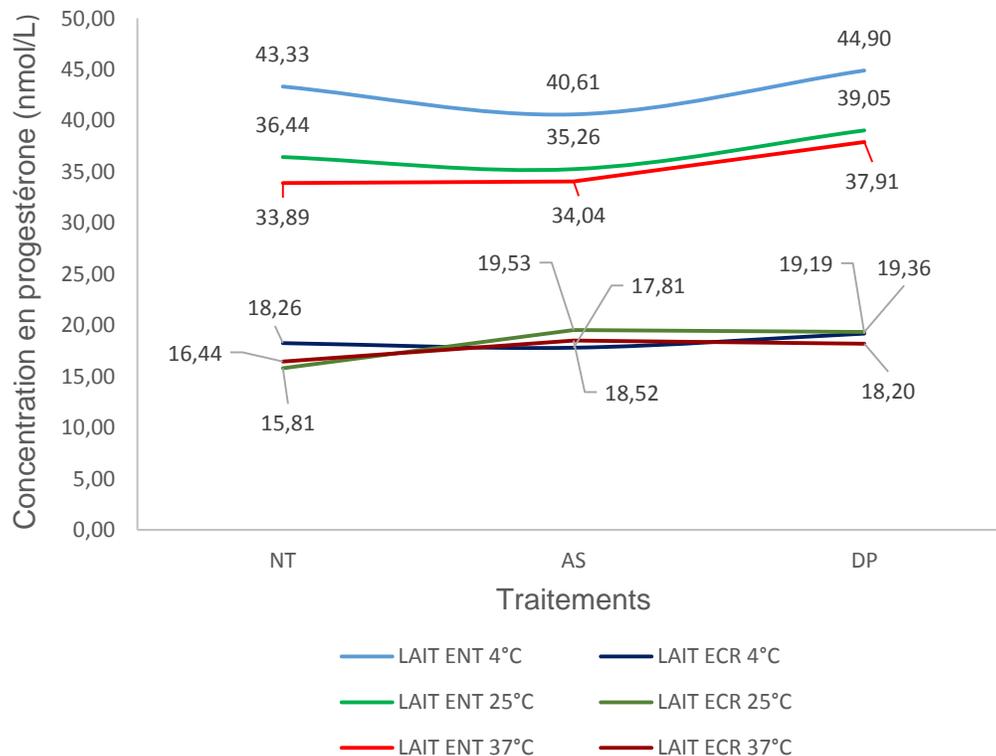
P<0.001 : Effet très hautement significatif \*\*\*

### III .3. Effet du Traitement sur la variation des concentrations de progestérone :

Aussi bien pour le lait entier et le lait écrémé, sur la base de l'analyse de variance, le facteur traitement enregistre un effet très hautement significatif sur la variabilité de la progestérone dans le lait entier (p: 0,0003) et écrémé (p: 0,0001). Il ressort l'efficacité d'utilisation du conservateur dichromate de potassium par rapport au conservateur Azide de sodium et au lot témoin 'non traité' pour le lait entier et l'égalité des efficacités des deux conservateurs par rapport au lot témoin pour le lait écrémé. L'ajout du dichromate de potassium permet d'atténuer les fluctuations de la progestérone (**Figure 8a**) pour le lait entier et assure une meilleure stabilité dans le temps des taux de progestérone dans le lait écrémé. La comparaison des traitements testés, à savoir : le lot non traité, Azide de sodium et Dichromate de potassium, selon le test de Newman et Keuls au seuil 5%, a enregistré les moyennes respectives de 37.9, 36.6 et 40.6nmol/L pour le lait entier et 16.8, 18.6 et 18.9nmol/L pour le lait écrémé.

Le traitement à l'Azide de sodium du lait entier et le lait écrémé, a enregistré des variations de la progestérone presque similaires à celles observées pour la fraction du lait non traité, avec une chute des concentrations de progestérone plus importante pour le lait entier, avec les trois températures de stockage.

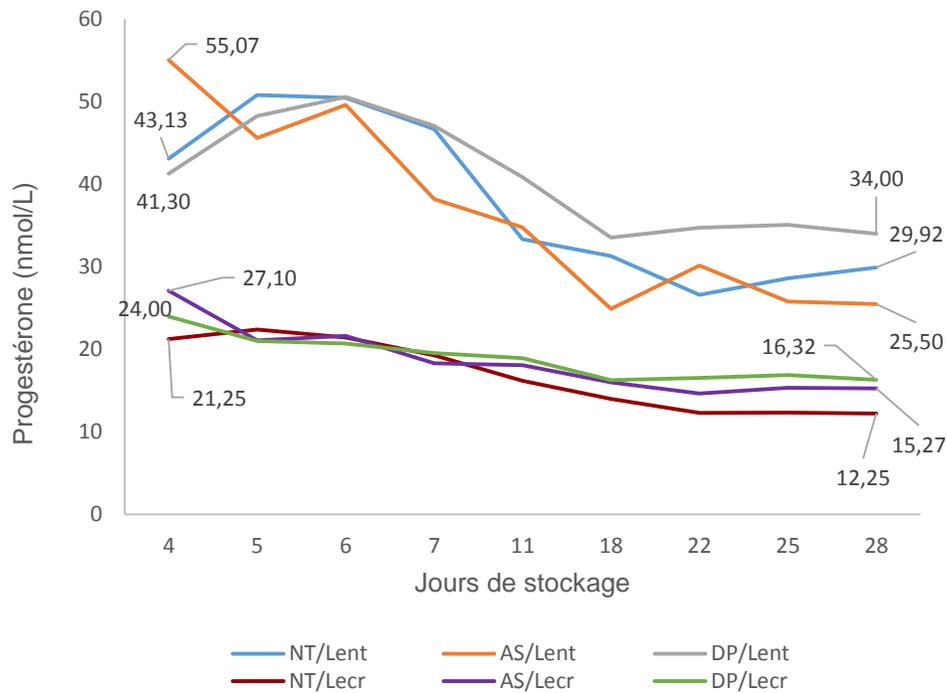
Quant à la (**figure 9**), elle illustre l'interaction des effets traitements et températures de stockage sur la progestérone. L'analyse de la variance a indiqué une interaction très hautement significative entre ces deux facteurs aux seuils  $p : 0.0009$  pour le lait entier et  $p : 0.04$  pour le lait écrémé. On constate pour le lait entier, l'efficacité de stockage à la température de  $4^{\circ}\text{C}$  pour les trois traitements testés, y compris le lot non traité et pour le lait écrémé, aussi l'égalité dans l'efficacité des conservateurs et le lot non traité lors du stockage à  $4^{\circ}\text{C}$  (**Nachreiner et al., 1992**). Par contre, toujours pour le lait écrémé, lors d'un stockage aux températures  $25^{\circ}\text{C}$  et  $37^{\circ}\text{C}$ , l'ajout d'un conservateur (Dichromate de potassium ou Azide de sodium) devient obligatoire.



**Figure 9** : Comparaison de l'effet des traitements sur les concentrations de la progestérone.

L'analyse de la variance a aussi indiqué une interaction entre le facteur traitement et le facteur durée de stockage. Elle est très hautement significative au seuil  $p : 0.0001$  pour le lait entier et hautement significative au seuil  $p : 0.006$  pour le lait écrémé. En effet, l'analyse des moyennes de progestérone obtenues par chaque traitement en fonction des jours de stockage (**Figure 10**), a

montré une similitude des traitements pendant les sept (07) premiers jours de stockage, aussi bien pour le lait entier et le lait écrémé. Au-delà, pour le lait entier, le dichromate de potassium marque son efficacité, alors que pour le lait écrémé, les deux conservateurs testés sont d'une efficacité égale.



**Figure 10 :** Interaction des effets Traitements et Jours de stockage sur la progestérone.

### III .4. Effet du Traitement sur la variation du pH :

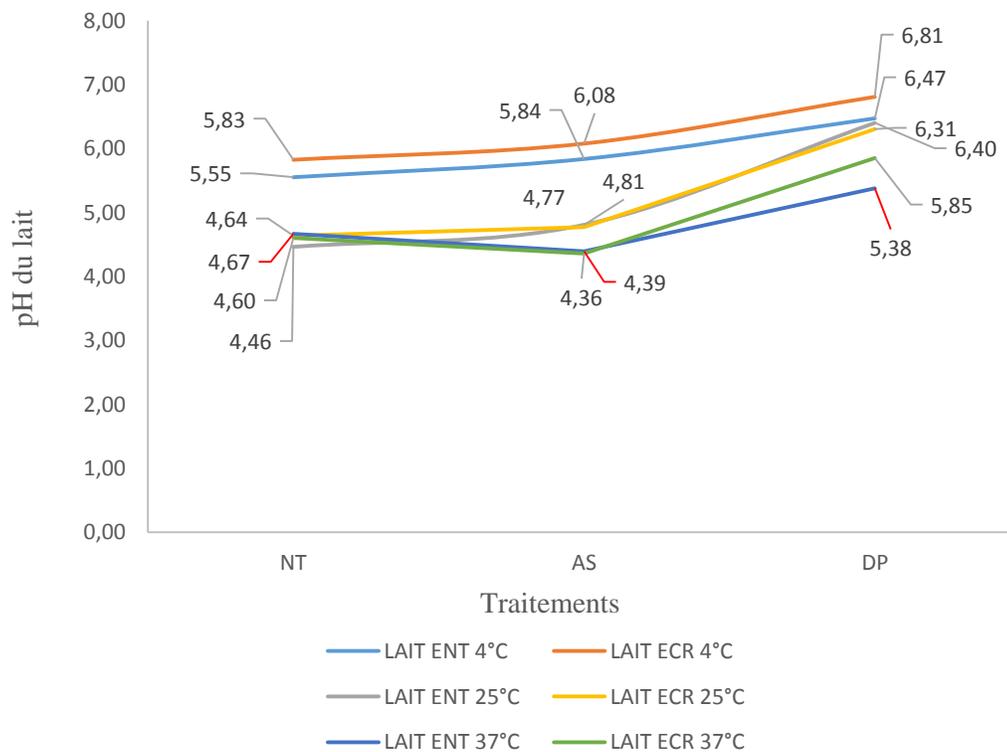
Les **figures 6b, 7b et 8b** et la **figure 11** montrent une meilleure stabilité du pH, assurée pour les traitements, par le conservateur Dichromate de potassium avec les trois températures, particulièrement la température 4°C et 25°C et pour les températures testées, la température de stockage à 4°C (6.64 en moyenne), par rapport aux températures de stockage de 25°C (6.37 en moyenne) et 37°C(5.62 en moyenne), aussi bien pour le lait entier que le lait écrémé.

Toujours aussi bien pour le lait entier et le lait écrémé, on constate, pour le lot non traité et le lot conservé à l'Azide de sodium, une meilleure stabilité du pH avec la température de stockage de

4°C, comparée aux températures de stockage de 25°C et 37°C. Les moyennes de pH enregistrées pour les températures de stockage de 4°C, 25°C et 37°C sont respectivement de 5.69, 4.55 et 4.63 pour le lot non traité et 5.96, 4.79 et 4.38 pour le lot conservé à l'Azide de sodium.

Quant à l'analyse de la variance des données obtenues, elle a montré un effet très hautement significatif ( $p : 0.0001$ ), du traitement, sur la variation du pH, aussi bien pour le lait entier que le lait écrémé, avec une interaction hautement significative entre le facteur traitement et le facteur température de stockage au seuil ( $p < 0.01$ ). La **(figure 11)** montre la comparaison des effets des traitements et des températures de stockage sur le pH du lait. Elle confirme l'efficacité du conservateur dichromate dans la conservation du pH du lait entier et écrémé, stocké à 4°C et 25°C et l'efficacité de stockage des échantillons de lait entier et de lait écrémé à une température de 4°C, pour le conservateur Azide de sodium et le lot non traité.

Aussi, l'analyse de la variance n'a décelé aucune effet significatif ( $p > 0.05$ ) de l'interaction entre les facteurs traitement et durée de stockage.



**Figure 11 :** Comparaison de l'effet des traitements sur les pH.

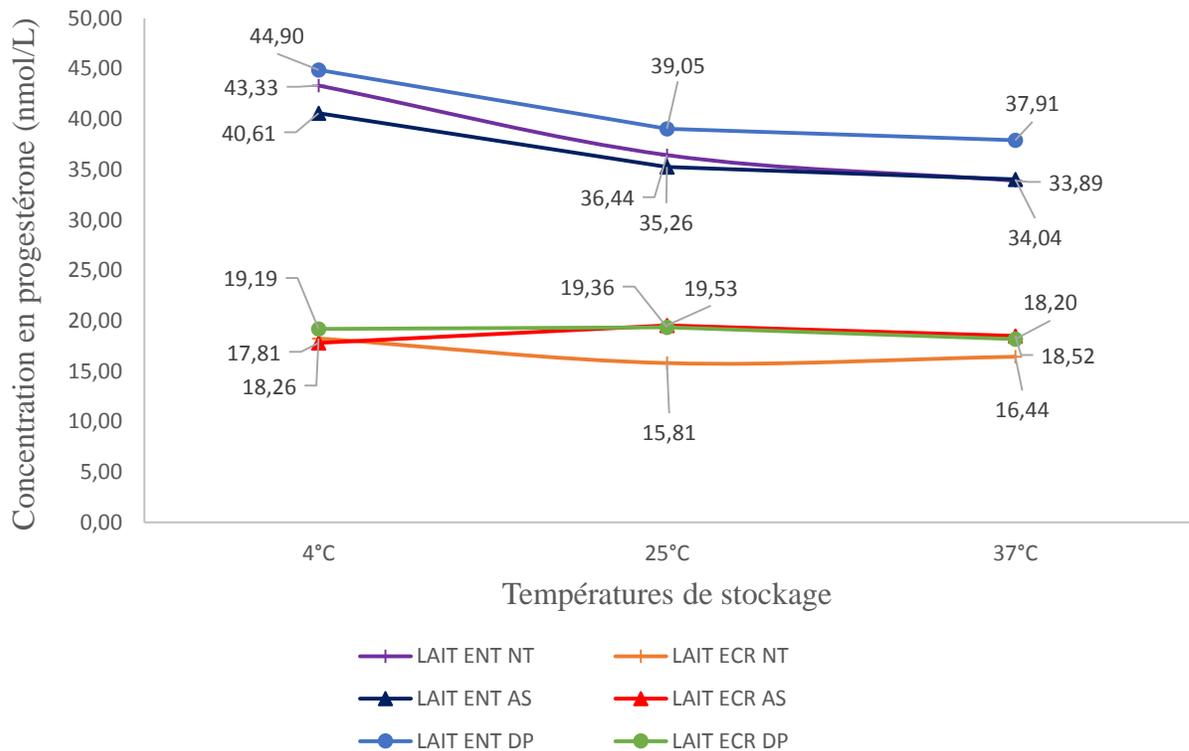
### III .5. Effet de la Température de stockage sur la concentration de progestérone :

Concernant les trois températures de stockages (4°C, 25°C et 37°C) testées, nous avons enregistré un effet très hautement significatif de ce facteur sur les concentrations de progestérone dosées dans le lait entier ( $p : 0.0001$ ), avec un effet apparent de la température 4°C. Les taux moyens de dégradation de la progestérone enregistrés durant toute la durée de stockage, sont de 10, 18 et 22nmol/L respectivement pour les températures de stockages de 4°C, 25°C et 37°C. Ce résultat concorde avec celui rapporté par **Lamont et al, 2007**, mais diffère de celui de **Pennington et al, 1981**, qui ne trouvent pas d'effet de la température de stockage (-10, 4, 22 ou 37°C) sur les taux de progestérone du lait entier.

Pour le lait écrémé, les données obtenues n'ont pas enregistré un effet significatif ( $p > 0.05$ ) de ce facteur sur les concentrations de progestérone dosées. Nous avons observé dans l'ensemble, pour les 3 températures de stockage, une meilleure stabilité des concentrations de progestérone pendant toute la durée de stockage. Les taux moyens de dégradation de la progestérone enregistrés durant cette période sont comparables et sont respectivement de 10, 9 et 9nmol/L pour les températures de stockages de 4°C, 25°C et 37°C.

La comparaison des températures de stockage de 4°C, 25°C et 37°C, selon le test de Newman et Keuls au seuil 5% (**Figure 12**), a obtenu les moyennes respectives de 42.95, 36.92 et 35.28nmol/L pour le lait entier et 18.42, 18.23 et 17.72nmol/L pour le lait écrémé. Elle classe par conséquent la température de stockage de 4°C comme étant la plus favorable à la stabilité de la progestérone dans les échantillons de lait, notamment entier.

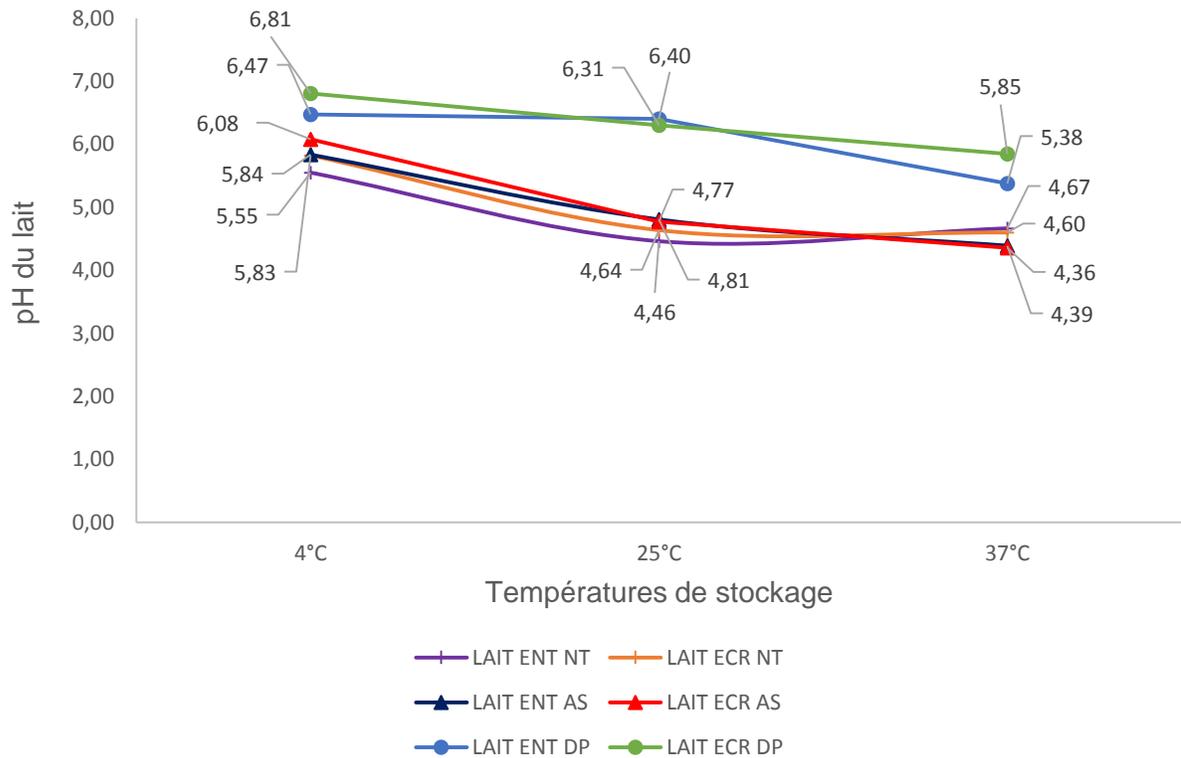
**Lamont et al, 2007**, rapportent dans l'une de leurs études que la perte de P4 associée à la température dans les échantillons de lait entier bovin peut, au moins en partie, être attribuée à la présence de cellules somatiques. Bien que la perte de P4 puisse avoir eu lieu en raison de son métabolisme par les leucocytes présents dans le lait, comme cela a déjà été démontré avec les leucocytes humains, l'action microbienne pourrait également avoir contribué à cette perte à une température plus élevée (21 °C).



**Figure 12** : Comparaison de l'effet des températures de stockage sur les concentrations de la progésterone.

### III .6. Effet de la Température de stockage sur la variation du pH :

Les **figures 6b, 7b et 8b** et la **figure 13** confirment les observations faites précédemment (paragraphe 3.4), à savoir une meilleure stabilité du pH, assurée par le conservateur dichromate de potassium et la température de stockage à 4°C, par rapport aux températures de stockage de 25°C et 37°C, aussi bien pour le lait entier que le lait écrémé. Pour les températures de 25°C et 37°C, le pH chute au 7<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jour de stockage respectivement pour le lait écrémé et le lait entier, avec une intensité plus importante avec la température de stockage de 37°C. Avec les lots de lait non traité et traité à l'Azide de sodium, la température de stockage 4°C est la plus favorable à la stabilité du pH, par rapport aux températures de 25°C et 37°C, aussi bien pour le lait entier et écrémé.



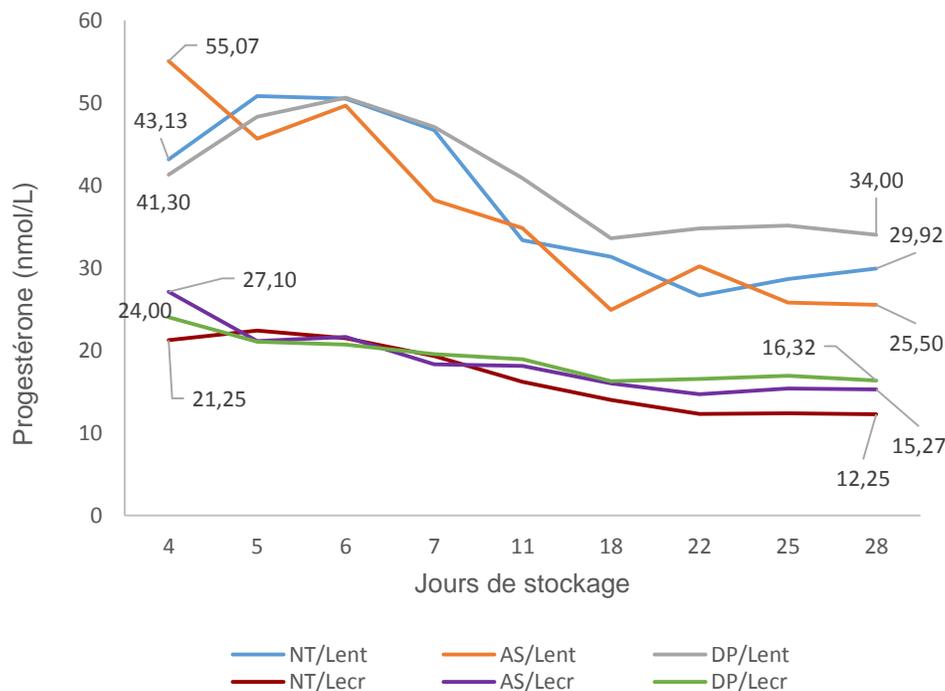
**Figure 13 :** Comparaison de l'effet des températures de stockage sur les pH.

### III .7. Effet de la Durée de stockage sur la concentration de progestérone :

La progestérone est une hormone qui se dégrade en fonction de la durée de stockage des échantillons de lait (**Figures 6a, 7a et 8a et Figure 14**). Dans le cas de notre étude, les données obtenues traitant de l'effet de la durée de stockage sur la variation de la concentration de la progestérone dans le lait entier et le lait écrémé ont été soumises à une analyse de la variance, celle-ci a révélé un effet très hautement significatif ( $p < 0.0001$ ). Nous avons constaté pour les échantillons de lait entier, des concentrations de progestérone qui restent plus ou moins stables durant les 6-7 premiers jours de stockage, puis elles baissent jusqu'au 18<sup>ème</sup> jour de stockage et se stabilisent. Cette baisse est plus accentuée pour les températures de stockage 25°C (36%) et 37°C (30%) par rapport à 4°C (21%). **Lamont et al 2007**, rapporte qu'une réduction de la quantité de progestérone était plus faible ( $P < 0,01$ ) à 4 °C qu'à 21 °C. Quant au lait écrémé, la variation des

concentrations de progestérone a été soumise uniquement à l'effet significatif des traitements et de la durée de stockage, ce qui explique cette allure de courbes presque confondues.

Aussi, contrairement au lait entier ( $p : 0.008$ ), l'analyse de la variance n'a pas montré d'effet significatif ( $p : 0.90$ ) de l'interaction des facteurs durée et température de stockage sur la variation de la concentration de la progestérone pour le lait écrémé.



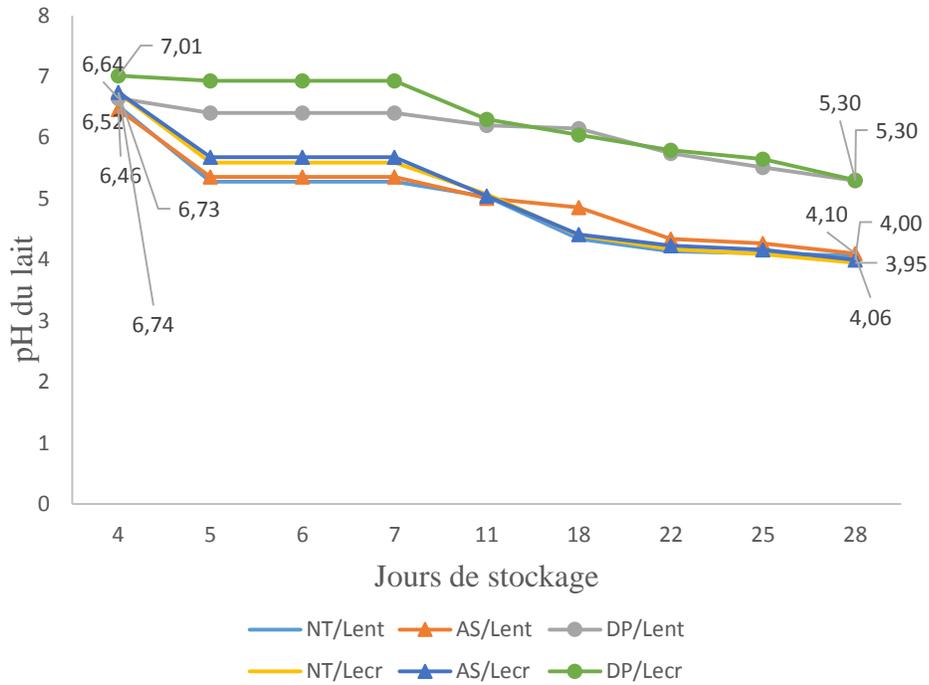
**Figure 14 :** Comparaison de l'effet des jours de stockage sur les concentrations de la progestérone en fonction des traitements.

### III .8. Effet de la Durée de stockage sur la variation du pH :

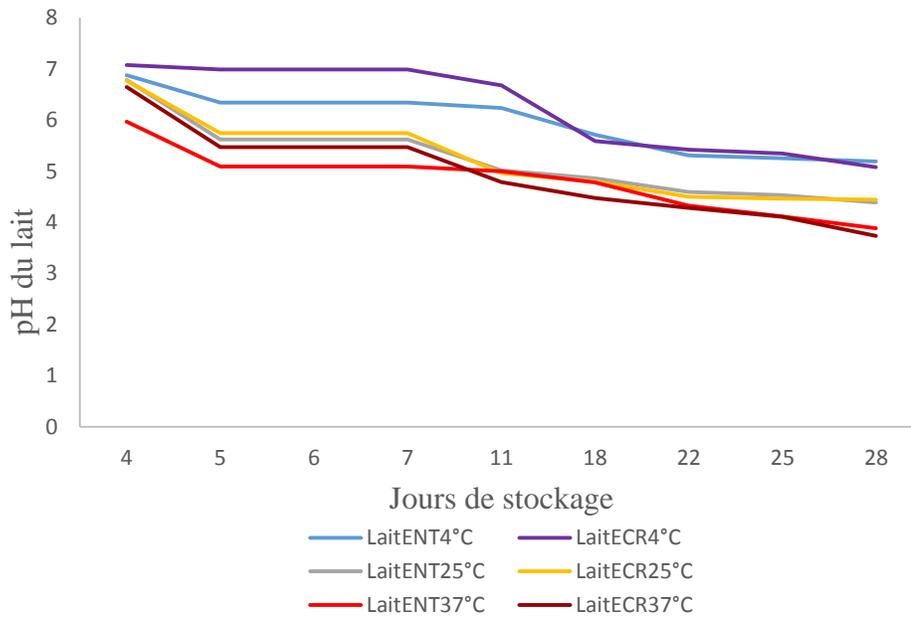
L'analyse de la variance des résultats obtenus a enregistré un effet très hautement significatif ( $p : 0.0001$ ) du facteur durée de stockage sur la variation du pH du lait entier et écrémé. Les **figures 6b, 7b et 8b** montrent une dégradation du pH en fonction de la durée de stockage, aussi bien pour le lait entier et le lait écrémé. Cette dégradation comme pour la progestérone, est cependant moins accentuée avec le traitement dichromate de potassium (**figure 15**) et la température de 4°C

(**figure 16**), qui enregistrent une stabilité du pH jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de stockage puis une chute. On enregistre avec les traitements Azide de sodium et le lot non traité et les températures de stockage de 25°C et 37°C, une chute du pH au 4<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours de stockage puis continue la dégradation graduellement.

Enfin, pour déterminer l'intensité et le sens de la relation linéaire entre la variation des deux variables mesurées 'progestérone' et 'pH', durant le mois de stockage, des coefficients de corrélation de Pearson, dans les échantillons de lait entier et écrémé ont été calculés pour chaque traitement et température de stockage. Les valeurs obtenues sont toutes inférieures à 0.80, indiquant des relations positives modérées existant entre ces deux variables, donc significatives. Le lien entre ces deux variables mesurées peut être expliqué par la prolifération de bactéries lactiques présentes dans le lait, des suites d'une mauvaise conservation de l'échantillon. Celles-ci en dégradant le lactose du lait produisent de l'acide lactique, ce qui induit une diminution du pH, par conséquent une augmentation de l'acidité du milieu. Or, selon **EYMARD Sylvie, 2003**, le pH influence le déroulement de l'oxydation des matières lipidiques par le biais de plusieurs mécanismes. Pour les réactions d'oxydo-réduction en faisant intervenir des protons ( $H^+$ ), le potentiel redox décroît linéairement avec le pH. Par ailleurs, **Nachreiner et al 1992**, rapporte que cette perte de la progestérone du lait écrémé, issu d'un lait entier préalablement stocké à température ambiante, pourrait être la conséquence non pas de la présence d'enzymes dans le lait, mais probablement d'un phénomène physique.



**Figure 15 :** Comparaison de l'effet des jours de stockage sur le pH en fonction des traitements.



**Figure 16 :** Comparaison de l'effet des jours de stockage sur le pH en fonction des températures de stockage.

## Conclusion générale et perspectives

Etant donné l'intérêt pratique que revêtent le dosage de certains biomarqueurs, à savoir la progestérone dans le domaine de la gestion de la reproduction, la fiabilité du résultat de dosage se trouve tributaire en plus de la qualité du dosage, mais aussi de la qualité du prélèvement et de son conditionnement jusqu'au jour de son analyse. La première observation est ressort de cette étude est que peu importe les conditions de stockage des échantillons de lait, les concentrations de la progestérone sont toujours plus élevée dans le lait entier que le lait écrémé. La seconde observation concerne la variabilité (fluctuations) des taux de progestérone mesurés durant toute la durée de stockage dans le lait entier par rapport au lait écrémé, en raison de l'affinité de la progestérone pour la matière grasse du lait.

L'analyse de variance effectuée sur nos données mesurées, fait ressortir l'effet du facteur traitement et de la température de stockage. Pour le lait entier, nous avons enregistré l'efficacité du conservateur dichromate de potassium avec les trois températures de stockage et celle de la température de stockage à 4°C pour les échantillons de lait non traités. Pour le lait écrémé, les deux conservateurs testés ont enregistré une performance égale par rapport au lait non traité, avec les températures de stockage de 25°C et 37°C, alors qu'à la température de stockage de 4°C, les conservateurs enregistrent des performances égales à celle du lot non traité. L'analyse de variance a aussi révélée une dégradation de la progestérone durant les 28 jours de stockage étudiés. Pour le lait entier, la progestérone reste plus ou moins stables durant les 6 à 7 premiers jours de stockage pour l'ensemble des traitements et températures de stockage, puis chute graduellement à 18 jours de stockage et se stabilisent. Cette chute est cependant moins marquée pour le lot de lait traité au dichromate de potassium et celui stocké à 4°C. Pour le lait écrémé, la progestérone reste stable jusqu'aux 11ème jours de stockage avec les conservateurs, puis se dégrade lentement. La corrélation entre la variabilité de la progestérone et du pH dans les échantillons de lait entier et écrémé a obtenue, par traitement et par température de stockage des coefficients inférieurs à 0.80, indiquant des relations positives modérées, donc significatives.

Il ressort de cette étude, certaines consignes primordiales de conservation, à prendre en considération lors de la réalisation de prélèvements de lait, dans le but de stabiliser les taux de progestérone dans ce liquide biologique, en attendant leur quantification. Il s'agit notamment de :

- Le lait prélevé doit être centrifugé immédiatement après prélèvement, pour éliminer la matière grasse. Celle-ci constitue un facteur de variabilité lors du dosage de la progestérone, en raison de l'affinité de cette dernière à la matière grasse.
- Il est préférable d'opter pour une conservation des échantillons de lait toujours à 4°C, même en indisponibilité d'une centrifugeuse et de conservateurs.
- L'ajout d'un conservateur, de préférence le Dichromate de potassium est primordial pour assurer une meilleure stabilité de la progestérone dans les échantillons de lait.

## Références Bibliographiques

---

- 1) **Allen, S.E. et Foote, R.H.**, "An enzyme linked immunoassay of milk progesterone as a diagnostic aid in diagnostic aid in embryo transfer programs", *Theriogenology* Avril 1988 vol.29 No.4 893-903.
- 2) **Borel, J.P., Randoux, A., Maquart, F.X., Gillery, P., Le Peuch, Ch., Bellon, G. et Monboisse, J.C.**, "Biochimie dynamique", De Boeck & Larcier s.a., 1997 Paris, Bruxelles, ISBN 2-8041-2453-3).
- 3) **Bayard, F.**, "Régulation physiologique et pharmacologique des récepteurs stéroïdiens sexuels dans l'endomètre", 4-5, Vol 42, (Oct-Nov 1981) 321-6
- 4) **Benyoucef, M.T., et Abdelmoutaleb, M.**, *"Indicateurs de la technicité des éleveurs et canaux de vulgarisation dans des élevages bovins laitiers de la région centre (Algérie)" Revue Sciences & Technologie de l'Université Mentouri; Constantine (Algérie) 2010.*
- 5) **Benoist, J.F., Biou, D., et Chevenne, D.**, "Chapitre 2 : Dosage des marqueurs biologiques par immunoanalyse. In Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives", 2<sup>ème</sup> édition revue et augmentée par Jean-Louis Beaudeau et Geneviève Durand. Ed: lavoisier (2011) 9-38. ISBN: 2257204727.
- 6) **Banu, T.A., Shamsuddin, M., Bhattacharjee, J., Islam, M.F., Khan, S. et Ahmed, J.U.**, "Milk progesterone enzyme-linked immunosorbent assay as a tool to investigate ovarian cyclicity of water buffaloes in relation to body condition score and milk production", *Veterinaria Scandinavica* 2012, 54:30.
- 7) **Beaudouin-Reinartz.V.**, Dosage de la progesterone chez la vache appliqué au diagnostic de gestation. Etude bibliographique et expérimentale these de doctorat vétérinaire. Lyon, (1985), 119p.
- 8) **Christensen, A.C.M., Haresign, W., Khalid, M.**, «Progesterone exposure of seasonally anoestrous ewes alters the expression of angiogenic growth factors in preovulatory follicles», *Theriogenology* 81 (2014) 358–367.

- 9) **Dobson, H. et Fitzpatrick, R.J.**, "Clinical application of progesterone in milk test", Br. Vet.J. 132, (1976), 538-542.
- 10) **Drion, P.V., Beckers, J-F., Ectors, F.J., Hanzen, C., Houtain, J-Y., Lonergan, P.**, "Régulation de la croissance folliculaire et lutéale : 1. Folliculogénèse et atresie", *Le Point Veterinaire*, vol. 28, numéro spécial "Reproduction des ruminants" 1996.
- 11) **Delahaut, Ph., Beckers, J.F., Ectors, F.**, "Effet de l'azide de sodium sur la dégradation de la progesterone dans les échantillons de sang total chez les bovins », *Ann.Méd.Vét.*, 123 (1979) 567-572.
- 12) **Edward, R. P.**, "Immunoassay: An Introduction" William Heinmann Medical Books. London (1985).
- 13) **Ergene, O.**, "Progesterone concentration and pregnancy rates of repeat breeder cows following postinsemination PRID and GnRH treatments", *Turk.J.Vet.Anim.Sci.*36:3 (2012) 283-288.
- 14) **Eissa, H.M., Nachreiner, R.F., Refsal, K.R.**, "Effects of sample handling temperatures on bovine skim milk progesterone concentrations", *Theriogenology* 43 (1995) 893-898.
- 15) **Eveno S.**, LES GONADES – 2010, 15 pp-<http://purpanpromo.toile-libre.org>
- 16) **Gröschl, M.**, "Données actuelles sur l'analyse hormonale salivaire", *Ann Biol Clin*, vol. 67, n o 5, septembre-octobre 2009, 493-504.
- 17) **Ginther, O.J., Nuti, L.C., Garcia, M.C., Wentworth, B.C., Tyler, W.J.**, "Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products", *Journal of Animal Science* 42, 1976, 155–159.
- 18) **Inns, J.H, Cecchini, G., Mattoni, M.**, "The effect of anticoagulant, storage time and temperature, and sodium azide on blood progesterone concentrations", *Int Livestock Center Africa (ILCA) Bull* 1989; 33: 9–13.
- 19) **Jean Michel Gaulier, Lucie Pouché et al** *AnnToxico Anal.*, 2012j 24 (I): 17-22. Intoxication par l'azide de sodium.

- 20) Köhler, G., Milstein, C.,** "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975." J Immunol. 2005 Mar 1; 174(5):2453-5.
- 21) Lamont<sup>1, 2</sup>, M. G. Colazo<sup>1</sup>, and D. J. Ambrose<sup>1, 2, 3</sup>** Dairy Research and Technology Centre, <sup>1</sup>Alberta Agriculture and Food, Edmonton, AB, T6H 5T6; <sup>2</sup>University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2E1. Received 27 September 2006, accepted 13 February 2007.
- 22) Lee, H., Park, C.J., Lee, G.,** "Measurement of progesterone in human serum by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry and comparison with the commercial chemiluminescence immunoassay", *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 1713-1719.
- 23) Lu, Yu.C., Chatterton, R.T.Jr., Vogelsong, K.M., May, L.K.,** "Direct Radioimmunoassay of progesterone in saliva", *Journal of Immunoassay*, 18(2), 149-163 (1997).
- 24) Miles, L.E. and Hales, C.N.,** "Labelled antibodies and immunological assay systems." Nature. 1968 Jul 13; 219(5150):186-9.
- 25) Meurant. G.,** "Handbook of milk composition", *Food Science and Technology*. Ed: Academic Press (1995) ISBN: 0080533116.
- 26) Meisterling, E.M., Dailey, R.A.,** "Use of concentrations of progesterone and estradiol-17beta in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows", *J. Dairy Sci.* 70 (1987) 2154–2161.
- 27) Mmbengwa, V.M., Gundidza, B.M., Greyling. J.P.C., Fair. M.D., Schwalbach. L.M.J., Du Toit. J.E.J. et Samie. A.,** "Serum progesterone as an indicator of cyclic activity in post-partum goat does", *South African Journal of Animal Science* 39 Supplement 1 (2009) 306-
- 28) Meredith, M.J.,** "Animal breeding and infertility - UK", Blackwell Science, 1995, 508 p.
- 29) Massé-Laroche, E.,** "Analyse du rôle de la LH endogène dans les variations de la progestérone plasmatique au cours des stimulations ovariennes", Université Paris Descartes (Paris 5) Faculté de Médecine, thèse 2010, 56p.

- 30) Nachreiner, R.F., Oschmann, S.J., Edquist, L.E., Richards, J.I.,** "Factors Affecting Skim Milk Progesterone Assay Results", American Journal Of Veterinary Research July 1992. V. 53 (7).
- 31) Oku, Y., Osawa, T., Hirata, T.I., Kon, N., Akasaka, S., Senosy, W.S., Takahashi, T., Izaike, Y.,** "Validation of a direct time-resolved fluoroimmunoassay for progesterone in milk from dairy and beef cows." The Veterinary Journal 190 (2011) 244–248.
- 32) Pulido, A., Zarco, L., Galina, C. S., Murcia, C., Flores, G., Posadas, E.,** "Progesterone metabolism during storage of blood samples From gyr cattle: effects of anticoagulant, time and temperature of incubation", Theriogenology, MAY 1991 VOL. 35 NO. 5, pp: 965-975.
- 33) Parini, C., Bacigalupo, M.A., Colombi, S., Ferrara, L., Franceschetti, F. and Saita, R.,** "Two new fluorescent derivatives of progesterone to use in Fluoroimmunoassay", Steroids, Volume 46, Numbers 4, 5, October, November 1985, 903-913.
- 34) Pennington, J.A., Spahr, S.L., Lodge, J.R.,** "Influences on progesterone concentration in bovine milk", Journal of Dairy Science, Volume 64, Issue 2, February 1981, Pages 259-266.
- 35) Rabiee, A.R., Macmillan, K.L., Schwarzenberger, F.,** "Plasma, milk and faecal progesterone concentrations during the oestrous cycle of lactating dairy cows with different milk yields", Animal Reproduction Science 74 (2002) 121–131.
- 36) Regal, P., Cepeda, A., Fente, C.,** "Development of an LC-MS/MS method to quantify sex hormones in bovine milk and influence of pregnancy in their levels", Food Additives and Contaminants, Vol. 29, No. 5, May 2012, 770–779.
- 37) Répertoire toxicologique; fiche complète CNESST** (commission des normes; de l'étiologie de la santé et de la sécurité du travail.
- 38) Shamsuddin, M., Bhuiyan, M.M.U., Chanda, P.K., Alam, M.G.S., Galloway, D.,** "Radioimmunoassay of milk progesterone as a tool for fertility control in smallholder dairy farms", Trop Anim Health Prod **38** (2006) 85–92.
- 39) Samsonova, J. V., Safronova, V.A., Osipov, A.P.,** "Pretreatment-free lateral flow enzyme immunoassay for progesterone detection in whole cows' milk", Talanta 132 (2015) 685–689.

- 40)Shrestha, H.K., Nakao, T., Higaki, T., Suzuki, T., Akita, M.,** “Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows.” *Theriogenology* 61 (2004) 637–649.
- 41)Sahmi, F.,** "La regulation du gene CYP19A1 dans les cellules de granulosa bovine in-vitro", Thèse PhD de la faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal. (2013) 188p.
- 42)Tahir, M.Z., Thoumire, S., Raffaelli, M., Grimard, B., Reynaud, K. et Chastant-Maillard, S.,**"Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch", *Domestic Animal Endocrinology* 45 (2013) 141–144.
- 43)Thimonier, J.,** "Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone", *INRA Prod. Anim.*, 2000, 13 (3), 177-183.
- 44)Taieb, J. et Lachgar-Keltoum, M.,** "Profils Immuno-Analytiques en Biologie Médicale. La progestérone : caractéristiques immunoanalytiques", *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2011) 26, 182-189.
- 45)Thibier, M., Craplet, C., Parez, M.,** 1973. Les progestérones naturelles chez la vache : étude physiologique. *Recl. Médecine Vét.* 149, 1181–1203.
- 46)Wood, P.J. et Gower, D.B.,** "Analysis of Progestagens", Chapitre 7 in *Steroid Analysis*, H.L.J. Makin and D.B. Gower (eds.), 2010, 559-603. DOI 10.1023/b135931\_7, © Springer Science + Business Media B.V.
- 47)Waldmann, A., Ropstad, E., Landsverk, K., Sørensen, K., Sølverød, L. et Dahl, E.,** "Level and distribution of progesterone in bovine milk in relation to storage in the mammary gland", *Animal Reproduction Science* 56\_1999.79–91.
- 48)Yalow, R. et Berson, S.,** "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological method", *Nature*, (1959) 1648-1649.
- 49)Yu, S.J. et Li, F.D.,** "Profiles of plasma progesterone before and at the onset of puberty in yak heifers", *Animal Reproduction Science* 65 (2001) 67–73.
-