



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la
recherche scientifique Université de Tébessa



Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Domaine: Sciences de la nature et de la vie

Filière: Sciences biologiques

Département : Biologie appliquée

Option : Microbiologie appliquée

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Intitulé

**Recherche des résidus d'antibiotiques
dans le lait cru**

Présenté par :

Merzoug Aya

Hamed Maroua

Date de soutenance : 09/06/2022

Devant le jury :

Dr Smaali S.	MCA	Université de Tébessa	Présidente
Mme Azizi N.	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice
Dr Debabza M.	MCA	Université de Tébessa	Promotrice

Année universitaire : 2021/ 2022

Résumé

Les antibiotiques sont très utilisés en élevage bovin à des fins thérapeutiques, prophylactiques ou comme facteurs de croissance. Mais la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires telles que le lait, pose aujourd'hui, des risques sanitaires considérables pour le consommateur au côté des problèmes technologiques en industrie agro-alimentaire.

Dans ce contexte, notre travail porte sur la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru dans la région de Tébessa.

Cent vingt échantillons de lait cru ont été collectés : soixante-dix échantillons du lait commercialisé et cinquante échantillons directement prélevés des fermes. Les résidus d'antibiotiques sont recherchés selon le test d'inhibition microbienne par la méthode de diffusion en gélose, en utilisant une souche sensible de *Bacillus subtilis*.

Les résultats obtenus ont montré l'absence des résidus de macrolides et des aminosides avec une contamination douteuse de 2,5 % des laits testés.

Notre étude suggère l'absence d'au moins deux familles d'antibiotiques. Ceci n'indique pas que le lait est tout à fait salubre car les autres familles comme les bêta-lactamines et les tétracyclines n'ont pas été recherchées.

Mots clés : lait cru, résidus d'antibiotiques, santé publique, test d'inhibition microbienne

Abstract

Antibiotics are widely used in cattle breeding for therapeutic, prophylactic purposes or as growth promoters. But the presence of antibiotic residues in foodstuffs such as milk, poses today, considerable health risks for the consumer alongside technological problems in the food industry.

In this context, our study focuses on the search for antibiotic residues in raw milk in the region of Tébessa.

One hundred and twenty samples of raw milk were collected: seventy samples of marketed milk and fifty samples taken directly from farms. Antibiotic residues are searched according to the microbial inhibition test by the agar diffusion method, using a sensitive strain of *Bacillus subtilis*.

The results obtained showed the absence of residues of macrolides and aminoglycosides with a doubtful contamination of 2.5 % of the milks tested.

Our study suggests the absence of at least two families of antibiotics. This does not indicate that the milk is completely safe because the other families such as beta-lactams and tetracyclines have not been researched.

Keywords: raw milk, antibiotic residues, public health, microbial inhibition test

ملخص

تستخدم المضادات الحيوية على نطاق واسع في تربية الماشية للأغراض العلاجية أو الوقائية أو كمحفزات للنمو. لكن وجود بقايا المضادات الحيوية في المواد الغذائية مثل الحليب اليوم يشكل مخاطر صحية كبيرة للمستهلك إلى جانب المشاكل التكنولوجية في صناعة الأغذية في هذا السياق ، يركز عملنا على البحث عن بقايا المضادات الحيوية في الحليب الخام في منطقة تبسة.

جمعت مائة وعشرون عينة من الحليب الخام : سبعون عينة من الحليب المسوق وخمسون عينة مأخوذة مباشرة من المزارع. يتم البحث عن بقايا المضادات الحيوية وفقاً لاختبار التثبيط الميكروبي بواسطة طريقة انتشار الأجار ، باستخدام سلالة حساسة من العصوية الرقيقة.

أظهرت النتائج المحصل عليها عدم وجود بقايا لماكرولايدات وأمينوغليكوزيدات مع تلوث مشكوك فيه بنسبة 2.5 % من الحليب المختبر.

تشير دراستنا إلى عدم وجود عائلتين على الأقل من المضادات الحيوية. هذا لا يشير إلى أن الحليب آمن تماماً لأن العائلات الأخرى مثل بيتا لكتامين والتتراسيكلين لم يتم البحث عنها.

الكلمات المفتاحية: الحليب الخام ، بقايا المضادات الحيوية ، الصحة العامة ، اختبار التثبيط الميكروبي

Remerciements

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **ALLAH** de nous avoir donné la volonté, la santé et la patience pour mener à terme ces longues années d'étude.*

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui nous ont aidées à la réalisation de ce mémoire.

*Nous tenons à exprimer notre gratitude et remerciements à notre encadreur de mémoire **Dr Debabza.M**, qui a toujours été disponible tout au long de la réalisation de ce travail, elle nous a guidé et aidé à trouver les solutions pour avancer, merci d'être très patiente avec nous.*

Ensuite nous tenons à remercier nos parents pour leur contribution et patience, Inshallah nous allons vous rendre très fiers.

*Nous adressons aussi nos remerciements aux membres de jury **Dr. Smaali .S** et **Mme Azizi. N**, d'avoir accepté de juger ce mémoire.*

*Nous n'oublions pas de remercier **Dr Menasria T.** pour son aide précieuse.*

Dédicace

*Je dédie ce travail en signe de respect et d'amour à mes très chers
parents Abd El Ghafour et
Amel qui ont partagé mes joies et mes peines, qui ont été toujours à
mes côtés, et qui ont fait
de moi ce que je suis aujourd'hui. Que Dieu les garde toujours en
bonne santé.*

A mes chers frères Mouedh et mouhamed et sœur Rayene.

A mes chers tantes et oncles.

A tous mes ami(e)s sans exception qu'ils soient proche ou loin.

A ma binôme et toute sa famille adorable.

A tous ceux qui me sont chers.

Aya



Je dédie ce travail.

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur
tendresse, leur soutien et
leurs prières tout au long de mes études.*

*A mon encadreur pour tous ses efforts,
ses conseils et son soutien*

*A ma chère sœur Sarah pour
ses encouragements permanents,
et son soutien moral,*

*A mes chers frères Mouadh et Islem
pour leur appui
et leur encouragement, A mon Binôme
Aya et sa famille*

Maroua

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Composition chimique de lait de vache.	3
02	Principales molécules antibiotiques utilisées en buiatrie.	10
03	Plan d'échantillonnage.	18
04	Familles d'antibiotiques détectées par <i>B.subtilis</i> .	25
05	Répartition des échantillons du lait en fonction de leur origine.	26
06	Résultats de test d'inhibition microbienne.	26

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Localisation des fermes.	20
02	Echantillons du lait cru.	21
03	Observation microscopique de <i>Bacillus subtilis</i> Cip 5262 après coloration de Gram.	22
04	Ajustement de la densité de l'étalon de turbidité Mc Farland 0.5.	22
05	Préparation de la suspension bactérienne.	23
06	Traitement thermique des échantillons du lait.	24
07	Imprégnation des disques par le lait.	24
08	Plan de disposition des disques.	25
09	Photographies des échantillons présentant un résultat douteux.	27

Liste des annexes

N°	Titre
01	Limite Maximale des Résidus (LMR) des principaux antibiotiques.
02	Appareillage et verreries utilisés.
03	Composition et préparation des milieux de culture.

Table de matières

Résumé

Abstract

ملخص

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des annexes

Introduction	1
Chapitre 01 : Synthèse bibliographique	
I. Le lait cru	2
1. Définition	2
2. Composition physico-chimique	2
3. Qualités du lait	3
4. Microflore du lait	4
4.1. Flore originelle	4
4.2. Flore de contamination	4
II. Pathologies et antibiothérapie en élevage bovin	5
1. Pathologies dominantes en élevage bovin	5
1.1. Mammites	5
1.2. Affections respiratoires	6
1.3. Métrites	7
1.4. Dermatophilose	7
2. Antibiothérapie en élevage bovin	7
2.1. Définition des antibiotiques	7
2.2. Classification des antibiotiques	8
2.3. Utilisation des antibiotiques en élevage bovin	8
2.4. Antibiotiques utilisés en élevage bovin	9
2.5. Antibiotiques interdits en élevage bovin	11
2.6. Pharmacocinétique des antibiotiques chez la vache laitière	11

III. Résidus d'antibiotiques	12
1. Définition	12
2. Causes de contamination du lait par les résidus d'antibiotiques	13
3. Problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait	13
3.1. Problèmes sanitaires	13
3.1.1. Risque d'allergie	14
3.1.2. Risque de toxicité	14
3.1.3. Risque cancérigène	14
3.1.4. Risques bactériologiques	15
3.2. Problèmes technologiques	16
4. Réglementation concernant les résidus d'antibiotiques	16
4.1. Limites maximales des résidus	16
4.1.1. Définition	16
4.1.2. Réglementation « la législation algérienne »	16
4.2. Délai d'attente	17
Chapitre 02 : Matériel et méthodes	
1. Cadre de l'étude	18
2. Objectif	18
3. Matériel	18
3.1. Echantillons du lait cru	18
3.2. Souche bactérienne	19
3.3. Matériel et verreries	19
3.4. Milieux de culture et autres produits	19
4. Méthodes	19
4.1. Prélèvement des échantillons	19
4.2. Méthode de recherche des résidus d'antibiotiques	21
Chapitre 03 : Résultats et discussion	
1. Résultats	26
1.1. Origine des échantillons prélevés	26
1.2. Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait	26

2. Discussion	27
Conclusion	30
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Le lait est un produit à haute valeur nutritionnelle, qui constitue le produit de base dans le mode de consommation en Algérie de l'ordre de 97 litres/personne/an et représente en moyenne 18,4 % du coût total des aliments, avec un montant moyen de 868 millions de dollars par an (**Ouslimani, 2008; Makhlouf et al., 2015**).

Le lait cru, en particulier, constitue la matière première principale en industrie laitière. De ce fait, il doit répondre aux normes et exigences sanitaires très satisfaisantes, démontrant sa bonne qualité d'un point de vue nutritionnel, organoleptique et hygiénique, puisqu'il doit être toujours exempt de bactéries pathogènes, de bactéries d'altération, de contaminants chimiques et d'antibiotiques (**Anonyme a, 2004**).

Par ailleurs, les antibiotiques sont utilisés comme principal moyen de lutte contre les infections bactériennes en médecine vétérinaire. En élevage, ils sont couramment utilisés en prophylaxie (traitement prophylactique), en curatif (traitement des animaux malades) et en méta-défense (traitement de contrôle); ou en tant qu'additifs alimentaires (favorisant la croissance). Il est actuellement admis que l'utilisation d'antibiotiques en élevage bovin laisse inévitablement des résidus dans les aliments d'origine animale (lait, viande, etc.) qui peuvent constituer une menace pour la santé des consommateurs et en industrie agro-alimentaire. (**Pascal, 2005; Stoltz, 2008; Nickell et White, 2010; Mensah et al., 2014**).

En Algérie, les informations sur l'étendue de la contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques restent très limitées ainsi que la sensibilisation et perception de consommateur.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de déterminer le taux de contamination du lait cru par les résidus d'antibiotiques dans la région de Tébessa.

Notre manuscrit sera divisé en trois chapitres. Le premier chapitre, une synthèse bibliographique, présentera l'aspect qualitatif et l'aspect microbiologique du lait cru, puis les pathologies et l'antibiothérapie en élevage bovin et enfin les résidus d'antibiotiques et les risques liés à leur présence dans le lait cru. Dans le deuxième chapitre, on décrira notre démarche de travail pratique allant du prélèvement jusqu'à la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait. Enfin, dans le troisième chapitre, on analysera et on discutera les résultats obtenus.

Chapitre 01 :
Synthèse bibliographique

I. Le lait cru

1. Définition :

Le lait est un liquide blanc, opaque, de saveur légèrement sucrée, constituant un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires d'un mammifère femelle laitier pour la nutrition des jeunes. Il est également défini comme étant « Le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Le lait doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir du colostrum ». Le lait est à la fois une boisson d'un grand intérêt nutritionnel, car il représente un aliment de base presque complet (Pougheon, 2001; Aboutayeb, 2009; Ghazi et Niar, 2011).

2. Composition physico-chimique :

Le lait de vache est un liquide opaque, légèrement visqueux, de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible mais identifiable. Son pH est compris entre 6,4 et 6,8 (Gaucher, 2007 ; Courtet Leymarios, 2010).

Le lait est constitué essentiellement, d'eau, de glucides (lactose), de protéines, de lipides et de sels (Tableau 1). Sa composition varie selon différents facteurs liés aux animaux comme la race, l'âge, la période de lactation, ainsi que l'alimentation et la saison (Amiot *et al.*, 2002).

Selon Fredot (2005), le lait est constitué, de point de vue structural, de quatre phases :

- une émulsion de matières grasses ou phase grasse constituée de globules gras et de vitamines liposolubles (A, D);
- une phase colloïdale qui est une suspension de caséines sous forme de micelle;
- une phase aqueuse qui contient les constituants solubles du lait (protéines solubles, lactose, vitamines B et C, sels minéraux, azote non protéique);
- une phase gazeuse composée d'O₂, d'azote et de CO₂ dissous qui représentent environ 5% du volume du lait.

Tableau (1) : Composition chimique de lait de vache (Amiot *et al.*, 2002).

Eléments	Composition (g/l)
Eau	905
Glucide : Lactose	49
Lipides :	35
- matière grasse proprement dite	34
- lécithine (phospholipides)	0.5
- partie insaponifiable (stérois, carotènes, tocophérols)	0.5
Protides :	34
- caséine	27
- protides solubles (globuline, albumine)	5.5
- substances azotées non protéiques	1.5
Sels :	9
- acide citrique	2
- acide phosphorique	2.6
- acide chlorhydrique	1.7
Constituants divers : vitamines, enzymes, gaz dissous	Traces

3. Qualités du lait :

- **Qualités organoleptiques :**

La saveur normale d'un bon lait est douce, agréable et légèrement sucrée. Sa couleur est mate, ce qui est principalement due à la présence de matière grasse. Le goût et l'odeur du lait sont un indice important de sa qualité, la présence d'une mauvaise odeur et un goût désagréable avec un rancissement, reflète un problème dans la manipulation et la conservation du lait (Amiot *et al.*, 2002; Fredot, 2005; Cauty et Perreau, 2009).

Quant à la viscosité du lait, elle est particulièrement affectée par les particules colloïdes émulsifiées et dissoutes dont la teneur en graisse et en caséine possède l'influence la plus importante (Rheotest, 2010).

- **Qualité sanitaire :**

Avant toute transformation, il faut d'abord évaluer la qualité sanitaire d'un lait par dénombrement notamment des germes totaux et des cellules somatiques, présence de résidus de substances inhibitrices et évaluation de la présence potentielle de bactéries pathogènes.

Un lait de qualité sanitaire suffisante présente selon **Renard (2014)** :

- un taux peu élevé de germes totaux : inférieur à 1000000 germes/ml;
- un taux de cellules somatiques acceptable : inférieur à 4000000 cellules/ml;
- une absence de résidus médicamenteux.

- **Qualité technologique :**

Cette qualité dépend de : la composition chimique (teneur en protéines, teneur en acide butyrique), la qualité bactériologique (la flore endogène) et de la capacité de transformation (**Cauty et Perreau, 2009**).

Par ailleurs, la présence d'antibiotiques dans le lait empêche ou ralentit la fermentation microbienne et se traduit par un lait de mauvaise qualité ou l'absence de sa coagulation à cause de la sensibilité des bactéries lactiques à de très faibles doses d'antibiotiques. En effet, la présence de résidus d'antibiotiques peut inhiber partiellement ou complètement la croissance de ces ferments et provoquer de nombreux défauts, notamment dans les fromages, yaourts et autres produits fermentés (**Broutin et al., 2005; Perrin-Guyomard et al., 2005; Zinedine et al., 2007**).

4. Microflore du lait :

Les microorganismes du lait sont répartis en deux grandes classes : la flore endogène ou originelle et la flore de contamination (**Vignola, 2002**).

4.1. Flore originelle :

Le lait contient peu de microorganismes, lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/ml). Les genres dominants sont essentiellement des mésophiles, il s'agit des microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation et n'ont aucun effet significatif sur la qualité du lait (**Vignola, 2002; Guiraud, 2003; Cuq, 2007**).

4.2. Flore de contamination :

Le lait peut se contaminer par des apports microbiens divers. Il en résulte que la nature de la flore microbienne du lait cru est à la fois complexe et variable d'un échantillon à l'autre et

suivant l'âge du lait. Cette flore est composée d'une flore d'altération et d'une flore pathogène.

a) Flore d'altération :

La flore d'altération se compose principalement des coliformes, des levures et des moisissures. Elle est responsable des défauts sensoriels (goût, arôme), et peut raccourcir la durée de conservation des produits laitiers (**Essalhi, 2002**).

b) Flore pathogène :

Les bactéries pathogènes pour l'homme peuvent être trouvées dans le lait cru, ou dans les produits laitiers. Elles sont capables de provoquer des maladies chez les consommateurs de ces produits. Les principaux microorganismes pathogènes associés aux produits laitiers sont : *Brucella*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* et certaines moisissures (**Vignola, 2002**).

II. Pathologies et antibiothérapie en élevage bovin :

1. Pathologies dominantes en élevage bovin:

1.1. Mammites

La mammite est une réponse inflammatoire de la glande mammaire d'origine infectieuse, traumatique ou toxique. Elle a une prévalence élevée chez les vaches laitières et est l'une des maladies les plus importantes dans l'industrie laitière. Si elle n'est pas traitée, elle peut entraîner une détérioration du bien-être et de la santé des vaches, de la production laitière et de la qualité du lait, et entraîner l'abattage ou même la mort des vaches affectées. Les principaux agents pathogènes de la mammite sont des bactéries, principalement *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (**Hanzen, 2010**).

On distingue deux types de mammites :

● **Les mammites cliniques :**

Elles sont caractérisées par des symptômes fonctionnels, représentés principalement par des changements visibles dans la quantité, la qualité et l'aspect du lait, on observe des symptômes inflammatoires localisés au niveau de la mamelle, douleur, chaleur, gonflement et symptômes généraux tels qu'une forte fièvre, une anorexie (**Gedilaghine, 2005**).

- **Les mammites subcliniques :**

Elles ne représentent aucun symptôme ni général, ni localisé, ni fonctionnel. Elles ne peuvent être diagnostiquées qu'à l'aide de tests complémentaires mettant en évidence une augmentation du nombre de cellules somatiques dans le lait ou la conductivité du lait. Les mammites subcliniques chez les vaches laitières sont souvent non détectées et donc non traitées pendant de longues périodes. (**Gedilaghine, 2005; Djuricic et al., 2014**).

1.2. Affections respiratoires:

Chez les bovins, les maladies respiratoires font référence à une gamme de troubles respiratoires qui peuvent entraîner des pertes économiques importantes dans les exploitations touchées. Ces pathologies sont causées par un certain nombre de facteurs agissant seuls ou en combinaison, affectant les voies respiratoires basses, c'est-à-dire les poumons (pneumonie) ou les voies respiratoires hautes (rhinite, bronchite). Les infections respiratoires se manifestent de différentes manières, selon l'âge de l'animal, le micro-organisme responsable et le stade de la maladie. Le traitement doit toujours cibler l'étiologie et les symptômes cliniques de la maladie, les antibiotiques, les antiparasitaires et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (**Andrews, 2000; Nicholas et Ayling, 2003**).

- **Les broncho-pneumonies infectieuses:**

La bronchopneumonie bovine est une maladie multifactorielle fréquente en élevage. Plusieurs facteurs entrent en jeu dont : les conditions de vie de l'animal, les défenses immunitaires, le stress. (**Catella, 2003**). Les broncho-pneumonies infectieuses regroupent les pasteurelloses et les infections par le virus respiratoire syncytial bovin (VRSB)

- **Les pasteurelloses primaires et les mycoplasmoses :**

Pasteurella est une bactérie commune pour les complications des syndromes grippaux, elle peut également exprimer sa pathogénicité sans intervention préalable du virus. Deux espèces peuvent être à l'origine des pasteurelloses primaires chez les bovins, l'une très fréquente et modérément pathogène : *Pasteurella multocida*, et l'autre moins fréquente mais hautement pathogène : *Pasteurella haemolytica*.

En plus des infections à *Pasteurella*, les infections à *Mycoplasma*, en particulier les infections à *Mycoplasma bovis*, coexistent parfois dans le même élevage. La mycoplasmosse est cliniquement indiscernable de la pasteurellose. Elles ont une évolution bénigne et sont souvent associées à d'autres maladies chroniques, arthrite, mammite... Toutes les catégories de bovins peuvent être infectées par *Pasteurella* ou *Mycoplasma* et présenter des affections primaires. Cependant, la pasteurellose et la mycoplasmosse sont plus fréquentes chez les jeunes bovines (**Catella, 2003; Boultif, 2015**)

➤ **Infection par le virus respiratoire syncytial :**

La plupart des ruminants peuvent être infectés par des souches du virus respiratoire syncytial (VRS). Le virus est appelé ainsi parce qu'il cause des lésions de bronchiolite nécrosante dues à des amas de cellules fusionnées (syncytia). La souche du VRSB qui infecte les bovins est un pneumovirus (Paramyxoviridae) et semble être spécifique (**Boultif, 2015**).

1.3. Métrites:

Il s'agit d'une inflammation de l'utérus, généralement causée par des infections bactériennes. Les métrites peuvent aller de simples infections subcliniques à une fièvre déclarée et à une réduction de la production de lait. Elles sont une cause importante d'infertilité chez les vaches laitières, causant directement ou indirectement des pertes économiques considérables. Il est donc important de les détecter et de les traiter précocement (**Loubnal, 2013**).

1.4. Dermatophilose:

C'est une maladie infectieuse contagieuse, due à une bactérie spécifique : *Dermatophila congolensis*. Dans les zones de fortes précipitations, elle se caractérise par une dermatite en croûte et une perte de poids chez les animaux (**Direl, 2005**).

2. Antibiothérapie en élevage bovin:

2.1. Définition des antibiotiques:

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique (champignons microscopiques et bactéries) ou synthétique qui peut détruire des micro-organismes ou inhiber leur multiplication.

Selon **Yala et al., (2001)**, les antibiotiques sont définis par leur :

- activité antibactérienne (spectre d'activité);
- toxicité sélective (mode d'action);
- absorption et diffusion dans l'organisme (pharmacocinétique).

2.2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont divisés en familles; la classification n'est pas tout à fait cohérente, car le point commun d'une classe d'antibiotiques peut parfois être chimique (bêta-lactamines, sulfamides, peptides, aminoglycosides, macrolides, fluoroquinolones), parfois des bactéries qui agissent contre eux (anti-tuberculeux, anti-staphylococcique). La notion de temps d'apparition peut être ajoutée par exemple : céphalosporines de 1^{ère} ou 2^{ème} génération.

La famille chimique se compose de plusieurs molécules qui ont des spectres d'action similaires, mais pas identiques, et ont des effets secondaires très similaires (**Le chat, 2007**).

2.3. Utilisation des antibiotiques en élevage bovin:

Les antibiotiques sont utilisés de quatre façons différentes, avec des objectifs variables.

a) Usage thérapeutique ou curatif :

L'objectif majeur dans ce cas est d'éviter la mortalité. Le traitement a également pour effet de réduire la souffrance et de rétablir la production (lait et viande). Il réduit l'excrétion de bactéries, permettant dans certains cas d'obtenir un traitement bactériostatique, et lors d'infections zoonotiques, il peut éviter la contamination humaine (**Mc Kellar, 2001**).

b) Métaphylaxie :

Lorsqu'une infection collective survient dans un élevage en grand nombre et se développe de manière aiguë, avec suffisamment d'éléments identiques présents pour incriminer une ou plusieurs bactéries, l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets exposés mais ne présentant pas de signes cliniques (sains ou en incubation) sont traités en même temps que ceux déjà malades. L'antibiothérapie permet ainsi de traiter les animaux exposés à une pression infectieuse pendant leur incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont strictement confidentielles (**Maillard, 2002**).

c) Antibio-prévention :

Ce traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Les antibiotiques peuvent être administrés à des périodes critiques de la vie sur des animaux soumis à un stress de contamination régulier et connu. Cette méthode d'utilisation des antibiotiques est adaptée à un état de santé spécifique et doit être temporaire et précise (**Chauvin *et al.*, 2006**).

d) Utilisation en tant qu'additifs dans l'alimentation animale :

L'usage des antibiotiques dans ce contexte est très limité actuellement. Les antibiotiques régulateurs de la flore (ARF) ou les antibiotiques promoteurs de croissance (AGP) sont utilisés à des doses très faibles, en vue d'améliorer la croissance des animaux par une régulation de la flore intestinale (**Chauvin *et al.*, 2006**).

2.4. Antibiotiques utilisés en élevage bovin :

Depuis les années 1940, les antibiotiques sont extrêmement utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Leur utilisation à des fins thérapeutiques a longtemps constitué un traitement efficace contre de nombreux microbes pathogènes. Cependant, une telle utilisation doit respecter certains critères (conditions et modalités d'administration, posologie, durée du traitement, etc.) (**Boultif, 2015**).

Tableau (2) : Principales molécules antibiotiques utilisées en buiatrie (Chatellet, 2007).

Famille	Sous-famille	Origine	Molécule (s)
Bêta-lactamines	Pénicillines	Naturelle	Pénicilline G
		Semi-synthétique	Oxacilline et Cloxacilline (Groupe M) Ampicilline et amoxicilline (groupe A)
	Céphalosporines	Naturelle ou Semi-synthétique	Céfalocone, cefalexine (1ère génération)
			Céfalonium (2ème génération)
			Céfopérazone, Ceftiofus (3ème génération)
			Cefquinome (4ème génération)
	Polypeptides		Naturelle
Bacitracine			
Aminosides		Naturelle ou semi-synthétique	Streptomycine, kanomycine, apramycine, gentamicine éomycine
			Spectinomycine
Macrolides		Naturelle ou semi-synthétique	Erythromycine, spiramycine, tylosine, timicosine
Tétracyclines		Naturelle ou semi-synthétique	Oxytétracycline, chlortétracycline
Phénicolés		Semi-synthétique	Florfénicol
Apparentés aux macrolides		Naturel	Lincomycine, clindamycine
Sulfamides		Synthétique	Sulfaguanidine, sulfadimidine Sulfadimidine
Quinolones		Synthétique	Acides nalidixique et oxolinique (1ère génération)
			Fluméquine (2ème génération)
			Enro-dano-marbro-difloxacin (3ème génération)

2.5. Antibiotiques interdits en élevage bovin :

Le chloramphénicol est un antibiotique très toxique, responsable d'anémie aplasique chez l'homme (liée à son utilisation en médecine humaine). L'utilisation vétérinaire de cette molécule est interdite un peu partout dans le monde ainsi que les nitrofuranes. Toutes les molécules utilisées aussi en médecine humaine ont été interdites en alimentation animale sous forme d'ARF : c'est le cas de la spiramycine, la bacitracine, la tylosine, la virginiamycine (Laval, 2003; Guy *et al.*, 2004; Châtaigner et Stevens, 2005; Fabre *et al.*, 2006).

2.6. Pharmacocinétique des antibiotiques chez la vache laitière :

La pharmacocinétique est l'étude du devenir du médicament dans l'organisme. Les quatre phases de la pharmacocinétique sont regroupées sous le sigle ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination (Puyt, 2002).

a) Absorption :

L'absorption d'antibiotique ou son passage à la circulation sanguine, dépend à la fois des propriétés de la molécule et des modalités d'administration notamment de la voie (orale et parentérale) et de la formulation du médicament donc dans certaines classes d'antibiotiques (bêta-lactamines) certaines molécules sont bien absorbées, par la voie orale alors que d'autres doivent être injectées (Jacquemin, 2006; Anonyme b, 2006).

b) Distribution :

Après absorption, l'antibiotique est réparti dans le corps, principalement par le sang, et va adhérer à différents organes et tissus selon différents critères liés à la substance considérée et à l'organe en cause. Enfin, deux parties de la substance active sont observées dans le sang, une partie libre et une partie liée aux protéines plasmatiques. La partie qui diffuse dans les organes et les tissus correspond à la partie libre et on observe alors la fixation des tissus. Les principes actifs avec une liaison tissulaire plus forte laissent généralement le plus de résidus (Le chat, 2007; Stoltz, 2008).

c) Métabolisme :

A cause de la richesse des hépatocytes en enzymes impliquées dans le métabolisme, le foie est le site principal de biotransformation. Cette étape détermine en grande partie la persistance des substances médicamenteuses dans l'organisme des animaux traités et dans les aliments dérivés de ces animaux. (Loichot et Grima, 2004; Stoltz b, 2008).

d) Elimination :

L'élimination se fait de différentes voies :

- par voie rénale;
- par voie biliaire;
- par élimination lactée dans le lait.

Le mécanisme de passage du sang vers le lait correspond à la traversée de l'épithélium de la glande mammaire qui se comporte comme une membrane lipoprotéique séparant le sang (pH 7,4) du lait (pH 6,6). Après administration parentérale, les substances faiblement basiques diffusent plus facilement dans le lait que les substances faiblement acides, qui ont tendance à se localiser dans le plasma. La taille moléculaire joue également un rôle, les composés ayant des poids moléculaires inférieurs à 800-1000 Daltons diffusant mieux que les autres. Ainsi, les substances qui passent dans le lait en proportion importante sont celles qui ont une fixation tissulaire prépondérante et un caractère de base faible : tétracycline, macrolides. Les substances lipophiles diffusent également bien dans le lait et restent fixées sur les lipides du lait. (Stoltz a, 2008).

III. Résidus d'antibiotiques :**1. Définition :**

Les résidus d'antibiotiques consistent en tous principes actifs ou leurs métabolites qui subsistent dans les aliments comme les viandes ou autres denrées alimentaires provenant de l'animal auquel le médicament en question a été administré. Selon le règlement du parlement européen (470/2009): un résidu d'antibiotique correspond à toute substance pharmacologiquement active, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après l'administration de médicaments (Mensah *et al.*, 2014; Kebir, 2016).

2. Causes de contamination du lait par les résidus d'antibiotiques :

La contamination du lait par les résidus d'antibiotiques peut être due, selon **Abidi (2004)**, à de nombreuses erreurs commises par l'éleveur :

- mélange accidentel du lait d'une vache traitée avec celui des autres vaches;
- non-respect du délai d'attente (manque de communication entre le vétérinaire et les éleveurs et le travail bénévole de la part de l'éleveur);
- défaut de nettoyage et de désinfection de la machine à traire après la traite des vaches traitées par les antibiotiques ;
- anciens traitements non vérifiés sur des vaches en lactation récemment achetées ;
- mélange accidentel d'aliments médicamenteux avec des rations pour vaches laitières.
- L'absence d'identité animale cause des problèmes dans le cas de grands troupeaux car cette identité contient toutes les informations de la vache plus les traitements effectués ce qui permet aux trayeurs de distinguer les vaches traitées des non traitées.

Selon **Gedilaghine (2005)**, le mauvais usage du médicament peut également être responsable de cette contamination :

- non-respect de la voie d'administration;
- non-respect de la dose (une grande dose conduit à une longue durée d'élimination du médicament);
- utilisation d'une formule destinée aux vaches tarées dans le traitement d'une vache en lactation.

Aussi, dans le cas d'une mauvaise hygiène lors de la traite, le lait peut être contaminé par des matières fécales contenant des antibiotiques excrétés par le système digestif (**Labie, 1981**).

3. Problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait :**3.1. Problèmes sanitaires :**

Les risques pour la santé publique associés à la présence de résidus d'antibiotiques dans les aliments comprennent: le risque d'allergie, le risque de toxicité directe, le risque cancérigène, le risque de maladie associé à une altération de la flore gastro-intestinale, le risque d'apparition de sélection et le risque de la résistance bactérienne aux antibiotiques (**Reig et Toldra, 2008**).

3.1.1. Risque d'allergie :

Les résidus d'antibiotiques dans les aliments sont parfois impliqués dans l'allergie humaine. En effet, ils associent plusieurs conditions pouvant conduire à des manifestations de type allergique : faibles concentrations, administration orale, exposition occasionnelle et discontinue. Les familles d'antibiotiques fréquemment incriminées sont : les β -lactamines, les tétracyclines, les quinolones, les macrolides et les sulfamides. Les composants actifs des médicaments ainsi que les molécules de faible poids moléculaire (haptènes) peuvent se lier de manière irréversible à des macromolécules, généralement des protéines, appelées molécules porteuses, et former alors des complexes immunogènes et allergiques. (**Demoly *et al.*, 2000; Khattab *et al.*, 2010**).

3.1.2. Risque de toxicité :

Cette toxicité ne s'exprime qu'après consommation répétée d'aliments contenant les mêmes résidus d'antibiotique mais la toxicité directe des antibiotiques est généralement limitée. Le chloramphénicol présente une toxicité potentielle qui se manifeste par une anémie aplasique chez l'homme. Les nitrofuranes sont soupçonnés d'être fœtotoxiques et certains sulfamides ont une toxicité fœtale à fortes doses. Ces molécules passent dans le lait maternel et sont toxiques pour les nourrissons de moins d'un mois. Ils ont des effets secondaires sur le matériel génétique, la fertilité et une toxicité pour le système nerveux et immunitaire (**Châtaigner et Stevens, 2005; Gysi, 2006**).

3.1.3. Risque cancérigène :

Certains antibiotiques ont des caractéristiques cancérigènes connues. Les résidus de ces antibiotiques peuvent avoir des effets cancérigènes à long terme après une consommation régulière d'aliments contenant ces résidus. L'utilisation de ces antibiotiques chez les animaux de rente est alors interdite. Les nitrofuranes, par exemple sont des molécules cancérigènes génotoxiques bien connues. Des expérimentations animales ont montré que leur utilisation à long terme peut entraîner des modifications du matériel génétique et l'apparition de tumeurs. (**Stoltz, 2008**)

3.1.4. Risques bactériologiques :

Les risques bactériologiques liés à la consommation d'aliments contenant des résidus d'antibiotiques peuvent être attribués à deux phénomènes : les altérations de la flore digestive pouvant entraîner des maladies et des symptômes indésirables, et la sélection de souches pathogènes chez l'homme résistantes à ces antibiotiques (**Boultif, 2014**).

a) Modification de la flore digestive du consommateur :

L'activité des résidus d'antibiotiques peut entraîner la mort de certaines bactéries ou réduire leur capacité à proliférer dans l'intestin : vitesse de croissance réduite, affinité réduite pour les substrats nutritifs ou adhésion réduite. Les attaques de certaines populations bactériennes faisant partie de la flore normale conduisent au développement d'autres populations bactériennes qui peuvent être pathogènes ou opportunistes. Ce phénomène est appelé « abaissement de la barrière microbienne » ou « abaissement de la résistance à la colonisation ». Ainsi, l'effet barrière est défini comme l'antagonisme de la microflore contre certaines bactéries, notamment celles de l'extérieur (**Perrin-Guyomard et al., 2005**).

b) Risque de résistance bactérienne aux antibiotiques :

Une bactérie est estimée comme résistante lorsqu'elle peut se développer au contact d'une teneur en antibiotique 8 à 10 fois supérieur à la concentration minimale inhibitrice moyenne de son espèce. L'émergence rapide de l'antibiorésistance est un problème pour la santé publique. Les données de la surveillance montre qu'il y'a une augmentation des infections causées par les bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques dans plusieurs pays. L'apparition de cette résistance peut être liée à des mauvaises pratiques thérapeutiques (posologie inadaptée, fréquence d'administration, non-respect de la prescription), ou à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance qui favorisant ainsi le développement rapide de cette phénomène (**Enriquez, 2002; Châtaigner et Stevens, 2005; Fabre et al., 2006; EFSA, 2007**).

En ce qui concerne les résidus d'antibiotiques présents dans les produits alimentaires d'origine animale comme le lait, ils pourraient entraîner une sélection des souches bactériennes résistantes dans le tractus gastro-intestinal des consommateurs (**Cerniglia et Kotarski, 2005**). La pression de sélection favorise l'augmentation du nombre de micro-

organismes résistants, que cette résistance soit naturelle ou acquise, et que ces micro-organismes soient pathogènes ou non.

3.2. Problèmes technologiques :

Les résidus d'antibiotiques sont un véritable problème pour les industriels du lait en raison de leurs conséquences néfastes sur la fermentation lactique. La présence de ces résidus inhibe partiellement ou totalement la croissance des ferments lactiques sensibles aux très faibles doses d'antibiotiques et entraîne de nombreux accidents de fabrication tels que des défauts de coagulation du lait, un égouttage insuffisant et des risques de prolifération incontrôlée de germes gazogènes, insensibles aux antibiotiques comme les coliformes (**Fabre et Joyes, 2000; Brouillet, 2002; Abidi, 2004; Boultif, 2014**).

4. Réglementation concernant les résidus d'antibiotiques :

4.1. Limites maximales des résidus :

4.1.1. Définition :

La limite maximale des résidus (LMR) correspond à la concentration maximale en résidus, produite en l'utilisation d'un médicament vétérinaire considérée comme sans risque sanitaire pour le consommateur et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les aliments. Elle est exprimée en parties par million (ppm) ou en parties par milliard (ppb) (**Mitchell, 2005; Fabre et al., 2006**).

Les valeurs des LMR correspondant à chaque famille d'antibiotiques sont présentées en *Annexe (1)*.

4.1.2. Réglementation « la législation algérienne » :

La législation algérienne dans l'article 6 de l'arrêté interministériel du 18 août 1993 portant spécification et présentation de certains laits de consommation (ministère de l'économie, de l'agriculture et de la santé et de la population) fait référence au lait propre à la consommation humaine dans sa définition qu'il ne doit pas contenir de résidus d'antibiotiques, mais les LMR ne sont pas clairement définies. (**Boultif, 2014**).

4.2. Délai d'attente :

Le délai d'attente est défini comme le temps écoulé depuis la dernière fois qu'un antibiotique a été administré à un animal jusqu'à ce qu'il ne présente plus de résidu dans ses tissus ou ses produits (lait, œufs). Le temps minimum requis entre le dernier traitement médicamenteux recommandé et l'abattage ou la collecte des aliments, est établi pour le régime de traitement très précis : espèce animale concernée, dose, débit d'administration, voie d'administration, durée de traitement, etc., Le respect de ce délai d'attente permet de commercialiser les produits alimentaires à des concentrations inférieures ou proches des LMR pour assurer la protection de la santé des consommateurs.

Les périodes d'attente ont été calculées sur la base des résultats des études pharmacocinétiques de déplétion des résidus, recommandée par les lignes directrices chez un nombre suffisant d'animaux. Initialement, le temps d'attente est exprimé en nombre de traites à éliminer avant que le lait ne soit sur le marché. Actuellement, les temps d'attente sont exprimés en multiples de 12 heures et donc en heures ou éventuellement en jours, compte tenu des différents types de traite rencontrés. Le temps d'attente a été enregistré comme "zéro" lorsque le lait n'avait pas besoin d'être exclu après le traitement (**Moulin, 1999; Laurentie et Sanders, 2002; Anonyme c, 2003; Puyt, 2003; Ryckaertl, 2003; Abidi, 2004; Châtaigner et Stevens, 2005**) (**Mitchell, 2005; Fabre *et al.*, 2006; Guillemot, 2006; Follet, 2007**).

Chapitre 02 :

Matériel et méthodes

1. Cadre de l'étude :

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie, département de biologie appliquée, université Larbi Tébessi Tébessa, durant la période allant du 2/01/2022 jusqu'au 15/03/2022.

2. Objectif :

La présence des résidus d'antibiotiques dans le lait cru pose de multiples risques d'ordre sanitaire pour le consommateur, en plus des problèmes technologiques en industrie laitière. De ce fait, l'objectif de cette étude est de rechercher les résidus d'antibiotiques dans des échantillons de lait cru collectés dans la région de Tébessa. Pour se faire, une méthode microbiologique (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009**) basée sur l'inhibition de la croissance des bactéries sensibles aux antibiotiques a été mise en œuvre.

3. Matériel :

3.1. Echantillons du lait cru :

Cette étude a porté sur 120 échantillons de lait cru dont 70 échantillons du lait commercialisé et 50 échantillons de lait collectés, au fur et à mesure, à différentes fermes, pendant environ deux mois et demi (**Tableau 03**).

Tableau (3) : Plan d'échantillonnage

Nature de lait cru	Lieu de prélèvement	Code attribué	Nombre des échantillons	Total
Lait collecté à la ferme	Ferme Salah (vache 1)	FSV1	10	50
	Ferme Badri (vache 1)	FBV1	8	
	Ferme Redouane (vache 1)	FRV1	8	
	Ferme Amor (vache 1)	FAV1	8	
	Ferme Amor (vache 2)	FAV2	8	
	Ferme Amor (vache 3)	FAV3	8	
Lait commercialisé	Crémerie 01 Hammamet	1	10	70
	Crémerie 02 Hammamet	2	9	
	Point de vente 01 route d'Annaba	3	11	
	Crémerie 02 route d'Annaba (2)	4	11	
	Crémerie El hofra	5	11	
	Crémerie Route de El Kouif	6	6	
	Crémerie 01 Centre-ville Tébessa	7	6	
	Crémerie 02 Centre-ville Tébessa	8	6	
Total	/			120

3.2. Souche bactérienne

Une souche de référence de *Bacillus subtilis* Cip 5262 sensible aux antibiotiques a été utilisée dans le test de détection des résidus d'antibiotiques. Elle a été fournie par Dr Menasria Taha, enseignant à l'université de Tébessa.

3.3. Matériel et verreries

Le matériel, les instruments et les verreries utilisés sont répertoriés en *Annexe (2)*. Il faut noter que toutes les verreries doivent être stérilisées à 180°C pendant 30 minutes à chaque utilisation pour éviter tout effet inhibiteur résiduel.

3.4. Milieux de culture et autres produits

Les milieux de culture utilisés dans ce travail sont :

- Bouillon Nutritif (BN)
- Gélose Mueller Hinton (MH)
- Gélose Plat Count Agar (PCA)

La composition et la méthode de préparation de ces milieux sont détaillées en *Annexe (3)*.

En plus des milieux de culture, d'autres produits sont utilisés :

- Chlorure de baryum (Ba Cl₂)
- Acide sulfurique (H₂SO₄)
- Chlorure de sodium (Na Cl)
- Disques d'antibiotiques : Tétracycline (30UI)

4. Méthodes :

4.1. Prélèvement des échantillons :

a) Prélèvement du lait commercialisé :

70 échantillons de 500 ml de lait commercialisé sont prélevés aseptiquement dans des flacons stériles bien identifiés et transportés dans une glacière dans un délai qui ne dépasse pas 2 heures. Ils sont directement conservés au congélateur à -20°C. Ces échantillons sont prélevés à partir de 7 crémeries différentes (**tableau 3**) et un seul point de vente, sur une période de plus de deux mois.

b) Prélèvement de lait de ferme

50 échantillons du lait cru sont collectés à partir de quatre fermes situées à El Ma Labiodh (**Figure 1**). Ils sont recueillis des vaches déclarées saines par l'éleveur et n'ayant subi aucun traitement antibiotique.

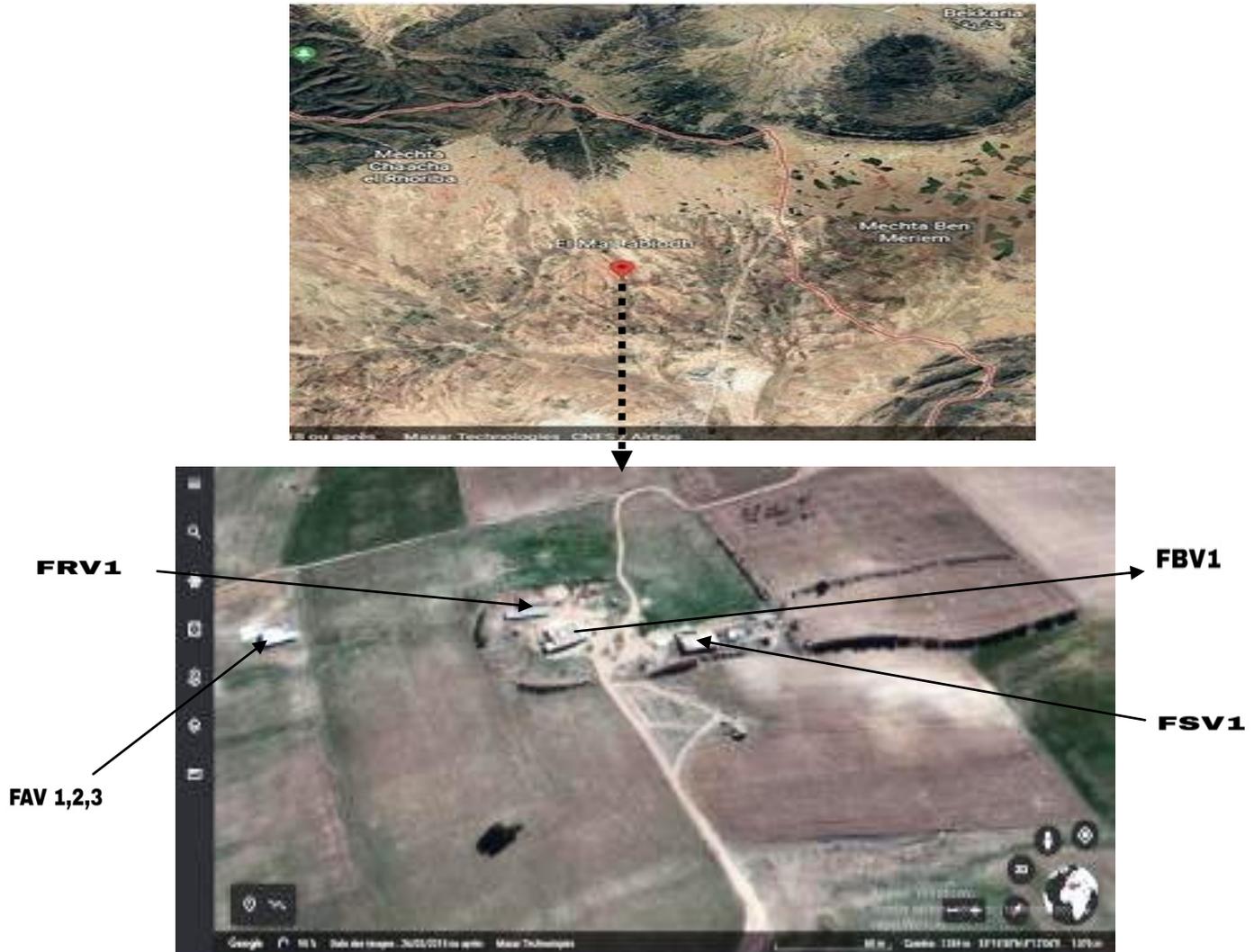


Figure (1): Localisation des fermes (Google Earth)

Avant de prélever, on doit d'abord laver et sécher la mamelle et désinfecter les trayons. On élimine ensuite le premier jet de lait et on prélève un volume de 2 fois 40 ml du lait, qui est recueilli dans un flacon stérile. Le lait ainsi recueilli correspond au mélange provenant des quatre quartiers de la mamelle. Les échantillons de lait cru sont collectés dans des flacons clairement étiquetés et identifiés (**figure 2**) puis transportés dans une glacière et conservés au congélateur à -20°C dans les 2 heures suivant leur prélèvement. Aucune rupture de la chaîne du froid ne doit pas être produite au cours de la période d'étude (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009**).



Figure (2) : Echantillons de lait cru

4.2. Méthode de recherche des résidus d'antibiotiques :

La recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru est réalisée selon la méthode officielle européenne de détection des résidus d'antibiotiques dans le lait (*décision de la commission 91/180/CEE de 14 Février 1991*) et appliquée dans la communauté européenne depuis le 1 Janvier 2002 (*Décision européenne 91/180/CEE ; Règlement CE N°1664/ 2006*). Cette méthode est basée sur l'inhibition de la croissance de bactéries tests sensibles aux antibiotiques.

Selon le même principe de la méthode officielle, nous avons suivi la méthode décrite par (**Ben-Mahdi et Ouslimani 2009**), utilisant deux bactéries tests : *Bacillus subtilis* sensible aux aminosides, aux quinolones et aux macrolides, et *Geobacillus stearothermophilus* sensible aux bêta-lactamines, aux sulfamides et aux tétracyclines.

Remarque : il faut noter que dans le présent travail, seulement *Bacillus subtilis* est utilisé, l'autre bactérie test n'est pas disponible.

a) Revivification de la souche :

La souche de référence *Bacillus subtilis* Cip 5262 est enrichie dans 5 ml de bouillon nutritif et incubée à 30°C pendant 24 h. Après incubation, un ensemencement par stries, à partir de la suspension, est réalisé sur gélose PCA (par manque de la gélose nutritive au niveau du laboratoire). Après 24 h d'incubation, on vérifie la pureté de la souche par coloration de Gram.



Figure (3) : Observation microscopique de *Bacillus subtilis* Cip 5262 après coloration de Gram

b) Préparation de l'étalon de turbidité Mc Farland 0.5 :

Les suspensions bactériennes utilisées dans le test de détection des résidus d'antibiotiques sont ajustées par comparaison à l'étalon de turbidité Mc Farland 0.5 préparé selon les recommandations de **CA-SFM (2020)** décrites comme suit :

- On ajoute 0,5 mL d'une solution à 0,048 mol/L de BaCl_2 (1.175% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 99,5 mL d'une solution 0,18 mol/L (0.36 N) de H_2SO_4 (1% v/v) et on agite vigoureusement.
- On vérifie la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre avec un faisceau de 1 cm et cuvettes assorties. L'absorbance à 625 nm doit être comprise entre 0,08 to 0,13 (**Figure 4**).



Figure (4): Ajustement de la densité de l'étalon de turbidité McFarland 0.5

- On distribue la suspension ainsi ajustée dans des tubes de même taille que ceux utilisés pour ajuster l'inoculum. On scelle les tubes.
- Une fois scellés, on conserve ces tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Avant usage, on mélange vigoureusement le tube à l'aide d'un vortex.

Remarque : Renouveler l'étalon ou vérifier son absorbance après 6 mois de conservation.

c) Standardisation de l'inoculum :

Prélever deux à trois colonies d'une culture pure jeune et les homogénéiser dans de l'eau physiologique stérile (NaCl 9 g/L d'eau). Ajuster la suspension bactérienne par comparaison à l'étalon de turbidité précédemment préparé.



Figure (5) : Préparation de la suspension bactérienne

d) Ensemencement sur gélose Mueller Hinton :

- Fondre la gélose Mueller Hinton (MH) à 100°C et la refroidir à 55°C.
- Couler MH dans les boîtes de Pétri et laisser se solidifier.
- A l'aide d'un écouvillon, ensemercer la surface de MH par la suspension de *Bacillus subtilis* (préalablement ajustée) selon la méthode de l'antibiogramme : on plonge un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et on l'égoutte sur les parois du tube pour éliminer l'excès de la suspension; on écouvillonne sur la totalité de la surface du milieu MH dans trois directions avec des stries serrées.
- Laisser les boîtes sur paillasse pendant 15 minutes pour séchage.

e) Préparation des échantillons du lait :

Avant d'être testés, tous les échantillons sont chauffés à 80°C pendant 10 minutes afin d'inactiver toutes les substances inhibitrices (comme le lysozyme) naturellement présentes dans le lait qui peuvent fausser les résultats.

- Décongeler et homogénéiser les échantillons du lait.
- Mettre 10 ml de chaque échantillon dans un tube à essai stérile.
- Numérotter et identifier les tubes.

- Placer les tubes dans un bain marie réglé à 80°C pendant 10min, le niveau de lait étant au moins à 2 cm au-dessous de celui de l'eau.
- Refroidir les tubes à la température ambiante.



Figure (6) : Traitement thermique des échantillons du lait

f) Préparation des disques

Des disques de 6 mm du papier Wattman (découpés à l'emporte-pièce) sont stérilisés à l'autoclave dans un flacon, puis ils sont imprégnés aseptiquement avec 20 μ L des échantillons de lait à l'aide d'une micropipette.

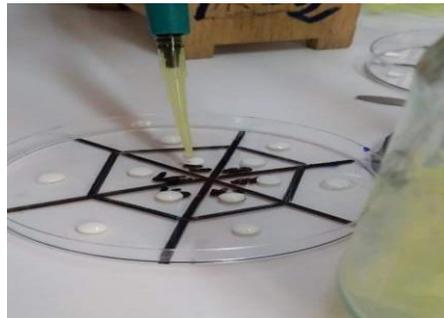


Figure (7): Imprégnation des disques par le lait

g) Application des disques et incubation

Six disques correspondant à 6 échantillons de lait cru sont déposés sur gélose MH à l'aide d'une pince flambée. Ils sont disposés en cercle à 1cm de la périphérie de la boîte. En plus, un disque d'antibiotique témoin est placé au centre de la boîte. L'antibiotique utilisé est la tétracycline (30UI). Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h.

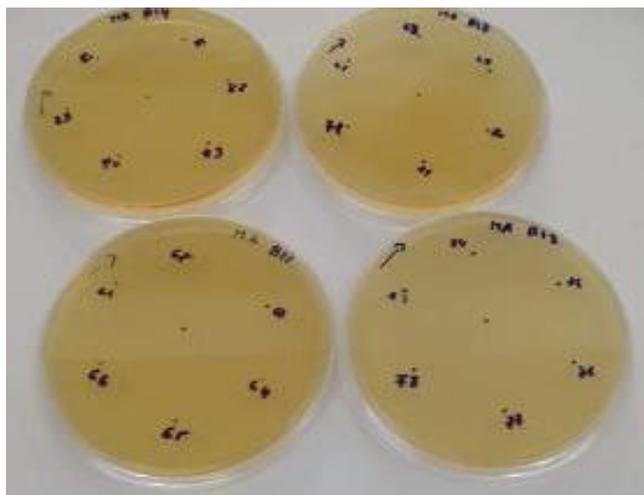


Figure (8) : Plan de disposition des disques

h) Lecture des résultats

Après incubation, vérifier la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des disques. Utiliser un pied à coulisse pour mesurer le diamètre de la zone d'inhibition. Les échantillons de lait qui produisent une zone d'inhibition d'au moins 10 mm de diamètre sont considérés comme positifs, c'est-à-dire qu'ils contiennent des résidus d'antibiotiques (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009**).

Les différentes familles d'antibiotiques détectées par inhibition de *Bacillus subtilis* sont données dans **le tableau (4)**

Tableau (4) : Familles d'antibiotiques détectées par *B.subtilis* (**Titouche et al., 2013**)

Microorganisme test	Familles d'antibiotiques détectés	Antibiotiques
<i>B. subtilis</i>	Macrolides	Erythromycine Spiramycine
	Aminosides	Streptomycine

Chapitre 03 :

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Origine des échantillons prélevés

Au cours de la période d'étude, on a pu collecter 120 échantillons du lait cru (**Tableau 5**) dont la plupart (58,33%) sont des échantillons du lait commercialisé, vu la faculté de prélèvement par rapport au lait de ferme qui doit être recueilli des vaches déclarées saines par l'éleveur et n'ayant subi aucun traitement antibiotique depuis au moins un mois.

Tableau (5) : Répartition des échantillons du lait en fonction de leur origine

Origine du lait	Nombre des échantillons (%)	Total
Lait commercialisé	70 (58,33%)	120
Lait de ferme	50 (41,67%)	

1.2. Résultats de la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait

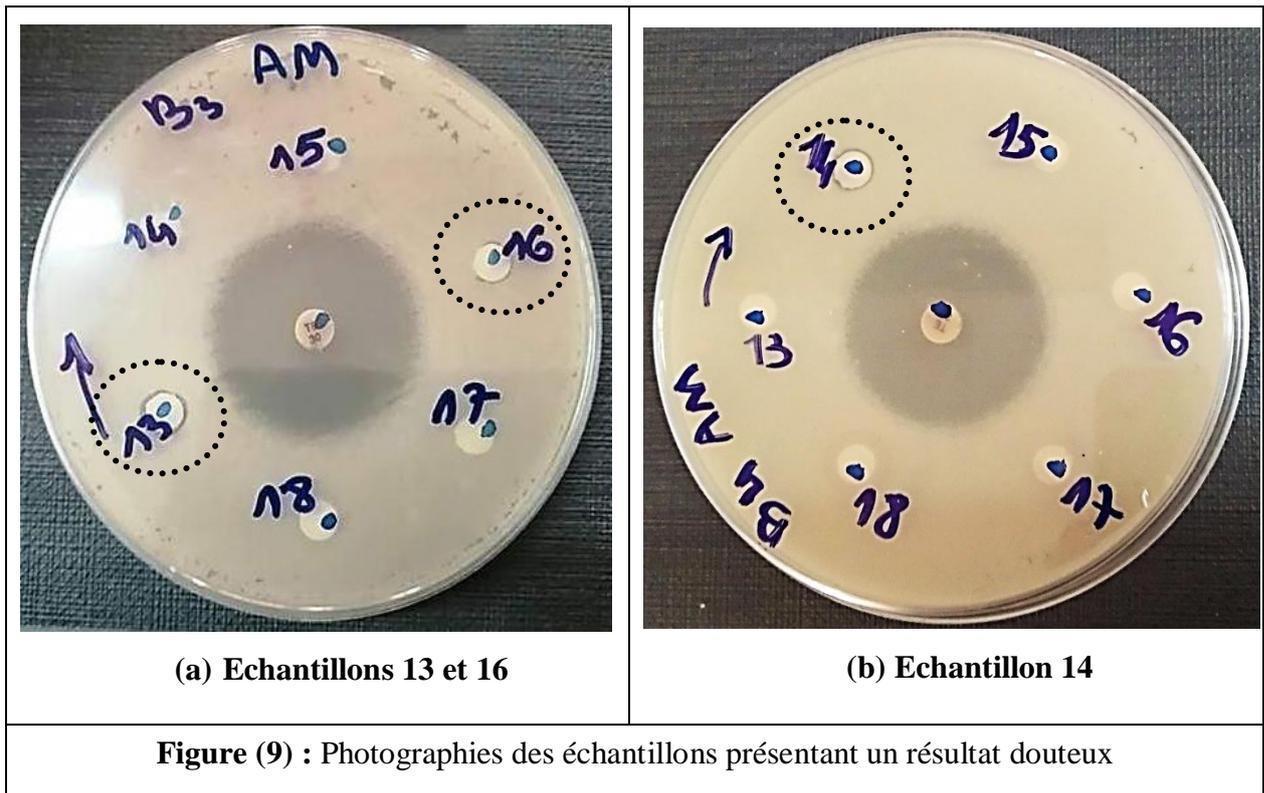
Dans le test d'inhibition sur gélose, on a seulement utilisé la bactérie test *Bacillus subtilis*. Donc les familles d'antibiotiques détectées par cette bactérie sont les macrolides et/ou les aminosides (**Titouche et al., 2013**).

Les résultats du test d'inhibition microbienne (**tableau 6**) ont montré qu'aucun échantillon n'a été positif, c.-à-d. aucun échantillon n'a présenté une zone d'inhibition d'au moins 10 mm de diamètre. Néanmoins, 3 échantillons du lait cru commercialisé ont présenté un résultat douteux (une légère zone d'inhibition). Les 117 échantillons restants ont donné un résultat négatif, soit un pourcentage de 97,50 %.

Tableau(6) : Résultats de test d'inhibition microbienne

Type de lait	Nombre des échantillons	Résultat		
		Négatif (%)	Positif (%)	Douteux (%)
Lait commercialisé	70	67 (95,71%)	0 (0%)	3 (4,29%)
Lait de ferme	50	50 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Total	120	117 (97,50%)	0 (0%)	3 (2,5%)

Les trois échantillons ayant donné un résultat douteux sont : l'échantillon 13, l'échantillon 14 et l'échantillon 16, qui ont présenté une zone d'inhibition de 6,5 mm de diamètre (**Figure 9**)



2. Discussion :

Les médicaments vétérinaires sont largement utilisés dans le secteur de l'élevage pour lutter contre les maladies et améliorer les performances des animaux (Mensah *et al.*, 2014). Cependant, la présence des antibiotiques dans les produits alimentaires d'origine animale comme le lait peut entraîner des risques sanitaires pour le consommateur. En Algérie, le décret n°39 du 02 juillet 2017 fixe les critères microbiologiques applicables aux denrées et exige l'absence totale de résidus d'antibiotiques dans un millilitre de lait cru (Ouslimani, 2008).

L'objectif de cette étude a été la recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait cru dans la région de Tébessa. Pour ce faire, 120 échantillons de lait cru ont été analysés par la méthode de diffusion sur gélose en utilisant *Bacillus subtilis* comme bactérie test.

L'analyse des échantillons prélevés, n'a révélé aucun échantillon positif aux résidus d'antibiotiques recherchés. Les résultats ont montré que 97,50 % des échantillons sont négatifs, c.-à-d. ne contenant pas des macrolides et/ou des aminosides.

Un taux très élevé des échantillons négatifs ne signifie pas nécessairement que le lait cru est salubre. D'une part, si on parle seulement des aminosides et macrolides, le lait peut

contenir des résidus de ces antibiotiques à des concentrations inférieures à la limite de détection de ce test microbiologique par rapport à la limite maximale de résidus car ces méthodes de dépistage présentent le plus souvent des limites de détection trop élevées par rapport aux LMR pour certaines familles d'antibiotiques comme les bêta-lactamines. D'autre part, si on parle des résidus d'autres antibiotiques comme les tétracyclines, pénicillines et sulfamides, ils sont non exprimés dans notre travail à cause de la sensibilité spécifique de souche test utilisée (**Ouslimani, 2008; Gaudin, 2016**).

Parmi les 120 échantillons de lait testés, 3 échantillons ont présenté un résultat douteux avec une zone d'inhibition inférieur à 10 mm. Donc, ils nécessitent une épreuve de confirmation pour s'assurer de la présence ou non des résidus d'antibiotiques. Ceci étant donné que le test d'inhibition sur gélose reste un test qualitatif qui peut être utile pour le screening des échantillons pouvant contenir des résidus d'antibiotiques.

Les résultats obtenus dans notre étude diffèrent de ceux rapportés dans d'autres études réalisées dans le même contexte. (**Lebres et Mouffok, 1989**) ont noté que 25% des échantillons du lait de ferme étaient positifs en utilisant la méthode officielle de recherche des résidus d'antibiotiques. Dans une autre étude (**Ben-Mahdi et Ouslimani, 2009**) réalisée sur 760 échantillons de lait collectés sur les deux wilayas d'Alger et de Boumerdes, 9,86 % des échantillons étaient positifs. Par ailleurs, une étude faite au Niger par (**Siousarran, 2003**) a rapporté un taux élevé de positivité (67 %) dans des produits laitiers (yaourt). Dans une étude tunisienne (**Ouertani, 2003**), un taux de positivité de 40% dans le lait de collecte a été rapporté, sachant que l'analyse a été réalisée au moyen de Delvotest SP (test commercialisé).

La présente étude ne permet pas de faire des constations en ce qui concerne l'application rigoureuse de l'antibiothérapie par les éleveurs. Ainsi, on ne peut pas conclure que le protocole de traitement par antibiotiques (nombre, dose, voie d'administration et durée) est respecté et que le délai d'attente de chaque traitement utilisé est connu par l'éleveur.

En plus, on ne peut pas affirmer l'absence des résidus d'antibiotiques des autres familles (tétracyclines, pénicillines ou sulfamides) car on a seulement utilisé *Bacillus subtilis* comme microorganisme test.

Enfin, la technique microbiologique est une technique simple et peu coûteuse par rapport aux techniques immunologiques et la chromatographie, et sa mise en œuvre peut être généralisée dans le cadre du bilan laitier algérien quelles que soient ses limites.

La présence des résidus d'antibiotiques dans le lait cru restera toujours une menace à la santé du consommateur et pose des problèmes en industrie alimentaire. De ce fait, pour s'assurer de la salubrité du lait des résidus d'antibiotiques, nous recommandons les procédures suivantes :

Au niveau des élevages :

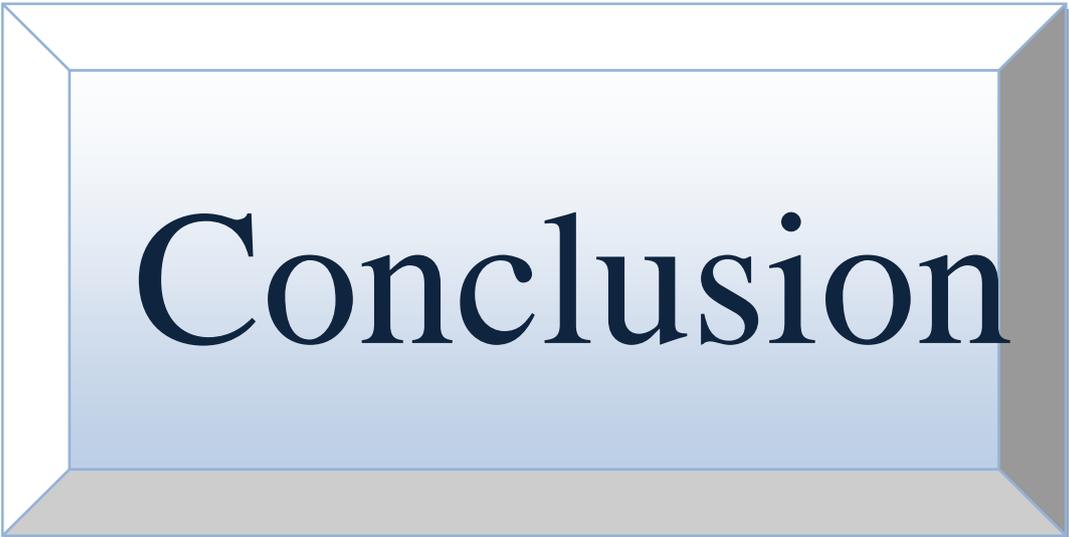
- L'identification des vaches qui ont été traitées à l'aide des marqueurs de bétails.
- Les éleveurs doivent connaître et respecter toutes les informations relatives au traitement des vaches notamment le délai d'attente.
- L'amélioration des conditions d'élevage et la ration alimentaire quantitativement et qualitativement afin de prévenir des pathologies bovines.

Au niveau du vétérinaire :

- Sensibiliser les éleveurs sur les risques relatifs aux mauvaises pratiques de l'antibiothérapie.
- Sensibiliser les consommateurs pour éviter l'achat du lait cru et des fromages frais des crèmeries inconnues et en bordure de route.

Au niveau d'industrie agro-alimentaire :

- Utilisation de plusieurs tests indicateurs pour assurer une détection complète des résidus d'antibiotiques présents dans le lait.
- Les laits d'industrie déclarés positifs doivent être rejetés impérativement et interdit à la vente aux crèmeries.



Conclusion

Conclusion

Les médicaments vétérinaires, notamment les antibiotiques constituent des outils indispensables à la gestion sanitaire et à la rentabilité des élevages. Ils aident à prévenir ou pour traiter un grand nombre de maladies infectieuses. Ces antibiotiques peuvent être trouvés comme résidus dans le lait et les produits laitiers de vaches traitées et causent ainsi des risques sanitaires graves pour le consommateur et des problèmes technologiques importants en industrie agro-alimentaire. Une recherche systématique des résidus d'antibiotiques dans les échantillons de lait reste la seule mesure préventive pour s'assurer que le produit est totalement inoffensif. Pour cela, des méthodes de détection fiables, sensibles et spécifiques sont nécessaires.

Dans cette optique, notre travail avait comme objectif de rechercher des résidus d'antibiotiques dans le lait cru. La méthode d'inhibition microbienne par diffusion sur gélose en utilisant la bactérie test *Bacillus subtilis*, nous a donné des résultats négatifs. Donc, on pourrait au moins déduire l'absence des résidus des macrolides et/ ou des aminosides dans les échantillons analysés.

Notre étude est préliminaire et les résultats obtenus reflètent la nécessité de l'utilisation des autres bactéries test pour détecter les résidus d'autres familles d'antibiotiques ou bien l'usage d'un test de confirmation plus précis ainsi que l'augmentation du nombre des échantillons.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abidi. K (2004). Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson. Thèse : Médecine vétérinaire École nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie, p. 6-23.
- Aboutayab. R (2009). Technologie du lait et dérivés laitiers. Consulté le 08 mars 2022. <http://www.azaquar.com>
- Amiot. J, Fournier. S, Lebeuf. Y,P et Simpson R (2002). Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique du lait In VIGNOLA, C.L. Science et technologie du lait - Transformation du lait, Ecole polytechnique de Montréal, p600.
- Andrews. AH (2000). Les maladies respiratoires des bovins. <https://www.zoetis.fr/pathologies/bovins/maladies-respiratoires.aspx>.
(Page consultée le 28 Mars 2022).

B

- Ben Mahdi. M, Ouslimani, S (2009). Mise en évidence des résidus d'antibiotiques dans le lait de vache produit dans l'Algérois. *European Journal of Scientific Research* (3), 357-362.
- Boultif. L (2014). Détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (hplc)-optimisation des paramètres d'analyse - adaptation des méthodes d'extraction des molécules d'antibiotiques- comparaison de quelques résultats obtenus sur le lait de la région de Constantine et le lait importé (reconstitué). Thèse de Doctorat d'état, Université Mentouri, Constantine, 35- 90p.

- Boultif. L (2015). Détection et quantification des résidus de terramycine et de pénicilline dans le lait de vache par chromatographie liquide haute performance (HPLC), thèse de Doctorat: Université Mentouri Constantine, Algérie, 156.
- Brouillet. P (2002). Les tests rapides de détection des antibiotiques dans le lait», *Bull des Group. Tech.Vét.*, 15 :183-189.
- Broutin. C, Diedhiou. Y, Dieng. M (2005). Maitrise de la qualité dans la transformation laitière. Guide de bonnes pratiques d'hygiène, 103 p.

C

- CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) (2020). Recommandations. 181 p.
- Catella. S (2003). Evaluation de l'efficacité de Baytril ND 5% solution injectable dans le traitement d'une infection respiratoire à *Mycoplasma bovis* chez le veau. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil. 30-32 p.
- Cauty. I et Perreau J.M (2009). La conduite du troupeau laitier. 288 p.
- Châtaigner. B, Stevens. A (2005). Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar, Institut Pasteur de Dakar, p. 6-9.
- Chatellet. M-C (2007). Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou, thèse de doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, 224p.
- Chauvin. C, Colin. P, Guillot. J.F, Laval. A, Milleman. Y, Moulin. G and Pellanne. I. (2006). Usage des antibiotiques chez l'animal. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Ploufragan. 214p.

- Cerniglia. C.E, Kotarski. S (2005). Approaches in the safety evaluations of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28, (1), p3-20.
- Courtet Leymarios. F (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et d'acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse pour le doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Créteil, 18-37.
- Cuq. JL (2007). Microbiologie Alimentaire : Les relations microorganismes / aliments / consommateurs, Département Sciences et Technologies des Industries Alimentaires 4ème année. Université Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. p 2 - 17.

D

- Demoly. P, Bousquet. J, Godard. P, Michel. F-B (2000). Actualité des allergies médicamenteuses issues des antibiotiques et médicaments antirétroviraux *Bull. Acad. Nationale Méd*, 184, (4), p761-774.
- Direl (2005). Rapport annuel sur le secteur de l'élevage. , Doc1. 37p, Doc1. 53p
- Djuricic. D, Samardzija. M, Grizelj. J, Dobranic. T (2014). Effet du traitement intramammaire des mammites subcliniques pendant la lactation en élevages bovins laitiers au nord-ouest de la Croatie, 1p.

E

- EFSA (2007). The community summary report trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. Rapport may 2005 the EFSA Journal 94, 288p.

- Enriquez. B (2002). La pharmacovigilance vétérinaire : objectifs, mission, mise en œuvre et résultats, page 35-40.
- Essalhi. M (2002). Relations entre les systèmes de production bovines et les caractéristiques du Lait. Mémoire D'ingénieur. Université institut Agronomiques et vétérinaire Hassan II. Rabat. P104.

F

- Fabre. JM, Joyes. D (2000). Résidus dans le lait: observation des inhibiteurs bien utiliser les médicaments. Proceedings: lait qualité et santé. Pp10-12.
- Fabre. JM, Petit. C, Bosquet. G (2006). Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, édition 2006, page 4.
- Follet. G (2007). Utilisation des antibiotiques chez l'animal : Problèmes et Actions, Rencontres Parlementaires "Santé-Société-Entreprise", Assemblée Nationale. France.
- Fredot. E (2005). Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc, Lavoisier:10-14 ,397 pages.

G

- Gaucher. I (2007). Caractéristiques de la micelle de caséines et stabilité des laits : de la collecte des laits crus au stockage des laits UHT, thèse INRA / Agrocampus Sci. Tech. Lait et œuf. agrocampus Rennes.

- Gaudin. V (2016). Caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires .Doctoral dissertation, Université Rennes 1.
- Gedilaghine. V (2005). La rationalisation du traitement des mammites en exploitation laitière-conception et réalisation d'une enquête d'évaluation de la mise en place de l'action GTV partenaire dans le département de la Manche. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Alfort, France, 106 p.
- Ghazi. K, Niar. A (2011). Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). *Tropicultura*, 29(4), 193-196.
- Guiraud. J-P (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition DUNOD. Paris. Pp : 136-139.
- Gysi. M (2006) : Antibiotiques utilisés en production laitière en 2003 et 2004 Revue : *Suisse Agric.* n°38 (4), p. 215-220.

H

- Hanzen. C (2010). La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Etiopathogénie et traitements. Approche individuelle et de troupeau. Année 2009-2010.63 p.

J

- Jacquemin. F (2006). Viandes : Après les hormones, les antibiotique ». <http://pagespero-orange.fr/alps08-carignan.htm#haut>.

K

- Kebir. A (2016). Les résidus d'antibiotiques : de l'étable à la table, INMV (Institut National de la Médecine Vétérinaire), Mostaganem, 5-13p.

- Khattab. W-O, Elderea. H-B, Salem. E-G et Gomaa. N-F (2010).Transmission of Administered Amoxicillin Drug Residues from Laying Chicken to their Commercial Eggs. *Egypt Public Health Assoc.*, 85 (5-6): 297-316.

L

- Laurentie. M, Sanders. P (2002.) Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait Revue : Bulletin GVT, n°15, Avril-Mai-Juin 2002, p. 51-55.
- Laval. A (2003). Produire du porc sans facteurs de croissance antibiotiques (antibiotiques régulateurs de flore ou ARF). In : Colloque sur la production porcine : Savoir pour mieux planifier l'avenir, CRAAQ éd., Québec, 206 p.
- Le chat. P (2007). Pharmacologie, Service de pharmacologie, Université Paris-VL, Edition EXT EM. p 307.
- Lebres. E, Mouffok. F (1989). Recherche d'antibiotiques et de résidus d'antibiotiques dans les laits. *Maghreb vétérinaire*. Vol 4. 17 :5 – 7.
- Loichot. C et Grima. M (2004). Introduction à la pharmacocinétique passages trans-membranaires. Faculté de Médecine de Strasbourg, Module de Pharmacologie Générale DCEM1.
- Loubnal. E (2013). Les Métrites chez la vache.

<https://site-anpvr.rhcoud.com/?p=748>

M

- Maillard. R. (2002). Antibiothérapie respiratoire. *La Dépêche Vétérinaire* 80 (Suppl): 15-17.

- Makhlouf. M, Montaigne. E, Tessa. A (2015). La politique laitière algérienne : entre sécurité alimentaire et soutien différentiel de la consommation. *Nouvelle Médit*; 1 : 12 – 23.
- MC Kellar. Q (2001). Pharmacokinetic and dosage regimen of antimicrobials. *Compte-rendu des actualités en buiatrie*, Paris, Société Française de Buiatrie.
- Mensah. S-E-P, Koudande. O-D, Sanders. P, Laurentie. M, Mensah. G-A, et Abiola. F-A (2014). Résidus d’antibiotiques et denrées d’origine animale en Afrique : risques de santé publique, *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics : REV SCI TECH OIE)*, 2-26p.
- Mitchell. M (2005). Détection des résidus d’antibiotiques dans le lait de chèvre. *Laboratoire des résidus médicamenteux/ division des services de laboratoire/ université de Guelph ; Brenda Norris- programme de salubrité des produits laitiers/MAAARO*.
- Moulin. G (1999). Code de bon usage des antibiotiques en élevage Conférence : the use of antibiotics in animals ensuring the protection of public health Mars 1999 OIE, paris, France.

N

- Nicholas. RAJ et Ayling. RD (2003). *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Sciences*. 74(2):105-112.
- Nickell. JS, White. BJ (2010). Thérapie antimicrobienne métaphylactique pour les maladies respiratoires bovines chez les bovins d’élevage et d’engraissement. *Vétérinaire. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)*, 26 (2), 285–301.

O

- Ouertani. H (2003): Les résidus d'antibiotiques dans le lait : Enquête dans le un centre de collecte de la région de Béja, Thèse Doc. Vét., Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire, Sidi Thabet, 54 p.
- Ouslimani. S et Mahdi. B (2008). Contribution à l'étude des résidus d'antimicrobiens dans le lait cru produit dans l'Algérois (Doctoral dissertation, École Nationale Supérieure Vétérinaire).

P

- Pascal. S (2005). L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale, *Bull. Acad. Vét*, Tome 158,n°2,139-40.
- Perrin-Guyomard. A, Poul. J-M, Corpet. D-E, Sanders. P, Fernandez. A-H et Bartholomew. M (2005). Impact of residual and therapeutic doses of ciprofloxacin in the human-flora-associated mice model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 42 (2):151-160.
- Pougheon. S (2001). Contribution é l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologies laitières. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France: 31(102 p).
- Puyt. J-D (2002). Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire : Base de l'antibiothérapie. École nationale vétérinaire, Nantes, p 201.
- Puyt. J-D (2003). Des résidus de médicament très surveillés. Revue : Réussir Lait Élevage, Réussir Bovins Viande : Dossier spécial médicaments vétérinaires.

R

- Reig. M, Toldra. F (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection *Meat Science*, 78, (1-2), p60-67.
- Renard.J (2014). A propos du lait cru. Filière wallonne. Lait et produits laitiers. Edition Diversi FERM, p12-23.
- Rheotest. M (2010) : Rhéomètre RHEOTEST® RN et viscosimètre à capillaire RHEOTEST® LK R Produits alimentaires et aromatisants.
- Ryckaert. I (2003). 42 questions sur le lait. Édition IMP, Bruxelles. p 13-56.

S

- Siousarran. V (2003). Hygiène du lait cru en zone urbaine et périurbaine de Niamey, Niger. Rapport de stage, p. 42-43.
- Stoltz. R (2008a). Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale : évaluation et maîtrise de ce danger, Thèse de doctorat vétérinaire, université Claude-Bernard-Lyon I (médecine-pharmacie), p 11-79.
- Stoltz. R (2008b). Les résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine ani-masculin : évaluation et maîtrise de ce danger [thèse]. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.p.1-152.

T

- Titouche. Y, Houali. K, Yabrir, B, Malki. O, Chergui. A, Chenouf. N et FIȚ. N (2013). Detection of antibiotics residues in raw milk produced in Freha area (Tizi-Ouzou), Algeria. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 70 (1). p 83-87

V

- Vignola. CL (2002). Science et technologie du lait. Transformation du Lait. 75. Fondation de technologie laitière du Québec. Edition Presses Internationales Polytechnique, Canada. 600 p.

Y

- Yala. D, Merad. A-S, Mohamedi. D et Ouar Korich. M-N (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91(1), 5-12.

Z

- Zinedine. A, Faïd. M et Benlemlih. M. (2007). Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode microbiologique. *Rev. Microbiol. indust. sanit. environ.* 1, 1-9.

Anonymes :

- Anonyme. a (2004). Méthode officielle de détection des résidus dans lait de chèvre .centre de Ressource et Documentation Caprine .L'égide n°36
- Anonyme. b (2006). La chromatographie liquide haute performance, Cours de chimie Organique, minérale et structurale, Académie de Nancy, Metz, <http://www.ac-nancymetz.fr/enseign/Physique/HPLC.htm>.
- Anonyme. c (2003).Arrêté Ministériel n° 2003-169 du 3 mars 2003 relatif au temps d'attente et aux limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale au Maroc. Journal de Monaco, Bulletin principal de la principauté, n° 7951 du 21/03/2003.

Annexes

Annexe (1) : Limite Maximale des Résidus des principaux antibiotiques. (Fabre *et al.*, 2006)

Molécules	Familles d'antibiotique	LMR dans le lait (µg/kg ou ppm)
L'acide Oxolinique	Fluoroquinolones	(0)
Amoxicilline	Bétalactamines	4
Ampicilline	Bétalactamines	4
Bacitracine	Polypeptides	100
Cefacetrile	Bétalactamines	125
Cephalexine	Bétalactamines	100
Cefalonium	Bétalactamines	20
Cefapirine	Bétalactamines	60
Cefazoline	Bétalactamines	50
Cefopérazone	Bétalactamines	50
Cefquinome	Bétalactamines	20
Ceftiofur	Bétalactamines	100
Chloramphenicol	Phenicolés	(0)
Cloxacilline	Bétalactamines	30
Colistine	Polypeptide	50
Chlortétracycline	Tétracycline	100
Danofloxacin	Fluoroquinolones	30
Streptomycine	Aminoglycosides	200
Dicloxacilline	Bétalactamines	30
Difloxacin	Fluoroquinolones	0
Doxycycline	Tétracycline	-
Enrofloxacin	Fluoroquinolones	100
Erythromycine	Macrolides	40
Flumequine	Fluoroquinolones	50
Géntamicine	Aminoglycosides	100
Kanamycine	Aminoglycoside	150
Linomycine	Macrolides	150
Marbofloxacin	Fluoroquinolones	75
Nafcilline	Bétalactamines	30
Néomycine	Aminoglycosides	1500
Nitrofurane/furazolidone	Nitrofuranes	(0)
Novobiocine	Macrolides	50

Oxytétracycline	Tétracycline	100
Oxacilline	Bétalactamine	30
Pénicilline (benzylpencilline)	Bétalactamine	4
Pirlimycine	Macrolides	100
Rifaximine	Ansamycine	60
Spectinomycine	Aminoglycosides	200
Spiramycine	Macrolide	200
Sulfadiazine	Sulfamides	100
Sulfadiméthoxine		
Sulfadimidine		
Sulfadoxine		
Sulphonamides		
Sulphafurazole		
Sulphamerazine		
Sulphmethazine		
Sulphaméthoxazole		
Sulphaquinoxaline		
Sulphathiazole		
Tétracycline	Tétracycline	100
Timicosine	Macrolides	50
Tylosine	Macrolides	50

Annexe (2) : Appareillage et verreries utilisés.

Appareillage	Instruments et consommables	Verreries
<ul style="list-style-type: none">- Spectrophotomètre- Vortex- Etuve bactériologique réglable à 30°C- Balance- Plaque chauffante- Autoclave- Microscope optique- Bain marie- Réfrigérateur- Bec Bunsen	<ul style="list-style-type: none">- Micropipette- Thermomètre- Emporte pièce- Portoir métallique- Portoir en bois- Anse de platine- Embouts- Papier Whatman- Pince- Ecouillons- Spatule- Lames- Boîtes de Pétri- Flacons en plastique- Marqueur permanent	<ul style="list-style-type: none">- Tubes à essai- Pipettes graduées- Flacons

Annexe (3) : Composition et préparation des milieux de culture.

Milieux de culture	Compositions (g/l)	Préparation
Gélose de Mueller Hinton	<ul style="list-style-type: none"> - peptone.....17,5 - Extrait de viande.....2,0 - Amidon de maïs1,5 - Agar17,0 <p>pH du milieu prêt- à- l'emploi à 25°C : 7,3 ± 0,2.</p>	Suspendre 38g de MH dans 1L d'eau distillée sous l'effet de la chaleur et stériliser à 121°C pendant 20 minutes.
Gélose de PCA	<ul style="list-style-type: none"> - Tryptone..... 5,0 - Extrait de levure.....2,5 - Glucose.....1,0 - Agar agar bactériologique.....12,0 <p>pH du milieu prêt- à- l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.</p>	Dissoudre 23.5g de PCA dans 1L d'eau sous l'effet de la chaleur et stériliser à 121°C pendant 20 minutes.
Bouillon nutritif	<ul style="list-style-type: none"> - Tryptone..... 10,0 - Extrait de viande.....5,0 - Chlorure de sodium5,0 <p>pH du milieu prêt -à- l'emploi à 25°C : 7,2 ± 0,2.</p>	Mettre en solution 20 g milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée Stériliser à 121°C pendant 20 minutes.