

NUMERATION DES CELLULES SOMATIQUES DANS LE LAIT DE CHEVRE

L'objectif de l'étude était, d'une part, d'étudier et prendre en main la méthode de référence pour la numération des cellules somatiques du lait de chèvre (méthode FDA) et d'autre part, d'étudier les modalités de raccordement des compteurs automatiques.

Les travaux à réaliser ont été les suivants :

- Prise en main de la méthode de référence au laboratoire et comparaison à la méthode vache.
- Détermination des caractéristiques de la méthode de référence (répétabilité)
- Réflexion sur le mode de calibrage des compteurs automatiques
- Réalisation d'échantillons de calibrage spécifiques
- Validation du calibrage (répétabilité et justesse)

L'étude a été réalisée d'avril 2004 à mars 2005 par CECALAIT à la demande de l'interprofession du lait de chèvre (ANICAP) qui en a assuré le soutien financier.

1/- ETUDE DE LA METHODE DE REFERENCE

La méthode retenue pour le comptage cellulaire des laits de chèvre est décrite dans le document FDA issu de la publication de Packard et coll. 1992. Il s'agit d'une fixation des cellules puis d'une coloration par du vert de méthyle-pyronine Y, suivi d'un comptage microscopique. La méthode de référence actuellement utilisée pour la numération des cellules somatiques dans le lait de vache, est décrite dans la norme FIL 148. Il s'agit d'une coloration des cellules somatiques par le bleu de méthylène suivi d'un comptage microscopique.

Un essai comparatif de comptages cellulaires entre les méthodes FDA et FIL a été réalisé début avril 2004 sur 2 échantillons de lait de chèvre de mélange.

	Méthode FIL	Méthode FDA
Echantillon 1	591	368
Echantillon 2	902	584

Résultats comparatifs de comptages cellulaires ($10^3/ml$) entre les méthodes FDA et FIL 148 sur 2 échantillons de lait de chèvre de mélange.

Il apparaît que les résultats obtenus sur les deux échantillons par la méthode FDA sont globalement inférieurs d'un tiers à ceux obtenus avec la méthode FIL.

Ces résultats plus faibles obtenus par la méthode FDA comparativement à la méthode FIL 148 sont similaires avec de précédentes observations pourraient s'expliquer d'une part, par la non-sélectivité du bleu de méthylène marquant les cellules comme fragments cellulaires et par la présence de nombreuses particules non-cellulaires dans le lait de chèvre due au type de sécrétion lactée apocrine (dégradation de la glande sous forme de particules

cytoplasmiques). Le colorant vert de méthyle-pyronine Y ne présente pas cet inconvénient puisqu'il ne se fixe que sur les particules renfermant de l'ADN et/ou ARN et permet de différencier les cellules intègres à ADN/ARN (couleur bleu-vert) à des fragments cellulaires à ARN (couleur rose).

Evaluation de la répétabilité

Les échantillons utilisés sont des laits de chèvre de mélange en provenance des régions Rhône-Alpes et Poitou-Charentes. Ils ont été collectés conformément aux pratiques de l'interprofession laitière dans le cadre du paiement du lait pendant la période de mai à septembre 2004. Ils ont été additionnés de bronopol incolore à 0,02% et stockés à 4°C jusqu'à l'analyse (délai maximum 5 jours après prélèvement).

Les analyses ont été réalisées à CECALAIT au fur et à mesure des réceptions des échantillons. Ceux présentant des comptages supérieurs à 3000 $10^3/ml$ ont été éliminés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (en 10^3 cellules /ml).

CLASSE	0-3000	CLASSE 0-1000	CLASSE 1000-2000	CLASSE 2000-3000
N	84	28	48	8
Sr	34	21	27	80
Sr(%)	2,8	2,8	2,0	3,3

Caractéristiques de répétabilité des numérations cellulaires ($10^3/ml$) sur lait de chèvre par la méthode FDA

N : nombre de résultats

Sr et Sr (%) : écart type de répétabilité absolu et relatif

Les résultats obtenus présentent des écarts-type de répétabilité faibles et du même ordre que ceux obtenus par la méthode FIL 148 à partir d'échantillons de lait de vache.

2/- ETUDE DU COMPTAGE CELLULAIRE AUTOMATISE

Tous les comptages cellulaires automatisés ont été réalisés par un compteur automatique Bentley SCC 150®, préalablement calibré à partir d'échantillons à teneur garantie (ETG) lait de vache. La technique utilisée est la cytométrie de flux avec discrimination de la hauteur des impulsions selon un seuil variable.

Les résultats obtenus n'apparaissent pas satisfaisants, en effet la moyenne des écarts est faible ($-5.10^3/ml$) mais les écarts-types des écarts et résiduels sont élevés ce qui traduit une forte dispersion des résultats et l'ordonnée à l'origine significativement différente de 0 ($+80.10^3/ml$). Cette dispersion est vraisemblablement à mettre en relation avec l'accumulation de résultats partiels sur une période assez longue (mai à septembre 2004) ainsi qu'aux variations de calibrage de l'analyseur pendant cette période.

C'est pourquoi, le recours à la préparation des ETG spécifiques lait de chèvre a été envisagé pour le calibrage de l'analyseur.

Calibrage

Afin de vérifier la nécessité de l'utilisation d'ETG lait de chèvre, deux séries de 9 échantillons, à teneurs variables en cellules somatiques de zéro à $1800 10^3/ml$, ont été réalisées par microfiltration de lait de chèvre de mélange. Les échantillons ont été additionnés de bronopol à 0,1%. Les séries ont été réalisées en novembre 2004 et février 2005.

Ces échantillons ont été analysés en double par la méthode FDA et par comptage automatisé (calibrage lait de vache).

Résultats

Le tableau ci-après présente les résultats obtenus

PARAMETRE	SERIE 1	SERIE 2
d	3	19
Sd	31	30
b(b')	0,974 (0,997)	0,982 (0,974)
a	20	-3
Sy,x(S'y,x)	28 (30)	30 (28)

Paramètres d'étalonnage du compteur cellulaire automatisé Bentley SCC150® à partir d'ETG lait de chèvre.

d et Sd : moyenne et écart type des écarts appareil-référence

b et b' : pente de la régression linéaire simple ($Y = b.X + a$) ou forcée par $a=0$ ($Y = b'.X$)

a : ordonnée à l'origine de la régression linéaire simple

Sy,x et S'y,x : écart type résiduel de la régression linéaire simple ou forcée par $a=0$.

Les moyennes des écarts sont faibles. Les pentes de régression sont voisines de 1 (différence non significative) et les ordonnées à l'origine sont voisines de 0. Les écarts-types résiduels sont faibles.

On peut remarquer que la relation entre les deux méthodes est stable sur les deux périodes testées.

Globalement les écarts étant faibles, les calibrages proposés à partir d'échantillons de lait de chèvre n'apparaissent pas statistiquement différents de ceux en vigueur à partir d'échantillons de lait de vache.

3/- VALIDATION DE L'ETALONNAGE

Une analyse comparative d'échantillons de lait de chèvre par la méthode de référence et la méthode automatisée calibrée à partir de laits de vache a été réalisée afin d'évaluer la justesse des comptages avec ce mode de calibrage.

Les échantillons utilisés ont été réalisés comme précédemment décrit, pendant la période de février et mars 2005.

Ces échantillons ont été analysés en double par la méthode FDA et par comptage automatisé, l'appareil ayant été préalablement calibré à partir d'ETG lait de vache avec une gamme de zéro à $1800 10^3/ml$.

Résultats

Evaluation de la répétabilité

Le tableau ci-après présente les résultats obtenus (en 10^3 cellules /ml).

CLASSE	0-2000	CLASSE 0-1000	CLASSE 1000 - 2000
N	44	24	20
Sr	13	9	17
Sr(%)	1,4	1,3	1,3

Caractéristiques de répétabilité des numérations cellulaires ($10^3/ml$) sur lait de chèvre par comptage automatisé (Bentley SCC150®)

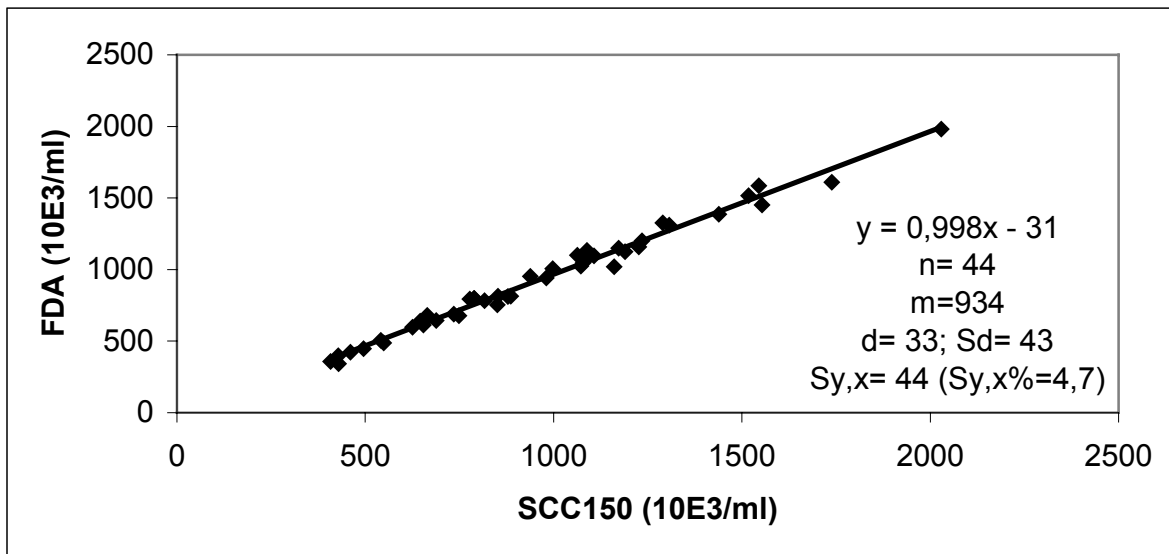
N : nombre de résultats

Sr et Sr(%) : écart type de répétabilité absolu et relatif.

Les résultats obtenus sont bons, en effet les écarts-types de répétabilité sont faibles et inférieurs à ceux obtenus par la méthode de référence. Ils sont inférieurs à ceux observés à partir d'échantillons individuels de lait de vache (2,5% environ) et inférieurs aux 5% recommandés.

Evaluation de la justesse

La figure ci-dessous présente les résultats obtenus



Relation linéaire entre les méthodes FDA et Bentley SCC150® sur des échantillons de lait de chèvre de mélange
n : nombre de résultats, *m* : moyenne des résultats référence ; *d* et *Sd* : moyenne et écart type des écarts appareil-référence ; *Sy,x* et *Sy,x%* : écart type résiduel de la régression linéaire absolu et relatif

Au vu des résultats, il apparaît que la moyenne des écarts de 33 $10^3/\text{ml}$ est supérieure à 0 (différence non-significative à 5% près) ce qui montre une bonne concordance globale entre les résultats.

La pente de 0,998 est très proche de 1 (différence non significative) et l'ordonnée à l'origine négative de -31 (différence statistiquement non significative). Ce dernier paramètre peut s'expliquer par l'absence d'échantillons à faible taux cellulaire (inférieurs à 300) ce qui ne permet pas un bon ajustement de l'ordonnée à l'origine.

L'écart type résiduel absolu de 44 (45 pour $a=0$) $10^3/\text{ml}$ peut paraître élevé mais rapporté au niveau moyen des taux, il n'est plus que de 4,6 % (4,7% pour $a=0$) donc inférieur à celui observé de 6 à 7% lors de l'évaluation de cet appareil sur du lait de vache.

En conclusion, le calibrage réalisé au moyen d'étalons de lait de vache (gamme d'étendue 1800 $10^3/\text{ml}$) permet d'assurer une justesse satisfaisante pour les numérations cellulaires dans le lait de chèvre.

4/- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Concernant l'utilisation d'ETG lait de chèvre, les résultats obtenus ne montrent pas l'utilité de recourir à de telles préparations spécifiques. En effet, l'étude démontre que le calibrage à l'aide d'étalons lait de vache selon le protocole en vigueur est satisfaisant

pour les numérations cellulaires dans le lait de chèvre. Les résultats peuvent s'expliquer par les raisons suivantes :

Le colorant utilisé pour le comptage automatisé (bromure d'éthidium) ne se fixe que sur les molécules d'ADN de façon équivalente au colorant utilisé pour la méthode de référence chèvre (vert de méthyle-pyronine Y). Les deux colorants sont donc spécifiques des cellules et débris renfermant de l'ADN et ne se fixent pas sur les particules non cellulaires (présentes dans les laits de chèvre). A l'inverse, le bleu de méthylène utilisé pour la méthode de référence vache colore toutes les particules et son utilisation pour le lait de vache n'est possible que grâce à la quasi-absence de particules non cellulaires.

La sélection des impulsions par la technique du seuillage variable permet de ne retenir que les fortes impulsions en provenance majoritairement des cellules somatiques à l'exclusion des débris cellulaires.

Ainsi, par extrapolation des résultats obtenus avec l'analyseur Bentley SCC150®, on pourrait considérer que la numération des laits de chèvre par comptage automatisé nécessite, d'une part un étalonnage des analyseurs au moyen d'échantillons de lait de vache sur une étendue allant de 0 à 1800 $10^3/\text{ml}$ environ (incluant un contrôle de la linéarité dans cette plage) et, d'autre part, vraisemblablement l'utilisation d'un mode de seuillage variable (différenciation de la

hauteur des impulsions). On peut penser que les résultats obtenus sont transposables aux autres analyseurs présentant les mêmes fonctionnalités et performances.

Enfin, du fait de l'évolution des types cellulaires présents dans le lait de chèvre au cours de la lactation, il serait intéressant de vérifier la stabilité de la relation entre les résultats obtenus par la méthode de référence lait de chèvre d'une part, et les comptages automatisés avec un calibrage lait de vache, d'autre part.

BIBLIOGRAPHIE

QUERVEL X., TROSSAT Ph. **Rapport d'étude sur la numération cellulaire du lait de chèvre**, CECALAIT, Mai 2005

PACKARD VS & Coll. 1992, "**Direct microscopic methods for bacterial or somatic cells**" in Standards method for the examination of dairy products. American Public Health Association, Washington, DC, p. 309-325