



Institut des Sciences
Vétérinaires- Blida

Université Saad
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

*La recherche des résidus d'antibiotiques dans
le lait cru d'élevage dans les régions
de Chlef et Médéa*

Présenté par

M^r KERRAD Karim

&

M^r CHABRI Ammar

Membres de jury :

Présidente : M^r BERBER A Pr USDB1

Examineur : M^r SALHI Omar M A A USDB1

Promotrice : M^{elle} TARZAALI Dalila M C A USDB1

Copromoteur M^r SAADAOUI MR Dr vétérinaire Blida

Année : 2015/2016

DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail à ceux qui m'ont soutenu, m'ont encouragé durant toute ma période d'étude, et pour leurs sacrifices consentis. A ceux qui ont toujours voulu que je sois le meilleur: **Ama mère et mon père.***

Je dédie ce modeste travail à :

*A ceux qui ont toujours su être présents pour moi, à vous mes chers frères :**Sofaine et Islame.***

*A Mon binôme avec qui j'ai partagé les aléas de ce travail ; les bons comme les mauvais moments : **CHABRI Ammar.***

A mes amies :Djame, Amine,Merzak,Hide ,Anta , Youcef, Mohamed.Alaa ;Houssyne ;

Nabil ;Ouachek ;Brahim,Kqssimo,Amel,

Ainsi qu'aux autres que j'avais connus depuis mon enfance à ce jour.

A tous ceux qui m'aiment.

KARIM

Dédicaces

*A cette occasion. Je voudrais saluer mon Père qui m'a toujours aidée me voir aujourd'hui à ce stade, je t'aime **mon Père**.*

*Je dédie cette thèse à ... : À ma prunelle de mes yeux, celle qui m'a soutenu et qui a pleurée jour et nuit pour qu'elle Me voit toujours au sommet et comme un étoile plantée, **A toi ma chère mère**.*

*A tous mes **frères** et mes **sœurs***

A toute ma grande famille : mes tantes et mes oncles, mes cousins et mes cousines.

*A mon binôme **kerradkarim**(majeur), ainsi qu'à toute sa famille.*

*A tous **mes amis** en particulier mes proches amis (sanafer):*

*BenAzza(lhadj), Fazo, Younes(aissa), Hellou(moussa), **Mansouri**(derai), Alaa(chmisso).*

*Merzak, Youcef, Haider, Antar, **Doudah**, Abdelhak, kassimo, Redoine, Oussama, Ouachek, Ouadeh, Ridha, Seddik, **Hamid**, Brahim, Amine, Samir, Gassemi, Ahmad, Ali.*

*A tous **mes enseignants et enseignantes** depuis le primaire, moyenne, lycée, et l'institut vétérinaire,*

*A tous les étudiants de la **promotion 2015-2016**, en particulier les vétérinaires et mes amis de la résidence 3, ...Merci.*

AMMAR

ABSTRACT

The presence of antibiotic residues in raw milk is mainly due to the indiscriminate use of antibiotics to treat sick animals. The risk of the presence of residues at levels above permissible levels is recognized in the milk and milk products.

These residues may cause danger to order allergic, toxic or microbial for the consumer and also heavy losses for the dairy processing industry.

Our study of 98 samples of raw milk from farms in the province of Chlef and Médéa, focused on the search for antibiotic residues in raw milk using the Delvotest Sp who raised:

- 94 samples of contaminated milk, represented by a rate of 95.91%.
- 02 samples of non-contaminated milk, represented by a rate of 2.04%.
- 02 samples of questionable milk, represented by a rate of 2.04%.

Key words antibiotic residues, raw milk, farms , Delvotest Sp, Chlef, Médéa.

RESUME

La présence des résidus d'antibiotiques dans le lait cru est essentiellement liée à l'utilisation inconsidérée des antibiotiques pour le traitement des animaux malades. Le risque de la présence de résidus à des teneurs supérieures aux normes autorisées est reconnu dans le lait et les produits laitiers.

Ces résidus peuvent représenter un danger d'ordre allergique, toxique ou microbien pour le consommateur et aussi de lourdes pertes pour l'industrie de transformation laitière.

Notre étude réalisée sur 98 échantillons de lait cru provenant d'élevages de la wilaya de Chlef et de Médéa, a porté sur la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru au moyen du Delvotest Sp qui a relevée :

- 94 échantillons de lait contaminés, représentés par un taux de 95.91 %.
- 02 échantillons de lait non contaminés, représentés par un taux de 2.04 %.
- 02 échantillons de lait douteux, représentés par un taux de 2.04 %.

Mots clés : Résidus d'antibiotiques, lait cru, élevage Delvotest Sp, Chlef, Médéa.

ملخص

وجود بقايا المضادات الحيوية في الحليب الطازج ويرجع ذلك أساسا إلى الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية لعلاج الحيوانات المريضة. يتم التعرف على مخاطر وجود بقايا عند مستويات أعلى من المستويات المسموح بها في الحليب والمنتجات.

قد سبب هذه المخلفات خطرا على النظام الحساسية، السامة أو الميكروبية للمستهلك وأيضا الثقيلة لصناعة الألبان.

لدينا دراسة على 98 عينة من الحليب الطازج من مزارع محافظة الشلف والمدينة، وركزت على البحث عن بقايا المضادات الحيوية في الحليب الخام باستخدام دالفورست. و التي أظهرت النتائج التالية.

94. عينة من الحليب الملوث، ممثلة ما نسبته 95.91%.

02. عينة من الحليب غير الملوثة، ممثلة ما نسبته 2.04%.

02. عينة من حليب مشكوك فيه، ممثلة ما نسبته 2.04%.

كلمات المفتاح: بقايا المضادات الحيوية، حليب طازج، المزارع، اختبار دالفو تست، الشلف، المدينة .

SOMMAIRE

Introduction	1
--------------	---

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE0 1 : LES ANTIBIOTIQUES

1.1. Définition	2
1.2. Classification et mode d'action des antibiotiques	2
1.2.1. Bêta-lactamines	3
1.2.2. Tétracyclines	3
1.2.3. Aminosides	4
1.2.4. Macrolides	4
1.2.5. Quinolones	5
1.2.6. Sulfamides	6
1.2.7. Antibiotiques polypeptidiques	6
1.3. Associations d'antibiotiques	6
1.4. Pharmacocinétique des antibiotiques	7
1.4.1. Absorption	7
1.4.1.1. Absorption digestive	7
1.4.1.2. Absorption parentérale	7
1.4.2. Distribution	7
1.4.3. Biotransformation	8
1.4.4. Elimination	8
1.4.4.1. Elimination lactée	8
1.5. Usage des antibiotiques en élevage bovin	9

1.5.1. Thérapeutique (Antibiothérapie)	9
1.5.2. Prophylactique	9
1.5.3. Nutritionnelle (Antibiosupplémentation)	9
1.6. Voie d'administration	10
1.7. Causes de la présence des antibiotiques dans le lait	10

CHAPITRE02: LES RISQUES DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT CRU

2.1. Définition de résidus	11
2.2. Origine des résidus des médicaments vétérinaires	11
2.2.1. Nature des résidus	11
a. Résidus extractibles	11
b. Résidus non-extractibles	12
2.3. Conséquences liées à la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait	12
A. Limite maximale résiduelle (LMR)	12
B. Délai d'attente	12
2.3.1. Conséquences sur la santé publique	13
2.3.1.1. Réactions allergiques	13
2.3.1.2. Risques toxicologiques	13
2.3.1.3. Effet sur la microflore intestinale et sélection de souches bactérienne	
Résistant	13
2.3.2. Conséquence sur la technologie laitier	14
2.3.3. Conséquences sur l'économie	15
2.4. Importance des résidus inhibiteurs en industrie laitier	15

CHAPITRE 03 : METHODES DE DETECTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT CRU

3.1. Introduction	16
3.2. Méthodes de détection des résidus d'antibiotiques	16
3.2.1. Méthodes microbiologiques	16
3.2.1.1. Méthode officielle	16
3.2.2. Tests de détection rapides	17
a. Delvotest	17
b. Valio T101	17
c. Copan test p et s 100	17
3.2.3. Méthode enzymatique	18

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Objectif	19
II. Période et régions d'études	19
III. Matériel et méthodes	19
IV. Résultats	25
V. discussion	38
Conclusion	40
Recommandation	41
Références bibliographiques	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Matériel de laboratoire

Figure 2 : Ouverture de la feuille d'aluminium.

Figure 3 : Prélèvement du lait.

Figure 4 : Couverture des ampoules.

Figure 5 : Incubation des ampoules.

Figure 6 : Lecture des résultats.

Figure 7 : Pourcentage de la contamination de lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune d'Ouled Ben Abd Elkader.

Figure 8 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune d'Oued Sly.

Figure 9 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotique dans la commune de Boukadir.

Figure 10 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotique dans la commune d'Oued Fedha.

Figure 11 : Pourcentage de la contamination de lait cru par les résidus des antibiotiques dans la wilaya de Chlef.

Figure 12 : Contamination du lait cru par les résidus d'antibiotique dans la commune Beni Slimane.

Figure 13 : Contamination du lait cru par les résidus d'antibiotique dans la commune d'Aumaria.

Figure 14 : Contamination du lait cru par les résidus d'antibiotique dans la commune d'Azzazia.

Figure 15: Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotique dans la commune de Bousken.

Figure 16 : Pourcentage de la contamination de lait cru par les résidus des antibiotiques dans la wilaya de Médéa.

Figure17 : Pourcentage de la contamination de lait cru des wilayas de Chlef et Médéa.

LISTE DES ABREVIATIONS

- ATB : antibiotiques
- °C : Degré celsius.
- DES : Dose sans effet
- DJA : Dose journalière admissible
- E.coli: Escherichia coli
- g : Gramme.
- g/l : Gramme par litre.
- l: Litre.
- LMR : Limite maximale de résidus.
- mg : milligramme
- mg/l : milligramme par litre.
- ml : millilitre.
- mn : minute
- ng/l : nanogramme par litre.
- UI: Unité internationale.

LISTE DES TABLAUX

Tableau I : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'Ouled Ben Abd Elkeder.

Tableau II : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'Oued Sly.

Tableau III : Résultats de la recherche des résidus antibiotiques dans le lait cru provenant de la commune de Boukadire.

Tableau IV : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotique dans le lait cru provenant de la commune d'Oued Fedha.

Tableau V : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotique dans le cru de la wilaya de Chlef.

Tableau VI : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune de Beni Slimane.

Tableau VII : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'Aumaria.

Tableau VIII : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'Azzazia.

Tableau IX : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune de Bousken.

Tableau X : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotique dans le cru de la wilaya de Médéa.

Tableau XI : Résultats confondus de la recherche des résidus d'antibiotique dans le lait cru des wilayas de Chlef et Médéa.

INTRODUCTION

Le lait est un produit naturel, pur, blanc, il assure chez tous les mammifères la couverture de tous les besoins alimentaires des nouveau-nés.

En effet, la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait peut présenter des répercussions néfastes, d'une part sur la santé du consommateur telle que : des modifications de la flore intestinale, des effets toxiques ou allergènes et la sélection de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. D'autre part sur le plan technologique au niveau de certaines opérations de transformations industrielles, résulte une inhibition partielle ou totale des phénomènes fermentaires d'origine bactérienne nécessaire à la fabrication de la plus part des produits laitiers.

Nous constatons actuellement en Algérie une utilisation abusive et anarchique des antibiotiques en pratique vétérinaire. Il s'agit surtout du non-respect du délai d'attente et du non-respect de la réglementation concernant l'absence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale destinées à la consommation humaine.

Les produits laitiers doivent être exempts de toute trace d'antibiotiques lors de leurs mises sur le marché [1].

C'est dans ce cadre que nous avons jugé intéressant de réaliser ce travail qui comporte deux parties :

- Dans la partie bibliographique nous avons essayé de rassembler les données bibliographiques relatives au sujet traité.
- Dans la partie expérimentale nous avons présenté l'interprétation et à la discussion des résultats correspondant à la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru par le Delvotest SP dans les élevages de la wilaya de Chlef et Médéa .

CHAPITRE 1

LES ANTIBIOTIQUES

1.1. Définition

Un antibiotique (ATB) est une substance chimique organique d'origine naturelle ou synthétique qui serve à détruire les bactéries ou autres micro-organismes pathogènes, ou à inhiber leurs croissances. Il s'agit aussi de tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques [1].

Selon BOURIN et al [2], les antibiotiques sont définis par leur :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité),
- Toxicité sélective (mode d'action),
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme.

1.2. Classification et mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques sont classés dans des familles et parfois des groupes dans lesquels les représentants possèdent des caractères voisins ou identiques: la nature chimique et l'origine, le spectre d'action, le mécanisme d'action, les mécanismes de résistance et les effets secondaires [3].

Les principales familles d'antibiotiques actuellement utilisées en thérapeutique sont:

- Les bêtalactamines (pénicillines et céphalosporines);
- Les aminosides (streptomycine, néomycine, gentamycine);
- Les antibiotiques polypeptidiques (colistine, Bacitracine);
- Les tétracyclines (oxytétracycline, tétracycline);
- Les macrolides (Tylosine, Erythromycine).

Ainsi que les principaux antibactériens de synthèse qui sont :

- Les sulfamides(Sulfaguanidine);
- Les quinolones(Flumiquine).

1.2.1. Bêta-lactamines

Selon PUYT [4], les bêtalactamines représentent les antibiotiques les plus actifs et les moins toxiques. En fonction de leur origine et de leur structure, deux groupes d'importance inégale sont à distinguer :

- Les pénicillines, produites par des moisissures du genre pénicillium.
- Les Céphalosporines, d'importance moindre en médecine vétérinaire de genre céphalosporinium.

Le noyau de base est le cycle β lactame. Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides.

Ils se répartissent en trois groupes :

- Groupe I : Il comporte le cycle β lactame et un cycle thiazoline (ex: spectre étroits peni M et peni V).
- Groupe II : Il comporte un cycle lactame et un cycle dihydrothiazine (ex: spectres larges peni A).
- Groupe III : Il comporte un noyau limité au cycle β lactame (ex : céphalosporines).

❖ Mécanisme d'action

Les β -lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne [2]

1.2.2. Tétracyclines

Les tétracyclines sont bactériostatiques, elles pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité.

Selon BOURIN et al [2], il y a les cyclines naturelles et les cyclines semi synthétiques.

➤ Cyclines naturelles

- Chlorotétracycline (Auréomycine).
- Tétracycline base (Tetracyne).

➤ Cyclines semi-synthétiques

- Oxytétracycline (Terramycine).
- Doxycycline (Vibramycine).

La Doxycycline et la Mincycline ont une meilleure activité in vitro et sont actives sur les souches bactériennes résistantes aux cyclines naturelles. Elles ont, de plus, une meilleure absorption digestive et une plus longue durée d'action).

❖ Spectre d'activité

C'est avec les tétracyclines qu'est apparu le terme "à très large spectre".

Les tétracyclines sont indiquées pour le traitement des pasteurelloses, brucelloses, Chamydioses, Coxiellse, Rickettsioses, Mycoplasmes, Spirochètes, Leptospira et Borrelia.

Ils ont une bonne activité, pour la majorité des bacilles à Gram positif aérobies et anaérobies sporulés. Cependant, la sensibilité in vitro doit être vérifiée.

Elles sont actives sur Plasmodium falciparum avec un effet synergique avec la quinine [5].

❖ Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des tétracyclines réside dans l'inhibition des synthèses protéiques. De nombreuses épreuves expérimentales, notamment en systèmes acellulaires, ont été obtenues.

Le mécanisme intime de cette action paraît être l'inhibition de la fixation du complexe aminoacide-ARNt synthétase sur le complexe ribosome-messenger [6, 7].

1.2.3. Aminosides

Selon BRYSKIER [5], ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et héli-synthétiques. Elles sont classées par UMEZAWA en 1979 puis par BRYSKIER en 1995 en fonction de la structure chimique centrale en trois classes : Streptamine, 2 désoxystreptamine et Streptidine.

❖ Mécanisme d'action

Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne. Ils sont bactéricides.

❖ Spectre d'action

Le spectre d'action des aminosides est large, agissant sur les bacilles Gram négatifs aérobies notamment les entérobactéries et sur les bacilles à Gram positif (Listeria), l'action est inconstante sur les cocci en général. Ils sont actifs sur les staphylococcus aureus sécréteurs de pénicillinase, sur les cocci à Gram négatif, Neisseriameningitidis et Neisseriagonorrhoeae. Ces antibiotiques sont inactifs sur les streptocoques, pneumocoques les entérocoques et les anaérobies.

1.2.4. Macrolides

Selon BOURIN et al [2], les macrolides sont des antibiotiques fréquemment utilisés en pratique de ville à cause de leur facilité d'emploi. Ils ont un spectre étroit, et sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires. Ils ont une excellente pénétration tissulaire.

❖ Spectre d'activité

Ces substances ont un spectre relativement étroit limité aux germes suivants:

- Cocci à Gram positif (Streptocoques, Staphylocoques méti. S).
- Cocci à Gram négatif (Neisseria, Moraxellacatarrhalis),
- Bacilles à Gram négatif (Bordetella, Campylobacter et l'Helicobacter),
- Bacilles à Gram positif (Corynebactéries, Bacillus anthracis, Erysipelothrix, Listéria),
- Germes anaérobies (Propionibactériumacnes, Eubacterium),
- Germes intra - cellulaires (Mycoplasmapneumoniae, Chlamydiae, Borrelia).

❖ Mécanisme d'action

Les macrolides agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne. Ils se fixent sur l'unité 50 S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse. Ils sont bactériostatiques.

1.2.5. Quinolones

Selon BRYSKIER [5], les quinolones ont une structure générale dérivant de l'acide dihydro 1,4 oxo 4 quinoleine carboxylique. La première molécule des quinolones est Negram (Acide nalidixique). Depuis, plusieurs molécules ont été synthétisées pour exalter le pouvoir antimicrobien et améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques.

Schématiquement les quinolones sont classées sur la base de l'étendue du spectre antibactérien et la nature fluorée ou non du squelette en deux groupes :

- Les quinolones de première génération.
- Les quinolones de deuxième génération.

❖ Mécanisme d'action

Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et transcription de l'ADN bactérien. Ce sont des antibiotiques bactéricides.

❖ Spectre d'activité

Les quinolones de 1^{ère} génération ont à peu près le même spectre d'activité dirigé essentiellement contre les bactéries à Gram négatif excepté Pseudomonas spp.

1.2.6. Sulfamides

Selon DUVAL et SOUSSY [6], ils se constituent d'un noyau paraminobenzènesulfonamide avec un radical R déterminant leur pharmacocinétique et leur classification pratique selon leur durée d'action et / ou leur site d'action.

❖ Mécanisme d'action

Ils ont une activité bactériostatique. Ils entrent en compétition avec l'acide para-aminobenzoïque (PAB) bloquant ainsi l'action de la synthétase.

❖ Spectre d'activité

Ils sont théoriquement larges:

- La majorité des bactéries à Gram positif et négatif.
- Mais nombreuses sont actuellement les souches bactériennes résistantes ; la résistance s'étend à tous les sulfamides.

1.2.7. Antibiotiques polypeptidiques

Les antibiotiques polypeptidiques sont constitués d'enchaînement d'acides aminés. Ils sont produits par des bactéries du genre bacillus ou par d'autres espèces du genre streptomyce. Dans leur structure ils présentent quelques acides aminés. On distingue les polypeptides cycliques à usage parentéral ou local et les polypeptides à usage strictement local [2].

❖ Mécanisme d'action

Ce sont des antibiotiques polypeptidiques, inhibiteurs de la membrane cytoplasmique [5].

❖ Spectre d'activité

Ces substances ont un spectre étroit, actif exclusivement contre les bacilles aérobies Gram négatif, dont *Pseudomonas aeruginosa* [5].

1.3. Associations d'antibiotiques

Selon Cohen et al ; Puyt et al ; Anonyme5 [8, 9,10], les antibiotiques doivent autant que possible être utilisés seuls, c'est la règle générale de la mono antibiothérapie. Toutefois on est souvent conduit en thérapeutique anti-infectieuse à associer plusieurs antibiotiques soit:

- pour retarder l'apparition d'une antibiorésistance microbienne, mais uniquement chromosomique.
- pour assurer une couverture antibiotique en urgence (c'est-à-dire pour élargir le spectre d'activité) devant une infection à germes inconnus lors d'infection poly-bactériennes ou

lorsque l'on ignore la nature du germe en cause, c'est la principale raison en médecine vétérinaire.

- afin de rechercher une synergie.
- Afin de limiter les effets indésirables, notamment la toxicité de certains antibiotiques en réduisant les doses de chacun.

1.4. Pharmacocinétique des antibiotiques

Le terme de métabolisme des antibiotiques désigne l'ensemble des phénomènes physico chimiques et biochimiques qui régissent le cheminement de ces substances dans l'organisme [1, 11].

Les antibiotiques possèdent des structures très différentes les uns des autres, ont chacun un comportement pharmacocinétique spécifique qui est conditionné par leurs propriétés physiques et chimiques et principalement par leur solubilité (liposolubilité, hydrosolubilité), leur ionisation (acides, basiques, neutres), ainsi que leur stabilité (hydrolyse, oxydation) .

1.4.1. Absorption

L'absorption correspond au transfert du principe actif depuis son lieu d'administration vers le secteur plasmatique [12].

1.4.1.1. Absorption digestive

L'absorption digestive se fait essentiellement au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. La muqueuse digestive peut être considérée comme une membrane lipoprotéique à pores. L'absorption répond donc aux règles du passage transmembranaire. Dans le tube digestif, la fraction solubilisée d'un antibiotique est seul à être résorbé, cette résorption résulte en fait de l'addition de deux vitesses qui sont [1] :

- vitesse de dissolution de la forme galénique administrée.
- vitesse de processus de résorption de l'antibiotique à la muqueuse digestive.

1.4.1.2. Absorption parentérale

L'administration par voie parentérale, peut se faire soit par injection intraveineuse, soit par injection intramusculaire, elle est particulièrement utilisée en médecine vétérinaire car elle représente souvent une voie plus commode que la voie orale. Le rythme d'absorption peut être ralenti par certains artifices modifiant la molécule ou par association de certains composants par les tissus moins irrigués (peau, tissus graisseux) et qui fait fonction de réservoir.

1.4.2. Distribution

Après absorption, les substances chimiques vont être distribuées dans tout l'organisme, essentiellement par voie sanguine, elles se fixeront sur divers organes et tissus en fonction de

différents paramètres tenant à la substance considérée et à l'organe en cause [1, 13]. Toutefois, l'importance de la diffusion dans les tissus est variable selon les médicaments.

1.4.3. Biotransformation

Au cours de leur passage dans l'organisme, la plupart des médicaments subissent diverses modifications de leur structure chimique du fait de l'intervention de nombreux systèmes enzymatiques. Le foie est le principal lieu de ce métabolisme. Le plus souvent, les transformations métaboliques inactivent le médicament mais c'est parfois l'inverse qui se produit. Certains médicaments ne sont pas du tout métabolisés et traversent tels quels l'organisme qui les reçoit [2].

Il existe essentiellement quatre principaux types de biotransformations : l'hydrolyse, l'oxydation, la réduction et la conjugaison, qui aboutissent généralement à des métabolites plus polaires et plus hydrosolubles, susceptibles d'être éliminés plus rapidement que la molécule initiale [2].

Aussi, on peut définir les biotransformations comme un ensemble de réaction biochimique, en général enzymatiques, ayant pour effet de modifier la structure des substances introduites dans l'organisme [1, 14, 15].

1.4.4. Elimination

Sur le plan cinétique, l'élimination est un facteur essentiel. Il s'agit de déterminer les voies d'élimination et de quantifier la vitesse d'élimination de l'ATB. La vitesse d'élimination est appréciée par la demi-vie plasmatique de l'ATB, même s'il serait plus correct d'évaluer la clairance de la molécule (mais ce paramètre est plus difficile à déterminer). Il existe diverses voies d'élimination, mais les deux principales sont la voie hépatique et la voie rénale. La voie hépatique est difficile à étudier, de ce fait les études la concernant sont peu nombreuses, alors que les recherches sur la voie rénale sont courantes [16].

1.4.4.1. Elimination lactée

Le devenir d'un antibiotique et son passage (ou non) dans le lait dépend, quelle que soit la voie d'administration, de trois éléments [17]:

- Le métabolisme: le médicament est plus ou moins transformé et dégradé au sein de l'organisme.
- La capacité de la molécule à traverser des membranes: paroi des vaisseaux sanguins, membranes cellulaires...
- Les modalités d'élimination par les différentes voies: urine, fèces, salive et lait

La concentration d'un médicament dans le lait sera fonction de sa concentration dans le plasma, de son poids moléculaire et de son degré de liposolubilité dans les matières grasses du lait. La concentration est maximale pour les bases faibles peu liées aux protéines plasmatiques et plus ionisées dans le lait que dans le sang. L'élimination des ATB par mamelle s'effectue selon ces données [18].

1.5. Usage des antibiotiques en élevage bovin

Les antibiotiques à usage vétérinaire sont utilisés chez les animaux, soit pour guérir ou prévenir les affections, soit pour favoriser la croissance. Ils peuvent ainsi générer des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale notamment le lait.

Les résidus sont définis comme toutes substances chimiques étrangères à l'organisme (xénobiotiques) [19], ils sont pharmacologiquement actifs, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients, ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après l'administration des médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux [20].

Ainsi, l'origine des résidus d'antibiotiques dans les laits pourrait s'expliquer de plusieurs façons :

1.5.1. Thérapeutique (Antibiothérapie)

Bien que cette dernière soit indiquée dans le traitement des maladies infectieuses (mammites surtout), il est recommandé de ne pas vendre (ou de mélanger) le lait provenant d'une vache mammitique jusqu'à ce qu'il y ait élimination complète des catabolites des antibiotiques utilisés [21].

1.5.2. Prophylactique

Pour la prévention des animaux sains. Ces traitements sont mis en œuvre en médecine individuelle pour prévenir les infections en relation avec des interventions chirurgicales mais surtout en élevage du groupe, à certaines périodes critiques de l'élevage (Chez la vache, traitement au tarissement pour guérir les infections persistantes de la lactation précédente et d'assurer une protection contre les nouvelles infections qui s'établissent surtout au début de la période sèche) [4].

1.5.3. Nutritionnelle (antibiosupplémentation)

Certains antibiotiques et antibactériens de synthèse « facteurs de croissance » sont incorporés sous des conditions très strictes dans les aliments des animaux ; On parle d'aliments supplémentés Dans ce cas,[4] l'inscription de tout additif est subordonnée au fait qu'il ne porte pas préjudice plus tard

aux consommateurs ; De plus il faut obligatoirement respecter le temps « d'épuration » de l'organisme [21].

1.6. 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 des durées d'excrétion, beaucoup plus longues que la voie intramusculaire pour un même produit et sa concentration dans le lait est beaucoup plus importante. En conséquence les délais d'attente prévus pour des préparations devant être injectées par voie transcutanée sont sans aucune signification si on utilise la voie intra mammaire; ces produits ne doivent pas être infusés dans la mamelle.

L'administration par voie intraveineuse ou intra péritonéale entraîne généralement une durée d'élimination plus courte que par voie intramusculaire [22].

Pour les injections parentérales, l'administration par voie intraveineuse ou intra péritonéale entraîne généralement une durée d'élimination plus courte que par voie intramusculaire.

1.7. Causes de la présence des antibiotiques dans le lait

Les causes les plus fréquentes de la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait sont [23]:

- le non-respect du délai d'attente des médicaments «c'est le temps nécessaire après la dernière administration du médicament pour que le lait ne présente plus de résidus d'antibiotiques».
- La traite des quartiers de la mamelle d'une vache traitée par des antibiotiques.
- Le lait résiduel dans les équipements de traite utilisés pour les vaches traitées.
- Des erreurs accidentelles telle que:
 - 1-La traite d'une vache récemment achetée et traitée chez l'ancien propriétaire.
 - 2-Le transfert accidentel du lait contaminé dans la citerne de stockage du lait sain.
 - 3-Le non-respect de la dose et la voie d'administration des médicaments au cours des traitements.

CHAPITRE 2

LES RISQUES DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT CRU

2.1. Définition

Il s'agit des traces indésirables des médicaments ou des produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci dans le produit final [24].

L'expression "résidus de médicaments vétérinaires" désigne les résidus de substances originales, de leurs métabolites ou de leurs impuretés appliquées ou administrées par les différentes voies à des animaux à titre de médicaments et restant dans certains produits d'origine animale destinés à l'alimentation[25,26].

2.2. Origine des résidus des médicaments vétérinaires

Les résidus sont des substances pouvant apparaître dans les denrées alimentaires par suite de l'utilisation de médicaments vétérinaires ou de produits phytosanitaires.

Les causes possibles de tels résidus sont [27].

- L'inobservation de la dose ou du mode d'emploi recommandés sur l'étiquette.
- Le non-respect des délais d'attente exigés.
- L'utilisation de matériel contaminé ou incorrectement nettoyé.
- La contamination de l'environnement.

2.2.1. Nature des résidus

La nature chimique des résidus est fortement conditionnée par les biotransformations et les méthodes de dosage et d'identification ont permis de distinguer deux grands types de résidus : les résidus extractibles et les résidus non-extractibles. Cette distinction est basée sur les possibilités de passage des composés étudiés dans les solvants d'extraction.

a. Résidus extractibles

Les résidus extractibles ou « libres » représentent la fraction pouvant être extraite des tissus ou des liquides biologiques par divers solvants, avant et après dénaturation des macromolécules. Les composés concernés sont le principe actif initial et ses métabolites, en solution dans les liquides biologiques ou liés par des liaisons non covalentes, donc labiles, à des biomolécules. Ce sont des résidus précoces, qui prédominent dans les premiers jours suivant l'administration du médicament, mais ayant une demi-vie assez brève et dont le taux devient généralement négligeable trois à cinq jours après le traitement. Ils ne forment qu'une proportion faible des résidus totaux [28].

b. Résidus non-extractibles

Ils constituent la fraction des résidus qui persistent dans les échantillons de tissus analysés après isolement des résidus libres. Leur nature ne peut être déterminée qu'après destruction quasi-complète des protéines, par hydrolyse enzymatique ou acide par exemple. Les résidus non-extractibles forment des complexes macromoléculaires avec des protéines par fixation du principe actif initial ou d'un de ses métabolites sur des protéines. Ces résidus liés ont une demi-vie assez longue et constituent la majeure partie des résidus tardifs [28].

2.3. Conséquences liées à la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait

D'après LAURENTIE et SANDERS, [20]. Les réflexions sur les résidus et les soucis de protéger la santé des consommateurs ont abouti au développement de deux concepts complémentaires:

- Les limites maximales de résidus, ou LMR.
- Le temps d'attente, ou TA.

Ces deux concepts sont appliqués dans toute l'union Européenne et reconnu internationalement dans le cadre du codex alimentaire

A. Limite maximale résiduelle (LMR)

Concentration maximale de résidus résultant de l'emploi d'un médicament vétérinaire (exprimé en mg/kg ou en µg/kg sur la base du poids frais) légalement permise ou estimée acceptable dans un aliment (**règlement N° 2377/90/CEE**) Selon.PUYT ET SACHOT[29], sa détermination est basée sur la détermination de la :

***Dose sans effet (DES) :** c'est la quantité de résidus la plus élevée n'entraînant aucune incidence (pharmacologie ou toxicologie) pour le consommateur.

***Dose journalière admissible (DJA) :** elle est obtenue en appliquant à la DES un facteur de sécurité dépendant du profil toxicologique de la molécule.

B. Délai d'attente

Il correspond au délai entre la dernière administration d'un médicament à des animaux, dans des conditions normales d'emploi et la production de denrées alimentaires issues de ces animaux, garantissant que ces denrées ne contiennent pas de résidus du médicament en quantité supérieure à sa **LMR (Directive 81/851/CEE)**. Le délai d'attente (pour le lait) correspond au premier temps de traite pour lequel la concentration en résidus est inférieure ou égale à la LMR [29].

2.3.1. Conséquences sur la santé publique

Le lait indicateur de l'éventuelle contamination de la chaîne biologique alimentaire peut dans certaines conditions contenir des résidus de molécules à des taux qui pourraient générer des problèmes de santé publique [30], Il peut être à l'origine d'accidents d'hypersensibilité, de risques toxique et de risques microbiens

2.3.1.1. Réactions allergiques

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des bêta-lactames [31].Cependant, compte tenu des très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparé aux concentrations d'antibiotiques administrés à titre curatif ou prophylactique, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu, ils ne pourraient par conséquent intervenir qu'en tant que facteur déclenchant[Dewdney et All]. D'autant plus que lorsque les antibiotiques sont administrés per os, ils subissent des modifications qui tendent à diminuer leur pouvoir allergène. Les résidus de pénicilline en particuliers forment des complexes avec certaines protéines (albumines) par liaisons covalentes. Ils sont alors masqués par la structure tertiaire de l'albumine et deviennent inaccessibles aux anticorps [32,33,34].

2.3.1.2. Risques toxicologiques

La consommation de lait et de produits laitiers contenant des antibiotiques, tels que pénicillines, tétracyclines, est un danger potentiel pour la santé des consommateurs[35].

Les risques toxiques résultent de l'absorption répétée de résidus retrouvés dans les aliments et de leurs accumulations dans l'organisme humain[36].

Les manifestations de cette toxicité dépendent de la dose administrée et de la voie d'administration. Ce risque est inexistant en ce qui concerne les résidus d'antibiotiques dans le lait car les quantités retrouvées sont toujours trop faibles [37,38].

2.3.1.3. Effet sur la microflore intestinale et sélection de souches bactériennes résistantes

La flore intestinale est un des principaux compartiments où des phénomènes de sélection de bactéries résistantes peuvent se dérouler. Les bactéries de la flore intestinale (essentiellement anaérobie) assurent un rôle de barrière en s'opposant à l'implantation et à la multiplication des micro-organismes d'origine exogène [39].

Dans le cas d'une prise orale régulière d'antibiotique, la fraction de la dose administrée qui est excrétée sous forme active par voie biliaire ou sécrétée par la muqueuse intestinale, à laquelle

s'ajoute en cas d'administration orale la fraction non absorbée, peut suffire à altérer l'équilibre écologique microbien de la flore intestinale [40].

Les effets observés chez l'hôte peuvent être alors [41].

a) l'élimination des bactéries sensibles aux concentrations actives de l'antibiotique,

b) la sélection et la prolifération de bactéries résistantes au sein de la flore endogène,

c) la colonisation du tractus digestif par des micro-organismes exogènes résistants, en particulier ceux apportés par l'alimentation et la translocation bactérienne (passage de bactéries de la lumière intestinale aux ganglions mésentériques et éventuellement à d'autres organes). Ces microorganismes peuvent être responsables d'infections graves.

Il est à noter que la contribution des résidus dans la sélection de résistances aux antibiotiques chez l'homme apparaîtrait comme faible comparé à l'importance des contaminations bactériennes des aliments d'origine animale [41].

2.3.2. Conséquence sur la technologique laitier

Les micro-organismes utilisés pour la fabrication des produits laitiers sont plus ou moins sensibles aux inhibiteurs suivant la nature de l'antibiotique et l'espèce du ferment. Ils sont pour la plupart sensibles à la majorité des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire, susceptibles d'être à l'origine de résidus, en particuliers aux Bêtalactamines. Le germe le plus sensible est *Streptococcus thermophilus*[42].

En ce qui concerne les produits laitier fermentés et les fromages, la présence de résidus d'antibiotiques ralentit ou inhibe la croissance des ferments lactiques, ce qui aura un effet sur l'acidification et le caillage du lait et résultera en de graves problèmes de texture [43]. L'industrie laitière se heurta à des difficultés techniques, surtout dans la fabrication des fromages affinés à pâte dure. Ces difficultés provenaient de l'action inhibitrice des antibiotiques sur le développement normal des levains utilisés en fromagerie. Les bactéries lactiques des levains (*streptococcus cremoris*, *strdiacelactis* et *leuconostoccitrovorum*) sont inhibées par divers antibiotiques à faible concentration [44].

Ainsi, toutes les étapes de la transformation du lait en fromage peuvent être perturbées: il y a défaut de coagulation du lait et caillé ressort de mauvaise qualité, une insuffisance de l'égouttage et le rendement de fabrication est diminué ; il y a une mauvaise maturation du fromage (consistance, couleur, odeur, goût modifiés) ainsi qu'une prolifération anarchique des bactéries coliformes

insensibles aux antibiotiques et dont la multiplication n'est plus inhibée par les ferments lactiques[37,38,45].

Pour le beurre, l'inhibition de la fermentation lactique entraîne une insuffisance d'acidification de la crème, il en résulte des difficultés de barattage ainsi que des pertes accrues de matière grasse dans le babeurre. De plus, l'inhibition des ferments d'arôme, particulièrement sensibles (*Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc citrovorum*), a pour conséquence un défaut de flaveur du beurre [46].

Les yaourts sont particulièrement sensibles aux antibiotiques, dont déjà de faibles doses peuvent retarder l'acidification. Il en résulte des produits défectueux : Exsudation de sérum en surface, goût de peptone). Par exemple, la coagulation du yaourt n'est pas correcte, le yaourt ne« prend » pas, il reste liquide. Les poudres de lait contaminées ne peuvent être utilisées dans la préparation des levains, yaourts ou de fromages [47].

Donc du point de vue de la technologie laitière, les fabrications les plus sensibles sont celles dans lesquelles interviennent les ferments lactiques et les germes d'aromatisation (yaourts/fromages à caillage acide et à caillage acide présure, crèmes acidifiées, beurres) facilement inhibés par des doses faibles d'antibiotiques.

2.3.3. Conséquences sur l'économie

Les pertes subit chaque années, par les industries laitiers sont estimées a des containers de million de dollars [48].

La présence des résidus d'antibiotique dans le lait cru interdit sa commercialisations et risque de perturber les échanges internationaux, surtout si des substance d'utilisations interdite chez la vache laitière sont retrouvés (chloramphénicol) [22].

2.4. Importance des résidus inhibiteurs en industrie laitier

Les technologies laitières reposent en partie sur l'utilisation de bactérie lactique celle-ci sont responsable de l'acidification de lait qui permet la coagulation des caséines, elle participe au développement des arômes dans de nombreux produits laitiers surtout les yaourts [22].

CHAPITRE 3

METHODES DE DETECTION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

DANS LE LAIT CRU

3.1. Introduction

Des nombreuses méthodes permettent la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait. Elles sont différentes par leur sensibilités, leur cout, les difficultés techniques et matérielles inhérente à leurs réalisations. Certaines permettent une identification précise de la molécule en cause.

3.2. Méthodes de détection des résidus d'antibiotiques

Depuis 1945, on a développé un peu partout dans le monde un nombre impressionnant de méthodes pour la détection des antibiotiques dans le lait[43]. Les différentes méthodes de détection des résidus d'antibiotiques sont détaillées comme suit :

3.2.1. Méthodes microbiologiques

La détection des inhibiteurs de croissance bactérienne est effectuée grâce à une technique microbiologique qui révèle sur des microplaques de baisse du pH du lait, grâce à la fermentation lactique. Plusieurs milliers de prélèvements peuvent ainsi être analysés en une seule journée [49].

3.2.1.1. Méthode officielle

Cette méthode est efficace et sensible, mais néanmoins assez difficile à reproduire dans des conditions normales de laboratoire d'une laiterie, elle se réalise en deux étapes[49]:

- **Epreuve d'acidification (dépistage)** : dont l'objectif est de détecter un maximum de substances différentes à un seuil proche ou inférieur à la Limite Maximum de Résidus (LMR). elle doit aussi permettre de faire rapidement des analyses sur un grand nombre d'échantillons. C'est une méthode de réalisation simple pouvant être en partie automatisée mais qui demande un certain temps: 2h 30 en étuve.
- **Epreuve de confirmation** : les échantillons positifs ou douteux sont soumis à une série de trois épreuves de diffusion en trois géloses différents,ensemencées avec trois germes différents, selon la nature de résidu présent, l'inhibition sera différente selon la gélose et l'on pourra s'orienter vers telle ou telle famille d'antibiotique. C'est une méthode relativement longue (> 18 h) [22].

3.2.2. Tests de détection rapides

La méthode officielle ne permet pas de préciser la nature de la substance inhibitrice incriminée. Par ailleurs elle est longue à mettre en œuvre (16-18h pour les épreuves de confirmation). Les impératifs de fabrication en industrie amènent les laiteries à utiliser d'autres tests, non officielles, plus rapides, de façon à tester les laits de grand mélange et à pouvoir lancer rapidement la chaîne de fabrication [50], Un certain nombre de tests sont à leur disposition, leurs seuils de détection peuvent être sensiblement différents de ceux de la méthode officielle, le choix sera déterminé par les impératifs techniques de la fabrication et les entreprises recherchant [22].

a. Delvotest

C'est le kit de détection de résidu d'antibiotique le plus largement utilisé. Différentes déclinaisons simplifiées de ce test existent (Delvotest P®, Delvotest SP®...) mais elles reposent toutes sur le même principe d'inhibition de *Bacillus stearothermophilus*. Ces tests se présentent sous la forme de kits normalisés contenant un nombre standardisé de spores de la bactérie dans un milieu gélosé.

Ces tests présentent un spectre de détection et une sensibilité vis-à-vis des pénicillines comparables à ceux de la méthode d'acidification officielle. Les résidus d'autres substances (tétracyclines, macrolides, aminoglycosides) sont également détectables dans le lait, mais pas au niveau de leurs LMR respectives [30]. Néanmoins ils ne permettent la détection de certaines molécules antibiotiques telles que le chloramphénicol ou les nitrofuranes. Par conséquent des tests complémentaires peuvent se révéler nécessaires [51]

b. Valio T101

Comme le Delvotest SP, il est sensible aux antibiotiques et aux sulfamides. Il réside sur la croissance ou non de cette souche bactérienne sensible, *Streptococcus thermophilus*. Il y a production d'acide par la bactérie en croissance ce qui fait virer l'indicateur coloré de pH qui passe ainsi du bleu au jaune. Quand l'échantillon de lait testé contient des antibiotiques ou des sulfamides, la croissance bactérienne est inhibée et la couleur reste bleue [38].

c. Copan test p et s 100

C'est le test le plus récent, très proche du Delvotest, il utilise aussi *Bacillus stearothermophilus calidodactis*, nécessite la même durée et la même température d'incubation, le même réactif coloré. Son milieu gélosé contient, comme le Delvotest MCS, tous

les ingrédients pour la réaction. Il se présente sous forme de tubes unitaires adaptés aux analyses individuelles ou de microplaques pour les analyses collectives [50].

3.2.3. Méthode enzymatique

➤ Lumac

Il s'agit d'un test rapide (35 mn) basé sur l'ATP-metric. Il met en évidence, par une réaction colorée, une enzyme produite par *Bacillus stearothermophilus* lors de sa croissance. Si le germe est inhibé, l'enzyme ne s'est pas produite.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Objectif

Notre étude expérimentale a pour but de rechercher des résidus d'antibiotiques dans le lait cru des élevages destinés à la consommation familiale.

II. Période et régions d'étude

Cette étude a été réalisée dans quelques élevages situés dans la wilaya de Chlef et Médéa durant la période du 03 Novembre au 14 Décembre 2015.

Les analyses ont été réalisées au niveau du laboratoire du département de l'agronomie de l'université de Blida 1.

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel de collecte

Le matériel de collecte utilisé est le suivant :

- Flacon en plastique avec bouchons stérile de 60 ml
- Étiquettes adhésives pour l'identification des flacons
- Glacière pour le transport des échantillons

III.1.2. Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé est le suivant (Voir figure 1):

- Baines marie à 64 C
- Réfrigérateur
- Minuterie
- Le kit Delvotestsp



Figure 1 : Matériel de laboratoire (photo personnelle)

Le kit d'analyse, Delvotest SP, est composé de :

100 ampoules séparées les une des autres renfermant un milieu gélosé solide violace, contenant un indicateur de pH et du triméthoprime, ensemencé par un germe test (*Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*) et enrichi en éléments nutritifs de croissance. Les ampoules sont recouvertes d'une feuille d'aluminium. Des micropipettes stériles pour le prélèvement de 0,1 ml des échantillons de lait sont également fournies avec le kit.

III.2 Méthodes

III.2.1. Origine des échantillons

98 échantillons du lait cru provenant de 98 vaches différentes, ont été prélevés au niveau de 18 élevages de bovins laitiers de deux wilayas (Chelf et Médéa), choisis selon la facilité d'accès, la disponibilité et surtout l'esprit coopératif des éleveurs.

III.2.2. Conditions de prélèvement du lait

Le prélèvement du lait cru a été réalisé par la collecte du lait des quatre quartiers de la mamelle après lavage et désinfection des trayons et élimination du premier jet de lait. Le lait est recueilli dans des flacons en plastiques stériles portant le numéro d'élevage, la vache et la région), d'une capacité de 60 ml. Puis sont stockés et transportés dans une glacière à +4°C vers le laboratoire où ils ont été congelés jusqu'au jour de l'analyse.

III.2.3. Technique d'analyse

Nous avons choisi cette méthode pour le large spectre des antibiotiques identifiés et la rapidité du test. Au cours de notre analyse, nous avons effectué les étapes suivantes :

- Décongeler les prélèvements du lait cru conservés.
- Régler la température du bain marie à $64 \pm 0.5 \text{ C}^\circ$
- Identifier les ampoules
- Ouvrir les ampoules en perçant un trou dans la feuille d'aluminium avec la pointe de la seringue sans embout (Voir figure 2)

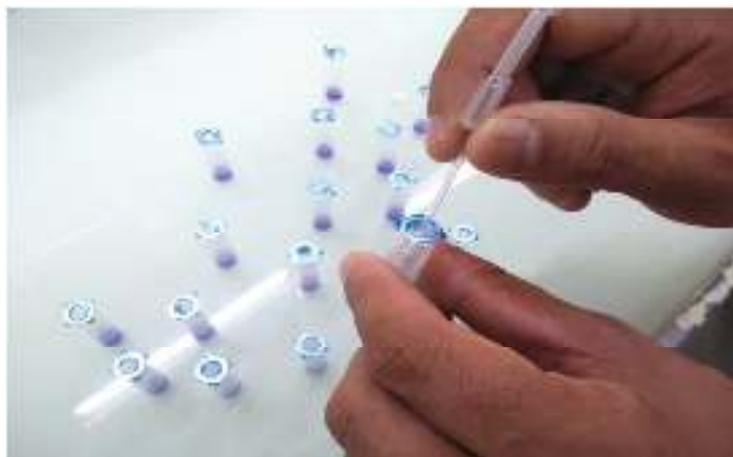


Figure 2 : Ouverture de la feuille d'aluminium (photo personnelle)

- Agiter les échantillons de lait cru à analyser.
- Prélever 0,1 ml d'échantillon de lait par la micropipettejetable (Voir figure 3).



Figure 3 : Prélèvement du lait (photo personnelle)

- Verser ensuite la totalité du prélèvement de lait dans lampoules identifiée correspondent.
- Couvrir les ampoules par le papier d'aluminium (Voir figure 4).



Figure 4 : Couverture des ampoules(photo personnelle)

- Placer les 100 ampoules dans un support en polyester et les incuber dans un bain marie à $64 \pm 0,5$ C° pendant 3h (Voir figure 5).



Figure 5 :Incubation des ampoules(photo personnelle)

- Pour le bon déroulement de la lecture nous utilisons en parallèle deux témoins :
 - **Témoin positif :**

Un échantillon standard de pénicilline :coloration violette.

- **Témoin négatif :**

Un échantillon de lait exempt d'antibiotiques : coloration jaune.

La lecture des échantillons doit se fait dans les 2/3 inférieurs de l'agar après 3h de l'incubation à 64 C°, retirer les ampoules du bain marie et lire les résultats (Voir figure 6).

-Une coloration jaune indique l'absence de substance d'antibiotique.

-Une coloration jaune/violette indique la présence de substance antibactérienne à une concentration égale ou inférieure au seuil de détection.

-Une coloration violette indique la présence de substance d'antibiotique inhibitrice dans l'échantillon de lait analysé à une concentration égale ou supérieur au seuil de détection.

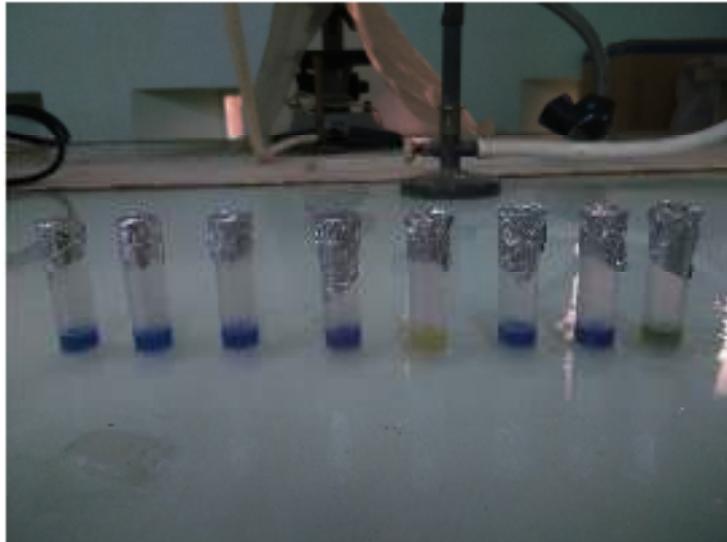


Figure 6 : Lecture des résultats(photo personnelle)

Le seuil de sensibilité du DelvotestSP se situe entre 2 et 4 ng/ml pour la pénicilline G et entre 25 et 100 ng/ml pour la sulfadiazine.

IV. Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans les laits crus d'élevages de la wilaya de Chlef et Médéa

IV.1. Wilaya de Chlef

Les résultats obtenus sur les analyses du lait d'élevages de la wilaya de Chlef provenant des quatre communes (Ouled Ben AbdElkader, Oued Sly, Boukadir et Oued Fedha) sont représentés comme suit :

IV.1.1. Commune d'Ouled Ben Abd Elkader

Le tableau 1 et la figure 7 représentent les résultats obtenus de l'analyse des laits crus de la commune d'Ouled Ben AbdElkader.

Tableau 1: Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'Ouled Ben AbdElkader.

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	%	Douteux (+/-)	%	Négatifs (-)	%
1	4	4	100	0	0	0	0
2	5	4	80	0	0	1	20
3	2	2	100	0	0	0	0
Total	11	10	90.90	0	0	1	9.10

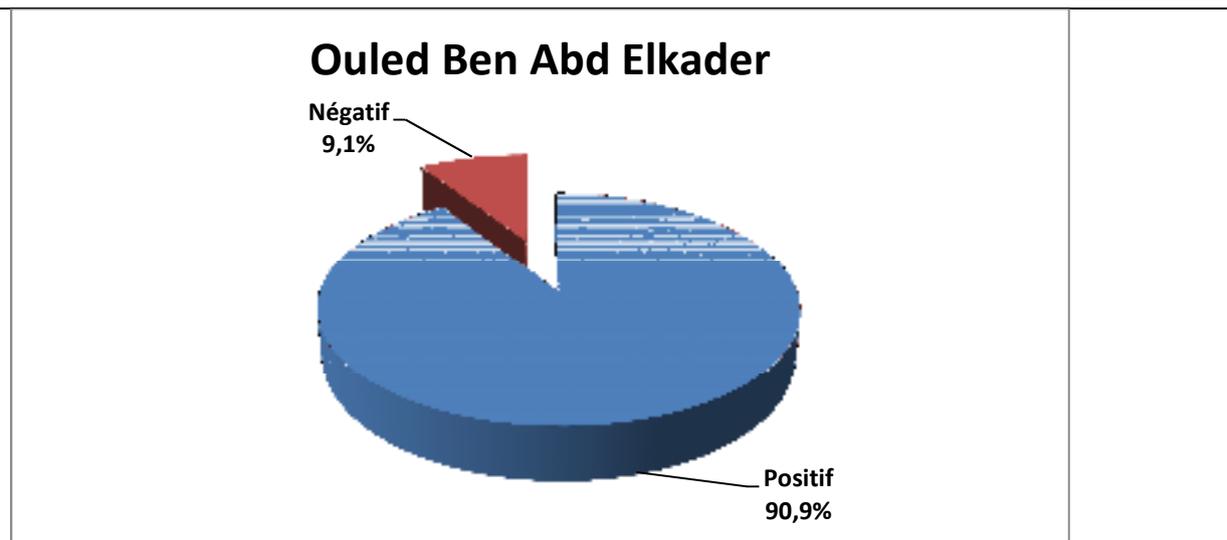


Figure 7 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d’antibiotiques dans la commune d’Ouled Ben AbdElkader.

Les résultats provenant de la commune d’Ouled Ben AbdElkadermontrent que :

- 10 échantillons de lait crus analysés sont positifs,soit 90.90%.
- Aucun échantillon de lait cru analysé est douteux, soit 0%.
- un échantillon de lait cru analysé est négatif soit 9.09%.

IV.1.2. Commune d’OuedSly

Le tableau 2 et la figure 8 représentent les résultats obtenus de l’analyse de lait cru dans la commune d’Oued Sly.

Tableau 2:Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'OuedSly.

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	(%)	Douteux (+/-)	(%)	Négatifs (-)	(%)
1	5	5	100	0	0	0	0
2	3	2	100	0	0	0	0
3	2	3	100	0	0	0	0
Total	10	10	100	0	0	0	0

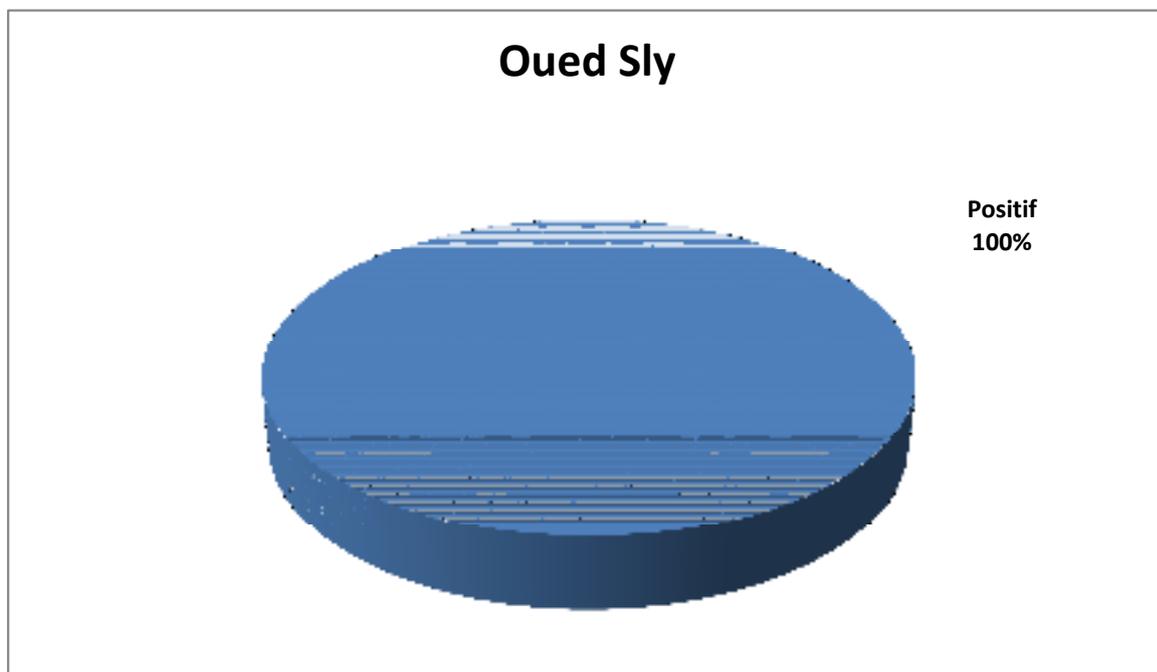


Figure 8 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune d'OuedSly.

Tous les prélèvements de lait cru provenant des élevages de la commune d'OuedSly ont relevé une positivité, soit 100%.

IV.1.3. Commune de Boukadire

Le tableau 3 et la figure 9 représente les résultats obtenus de l'analyse du lait cru dans la commune de Boukadire.

Tableau 3 : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotique dans le lait cru provenant de la commune de Boukadire

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	(%)	Douteux (+/-)	(%)	Négatifs (-)	(%)
1	7	5	71.42	1	14.28	1	14.28
2	6	5	83.33	1		0	
Total	13	10	76.92	2	15.38	1	7.69

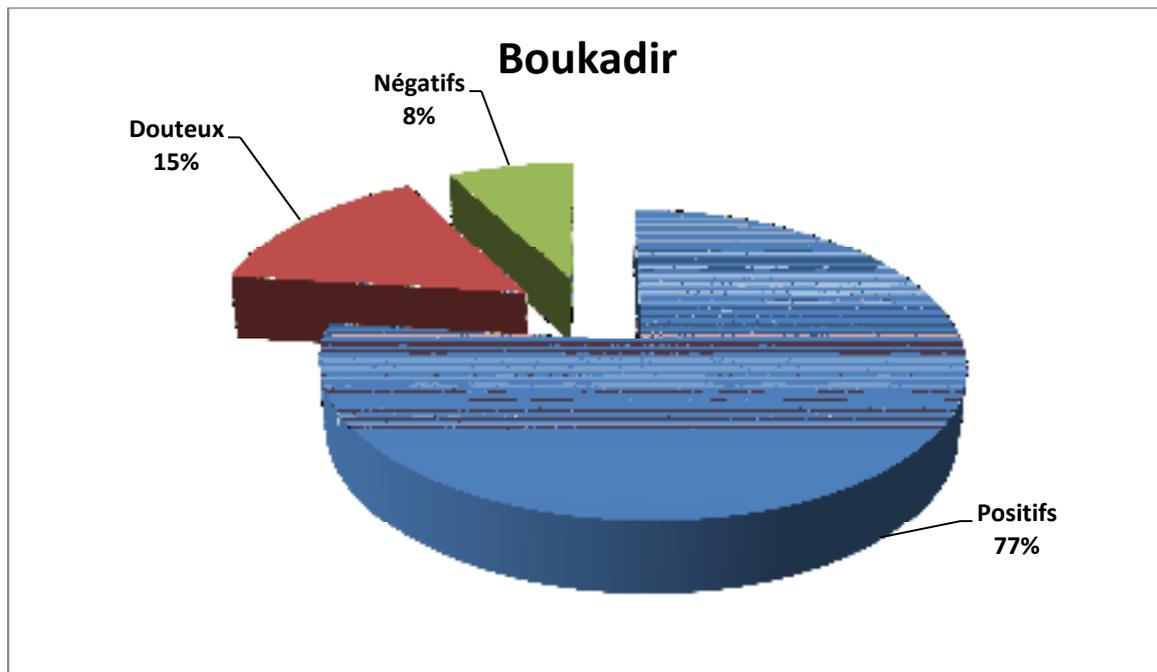


Figure 9 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune de Boukadir.

Les résultats provenant de la commune de Boukadir montrent que :

- 10 échantillons de lait analysés sont positifs, soit 76.92%.
- 02 échantillons de lait analysés sont douteux, soit 15.38%.
- 01 échantillon de lait analysés sont négatifs, soit 7.69%.

3.1.4. Commune d'OuedFedha

Le tableau 4 et la figure 10 représentent les résultats obtenus de l'analyse du lait cru dans la commune d'Oued Fedha.

Tableau 4 : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru provenant de la commune d'OuedFedha

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	(%)	Douteux (+/-)	(%)	Négatifs (-)	(%)
1	8	8	100	0	0	0	0
2	2	2	100	0	0	0	0
3	6	6	100	0	0	0	0
Total	16	16	100	0	0	0	0

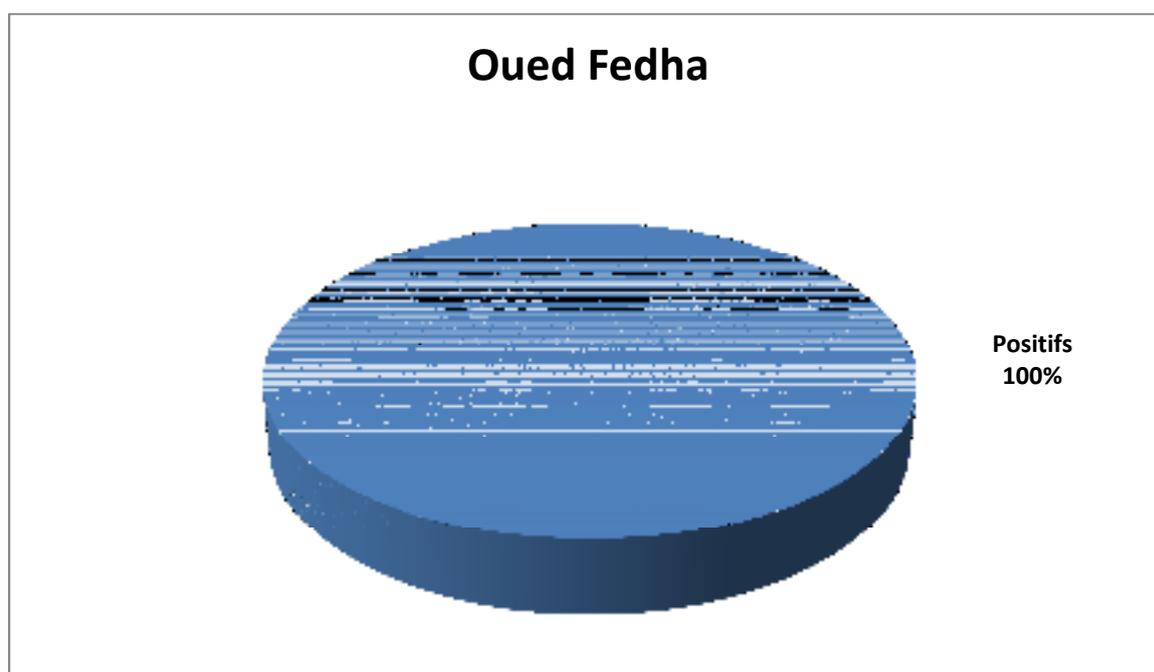


Figure 10 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune d'OuedFedha.

Tous les échantillons provenant des élevages de la commune d'OuedFedha ont relevé une positivité de 100%.

IV.1.5. Quatre communes confondues (Ouled Ben AbdElkaer, Oued Sly, Boukadir et Oued Fedha).

L'association des résultats obtenus des communes (Ouled Ben AbdElkader, Oued Sly, Boukadir et Oued Fedha) de la wilaya de Chlef est représentée dans le tableau 5 et la figure 11.

Tableau 5 : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la wilaya de Chlef

Communes	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	(%)	Douteux (+/-)	(%)	Négatifs (-)	(%)
Ouled Ben AbdElkader	11	10	90.9	0	0	1	9.09
Oued Sly	10	10	100	0	0	0	0
Boukadir	13	10	76.92	2	15.38	1	7.69
Oued Fedha	16	16	100	0	0	0	0
Total	50	46	92	2	4	2	4

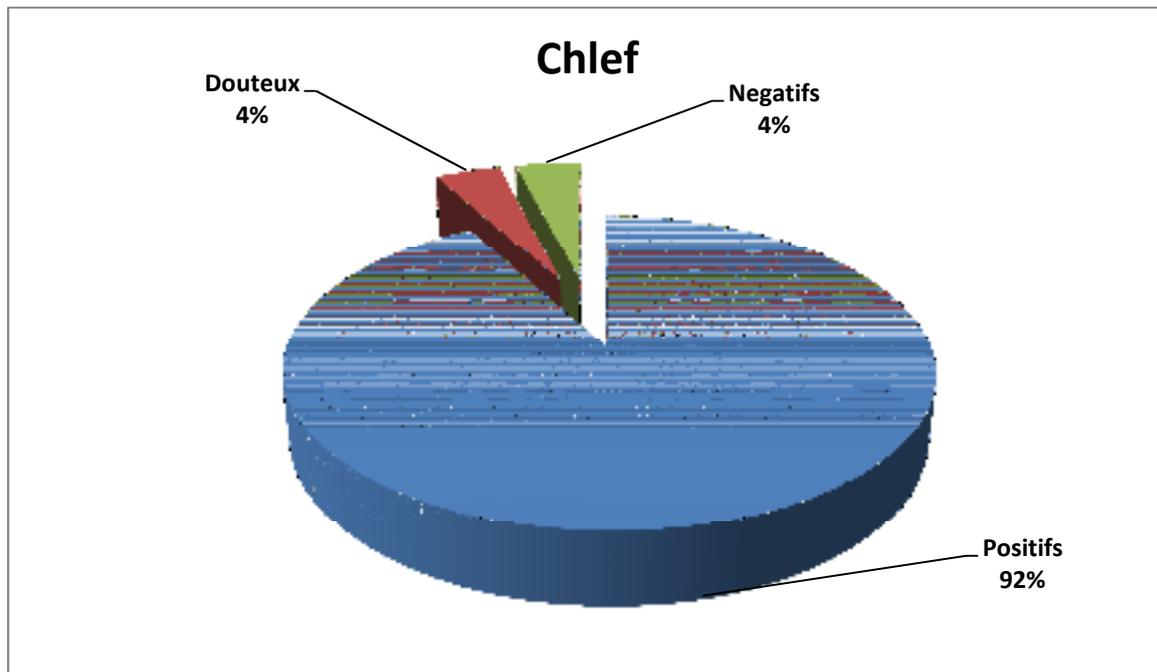


Figure 11 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d’antibiotiques dans la wilaya de Chlef.

Les résultats provenant de la wilaya de Chlef montrent que :

- 46 échantillons de lait analysés sont positifs, soit 92%.
- 02 échantillons de lait analysés sont douteux, soit 4%.
- 02 échantillon de lait analysés sont négatifs, soit 4%.

IV.2. Wilaya de Médéa

Les résultats obtenus sur le lait cru d’élevages de la wilaya de Médéa provenant des quatre communes (Beni Slimane, Aumariy, Azzazia et Bousken) sont représentés comme suit :

3.2.1. Commune de Beni Slimane

Le tableau 6 et la figure 12 représentent les résultats obtenues de l’analyse de lait cru de la commune de Beni Slimane.

Tableau 6 : Résultats de la recherche des résidus d’antibiotiques dans le lait cru de la commune de Beni Slimane.

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	%	Douteux (+/-)	%	Négatifs (-)	%
1	3	3	100	0	0	0	0
2	5	5	100	0	0	0	0
3	4	4	100	0	0	0	0
4	3	3	100	0	0	0	0
Total	15	15	100	0	0	0	0

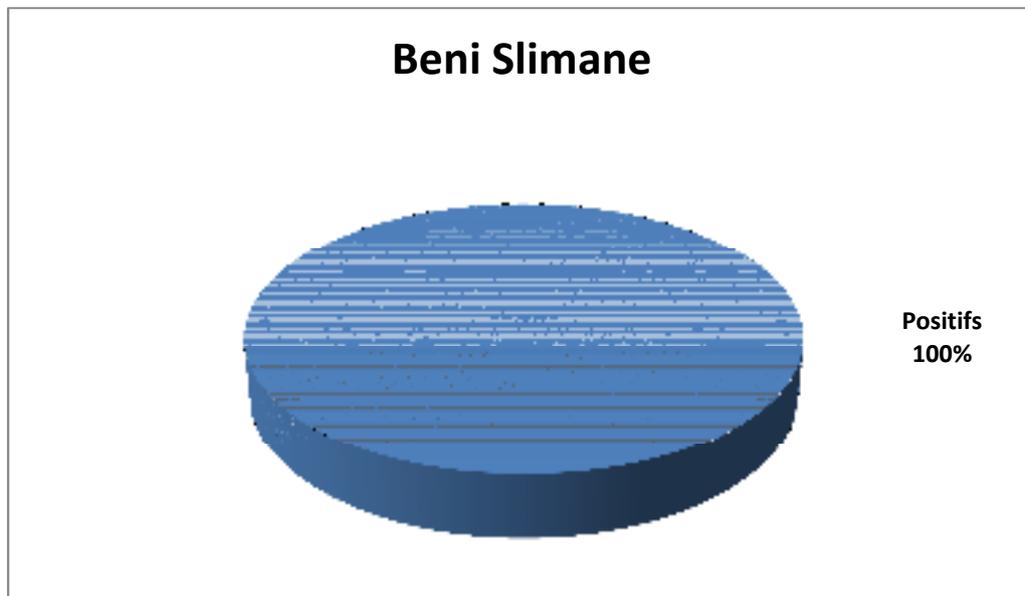


Figure 12 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d antibiotiques dans la commune de Beni Slimane.

Tous les échantillons provenant des élevages de la commune de Beni Slimane ont relevé une positivité de 100%.

IV.2.2. Commune d'Aumaria

Le tableau 7 et la figure 13 représentent les résultats obtenus de l'analyse du lait cru de la commune d'Aumaria.

Tableau 7 :Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'Aumaria

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	%	Douteux (+/-)	%	Négatifs (-)	%
1	4	4	100	0	0	0	0
2	4	4	100	0	0	0	0
3	3	3	100	0	0	0	0
Total	11	11	100	0	0	0	0

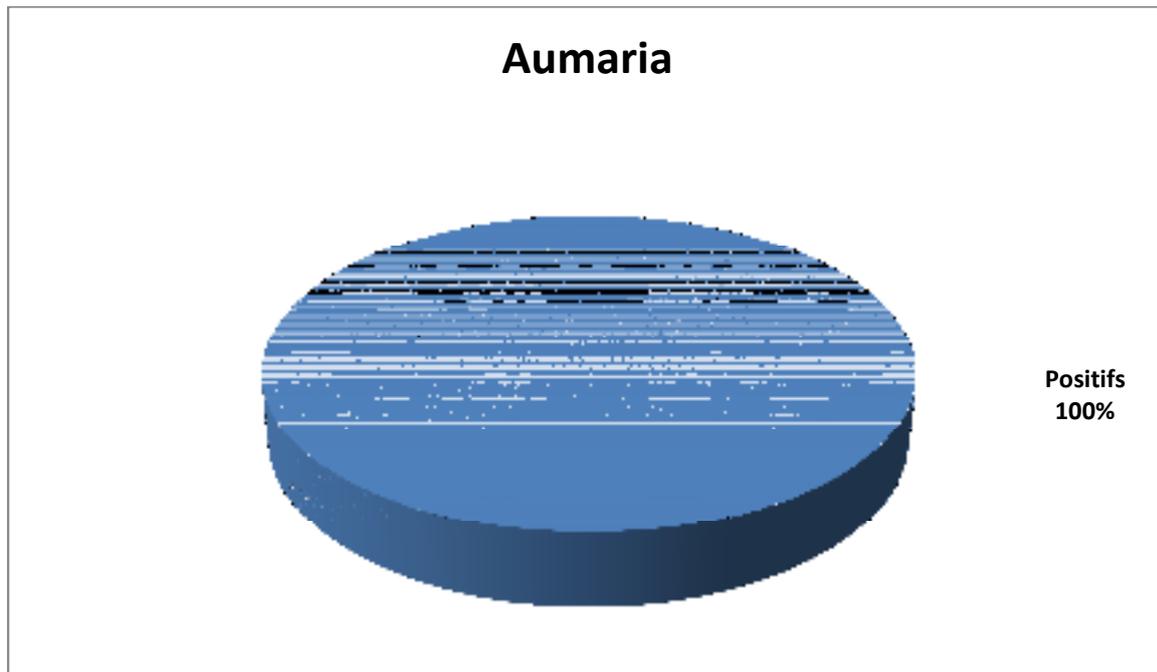


Figure 13 : Pourcentage de contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune d'Aumaria

Tous les échantillons provenant des élevages de la commune d'Aumaria ont relevé une positivité de 100%.

IV.2.3. Commune d'Azzazia

Le tableau 8 et la figure14 représentent les résultats obtenus de l'analyse du lait cru de la commune d'Azzazia.

Tableau 8 :Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune d'azzazia.

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	%	Douteux (+/-)	%	Négatifs (-)	%
1	6	6	100	0	0	0	0
2	4	4	100	0	0	0	0
Total	10	10	100	0	0	0	0

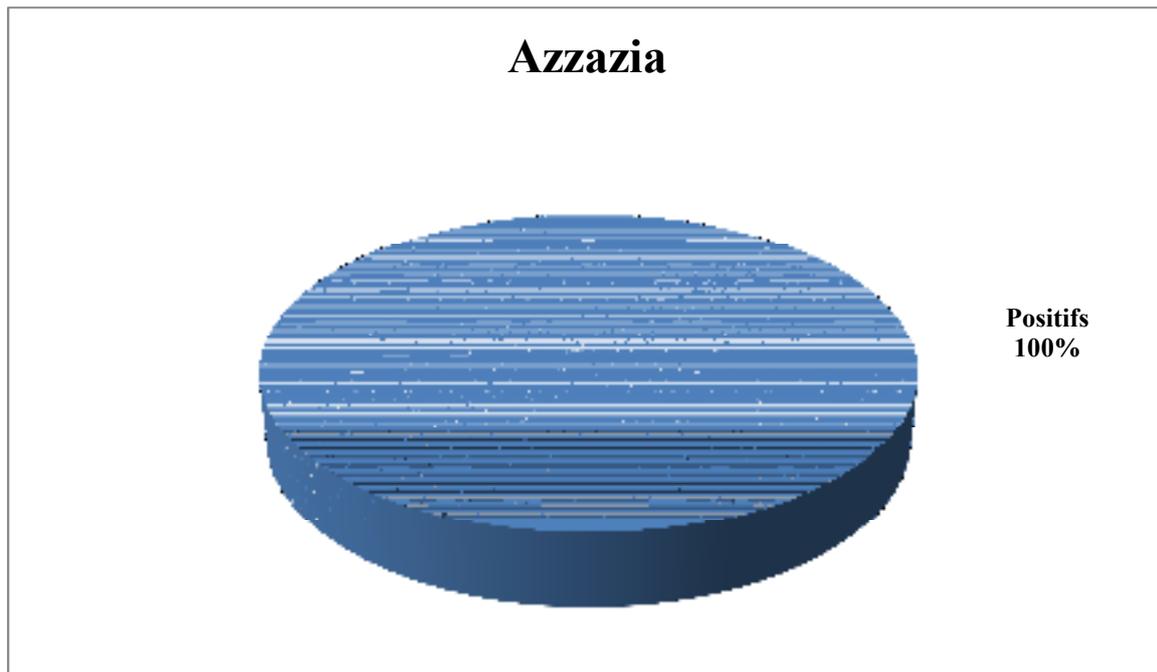


Figure 14 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune d'Azzazia.

Tous les échantillons provenant des élevages de la commune d'Azzazia ont relevé une positivité de 100%.

IV.2.4. Commune de Bousken

Le tableau 9 et la figure 15 représentent les résultats obtenus de l'analyse du lait cru de la commune de Bousken.

Tableau 9 : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la commune de Bousken

Nombre d'élevages	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	%	Douteux (+/-)	%	Négatifs (-)	%
1	5	5	100	0	0	0	0
2	4	4	100	0	0	0	0
3	3	3	100	0	0	0	0
Total	12	12	100	0	0	0	0

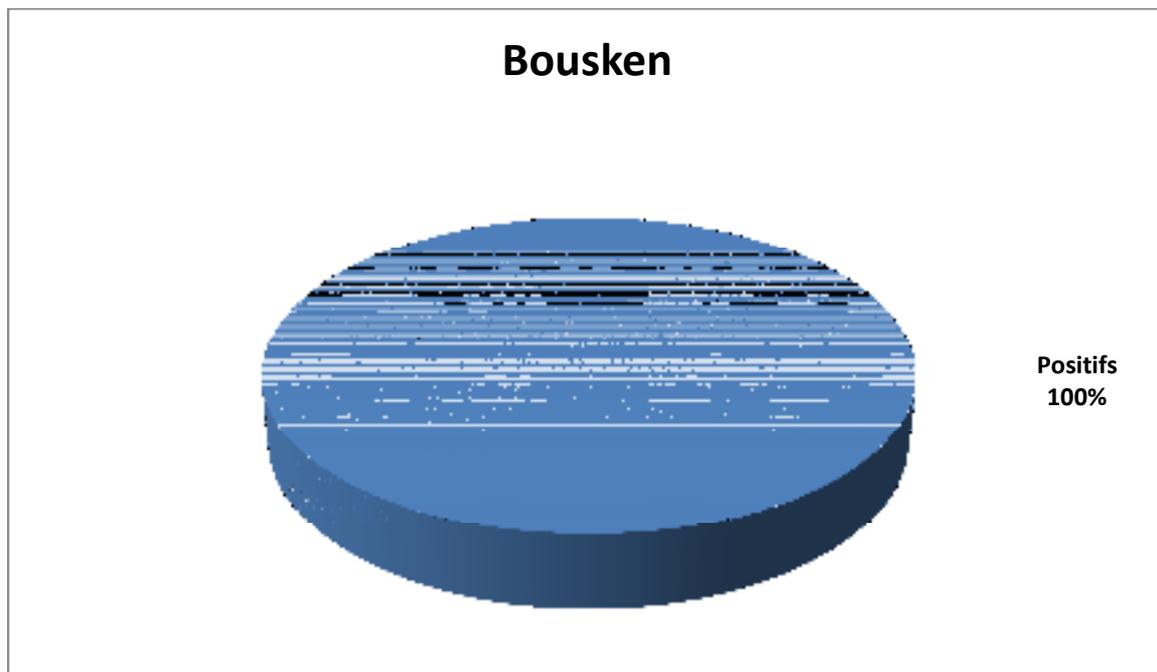


Figure 15: Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la commune de Bousken

Tous les échantillons provenant des élevages de la commune de Bousken ont relevé une positivité de 100%.

IV.2.5. Quatre communes confondues (Beni Slimane, Aumaria, Azzazia et Bousken).

L'association des résultats obtenus sur le lait cru des quatre communes (Beni Slimane, Aumariar, Azzazia et Bousken) de la wilaya de Chlef est représentée dans le tableau 10 et la figure 16.

Tableau 10 : Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru de la wilaya de Médéa

Communes	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	(%)	Douteux (+/-)	(%)	Négatifs (-)	(%)
Beni Slimane	15	15	100	0	0	0	0
Aumaria	11	11	100	0	0	0	0
Azzazia	10	10	100	0	0	0	0
Bousken	12	12	100	0	0	0	0
Total	48	48	100	0	0	0	0

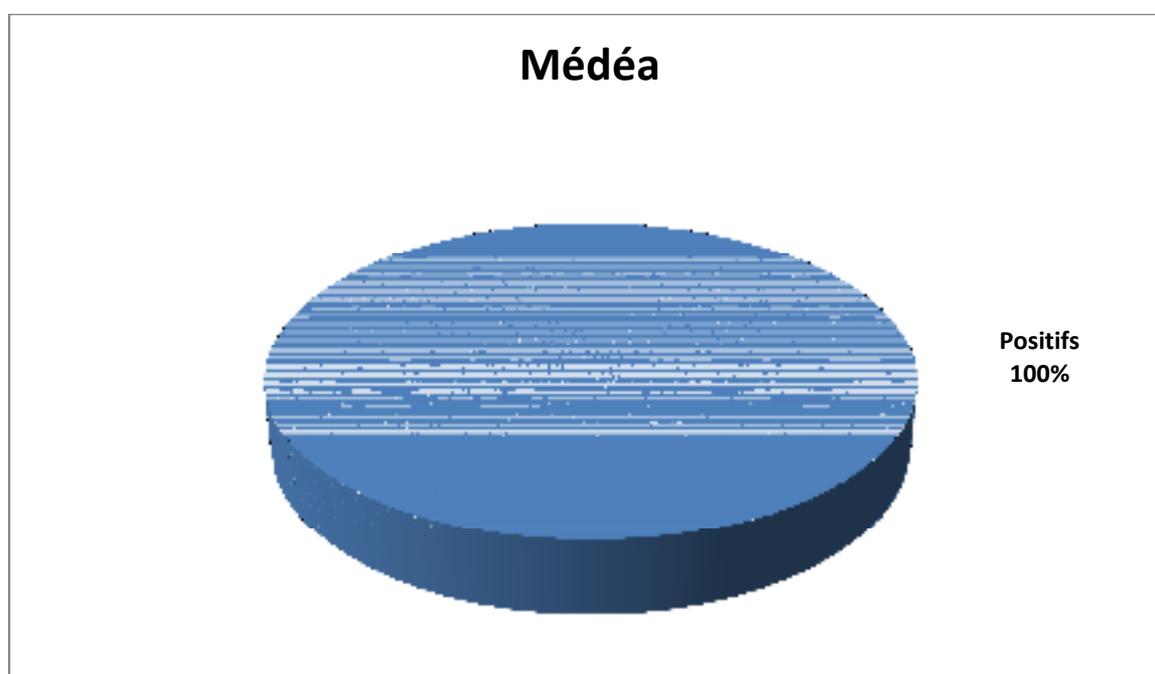


Figure 16 : Pourcentage de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la wilaya de Médéa.

IV.2.3 Wilaya de Chlef et Médéa confondus

L'association des résultats obtenus sur le lait cru des wilayas de Chlef et Médéa est représentée dans le tableau 11 et la figure17.

Tableau 11 : Résultats confondus de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru des wilayas de Chlef et Médéa

Wilayas	Nombre de prélèvements	Résultats					
		Positifs (+)	(%)	Douteux (+/-)	(%)	Négatifs (-)	(%)
Chlef	50	46	92	2	4	2	4
Médéa	48	48	100	0	0	0	0
Total	98	94	95.91	2	2.04	2	2.04

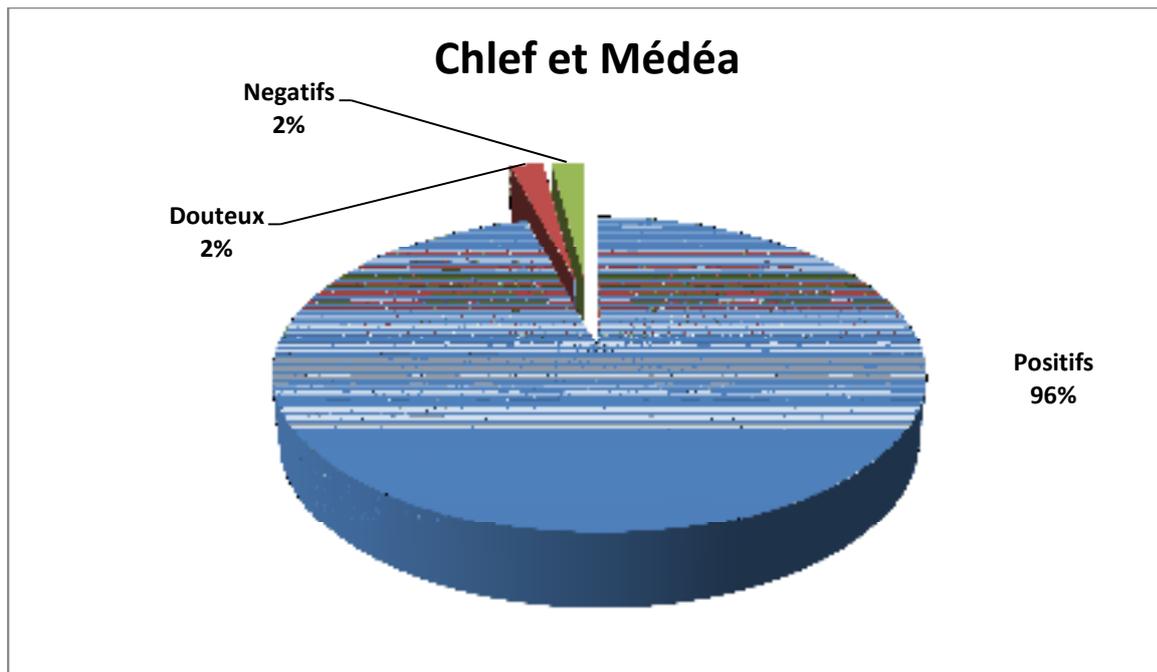


Figure17 : Pourcentage de la contamination du lait cru des deux wilayas confondus (Chlef et Médéa).

Les résultats provenant des deux wilayas confondus montrent que :

- 94 échantillons de lait analysés sont positifs, soit 96%.
- 02 échantillons de lait analysés sont douteux, soit 2%.
- 02 échantillon de lait analysés sont négatifs, soit 2%.

V. Discussion

Notre étude expérimentale ayant pour objectif la recherche des résidus d'antibiotiques au moyen du Delvotest SP dans le lait cru des élevages de la wilaya de Chlef et Médéa a montré que :

- 94 échantillons sont contaminés par les résidus des antibiotiques avec un taux de 95.91 %.
- 2 échantillons douteux soit un taux de 2.04%.
- 2 échantillons sont négatifs soit un taux de 2.04%.

V.1. Résultats positifs

Sur les 98 échantillons de lait cru analysés au moyen du Delvotest SP a montré que 94 échantillons sont positifs, soit un taux de 95.91 %, qui relève un grand pourcentage de contamination par les résidus antibiotiques.

Nos résultats semblent être plus supérieurs à ceux retrouvés dans l'étude réalisée à Tizi –Ouzou par FERHATI et SARADONI en 2014, qui ont rapporté un taux de contamination très faible, soit 0.85%.

Nos résultats sont proches de ceux rapportés par l'étude, réalisée par KRESS et al entre 2003 et 2005 qui ont enregistré la contamination de 95% des échantillons de lait crus analysés.

Nous supposons que la contamination du lait cru d'élevages par les résidus d'antibiotiques est due à :

- L'utilisation des antibiotiques à titre curatifs dont l'objectif majeur est d'éradiquer l'infection, d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades, d'éviter leur mortalité et de restaurer leur production.

Traitements des mammites, qui sont la principale affection en élevage laitier. Leur traitement est de loin la première cause d'utilisation des antibiotiques, avec environ deux traitements intra mammaires par vache et par an (un en lactation et un autarissement), auxquels il convient d'ajouter des traitements par voie générale assez nombreux

.Le Delvotest SP offre un large spectre de détection et présente une sensibilité voisine des seuils LMR (limite maximale de ces résidus) et il est facilement utilisé.

Le principal inconvénient du Delvotest SP est sa durée (3h), et une très peu sensibilité aux agents désinfectants, qui ne peuvent le rendre positif qu'à des doses très importantes.

V.2. Résultats douteux

Dans notre cas, nous avons trouvé 2 échantillons douteux soit un taux de 2,04% c'est-à-dire que la concentration des résidus d'antibiotiques dans le lait cru est proche du seuil de détection du test.

Pour la confirmation dans ces résultats il faut faire passer les échantillons dans d'autres tests plus adéquats (ELISA).

V.3. Résultats négatifs

Nos résultats sur les laits crus montrent que 2 échantillons sont négatifs soit un taux de 2,04%, un taux qui est plus inférieur de celui de FERHATI et SARADONI(2014) qui ont rapporté 88,99% de laits négatifs.

Le taux bas de négativité des échantillons de lait cru analysés provenant des vaches des élevages de la wilaya de Chlef et Médéa peut être expliqué par la non conscience des éleveurs du danger encouru par les consommateurs suite à l'absorption d'un lait cru contaminé et qui échappe à tout contrôle hygiénique et sanitaire, sachant que la plupart des éleveurs ne sont pas conventionnés par les laiteries et le lait dans ces élevages est orienté vers l'autoconsommation ou la vente indirecte à savoir les crémeries.

CONCLUSION

La présente étude a montré que les résidus d'antibiotiques sont bien présent dans le lait cru, produit de large consommation, ce qui constitue un risque non négligeable chez l'industriel et le consommateur et dont l'incidence économique est considérable.

La mauvaise utilisation du médicament et le non-respect du délai d'attente relèvent de la responsabilité de l'éleveur, ainsi que le vétérinaire par le non maîtrise de la réglementation et de la manipulation des médicaments. La cohérence et la coordination entre les éleveurs et les vétérinaires doivent permettre de rapprocher, dans ce sens, pratique et réglementation.

La recherche systématique des résidus d'antibiotiques dans les échantillons de lait demeure le seul moyen de prévention qui peut assurer l'innocuité complète des produits. Pour ce faire, il est donc impératif de disposer de méthodes de détection fiables, sensibles et spécifiques. Le Delvotest SP serait l'un des tests les plus avantageux en raison de son emploi aisé, cependant, il devrait être utilisé comme un test de tri préliminaire des échantillons de lait et complété par la suite par d'autres tests plus sensibles offrant moins de réactions douteuses, faussement positives ou faussement négatives.

Les axes d'amélioration se portent aujourd'hui vers la filière de l'élevage avec une formation et une information toujours plus technique des éleveurs qui restent le maillon principal pour la qualité des denrées alimentaires d'origine animale.

RECOMMANDATION

A l'issus de notre étude, pour minimiser la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait cru et pour garantir un aliment sain aux consommateurs sans risque pour leur santé, nous recommandons les mesures suivantes:

- Mettre en place de bonnes pratiques d'élevage avec une utilisation des antibiotiques vétérinaires adéquate.
- Les vaches subissant un traitement antibiotique lors du tarissement doivent être séparées pour éviter toutes erreurs lors de la traite.
- Prescription obligatoire par les vétérinaires des antibiotiques utilisés dans le traitement des maladies des bovins laitiers.
- Le vétérinaire doit impérativement informer l'éleveur de respecter le délai d'attente du médicament pour éviter tout problème de résidus dans le lait.
- Identifier toutes les vaches qui ont été traitées à l'aide de bagues colorées ou de marqueurs de bétail.
- Le diagnostic des infections survenant dans les élevages doit être amélioré, par l'introduction des outils nouveaux de diagnostic qui permettent d'identifier des situations qui nécessitent un usage ou non de l'antibiotique.
- Faire périodiquement des tests de contrôle aux niveaux des élevages
- Promouvoir l'éducation et la formation des éleveurs sur les bonnes pratiques de l'antibiothérapie, et les risques encourus lors des mauvaises pratiques.
- Renforcer la réglementation par la prise de texte réglementaire de traçabilité lors de la collecte avec un suivi rigoureux au moment de l'élaboration des produits transformés, pour assurer la sécurité du consommateur.