



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MENTOURI DE CONSTANTINE - FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRE

N° d'ordre : ...

Série :

Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme
de Magister en médecine vétérinaire

Option : hygiène alimentaire

Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande

THEME

**OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION
ET DE QUANTIFICATION DES RÉSIDUS
D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDE BLANCHE PAR
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE
PERFORMANCE (HPLC)**

Par : M^f **ZEGHILET NOUREDDINE**

Jury de soutenance

| | | |
|--|-----------------------|-----------|
| Président : MEKROUD . A | Maître de conférences | UMC |
| Rapporteur : EL HADEF ELOOKKI . S | Professeur | UMC |
| Examineur : BENDEDDOUCHE . B | Maître de conférences | ENV Alger |
| Examineur : BENAZZOUCZ . H | Maître de conférences | UMC |

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2008-2009

REMERCIEMENTS

- Tout d'abord, je remercie DIEU de m'avoir accordé la santé et les moyens de réaliser ce travail.
- Je remercie vivement le professeur **EL HADEF ELOUKI** . S d'avoir bien voulu accepter d'être mon Directeur de thèse.

Nous lui exprimons notre sincère reconnaissance.

- A Monsieur **MEKROUD** . A, maître de conférences au sein de notre département, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de mémoire.

Hommages respectueux.

- Monsieur, **BENDEDOUCHE** , B maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de mémoire.

Sincères remerciements.

- Je remercie vivement monsieur **BENZAZZOUZ** . H, maître de conférence, qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de mémoire.

Sincères remerciements.

- Je remercie monsieur **CHIBAT** . A, chargé de cours de bio-statistique au sein de notre département.

Sincères remerciements.

- Je remercie tous qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie mon mémoire de magistère :

- *A ma mère qui n'est plus. Que Dieu l'accueille dans son vaste Paradis.*
- *A mon père.*
- *A mes chers frères : Mahieddine, Mourad, Azeddine et Hicham.*
- *A mes sœurs, Sarhouda et Hafiza.*
- *A ma petite sœur Ilhame et sa mère.*
- *A toute ma famille.*
- *A tous mes amis de la promotion 2000-2005.*
- *A mes amis : Abdelkrim, Mohamed, Nedjemeddine, Ibrahim, Nassim, Hocine.*
- *A mes collègues de magistère : Lidia, Warda, Latifa, Leila et Houda, Ali, Ibrahim Bassem et Mohamed Taher.*
- *A tous qui me connais de loin et de près.*

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux et des figures
Liste des abréviations

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction ----- 1

CHAPITRE I : LA VIANDE BLANCHE

| | |
|---|---|
| 1. Definitions | 2 |
| 1.1. Definition de la viande | 2 |
| 1.2. Defintion de la viande blanche | 2 |
| 2. Importance | 2 |
| 3. Composition chimique de la viande | 3 |
| 4. Valeur nutritive de la viande | 3 |
| 5. Principales especes productrices de viande blanche..... | 4 |
| 6. Structure du muscle | 4 |
| 6.1. Definition du muscle | 4 |
| 6.2. Les differents types de muscle | 4 |
| 6.2.1. Les muscles lisses | 4 |
| 6.2.3. Les muscles stries squelettiques dits m.s.s. | 5 |
| 7. Transformation du muscle en viande | 5 |
| 7.1. Etat ante-rigor (l'état pantelant) | 5 |
| 7.2. Etat rigide ou rigor mortis | 6 |
| 7.3. Etat mature ou phase de maturation | 6 |
| 8. La production de viande blanche | 7 |
| 8.1. Historique | 7 |
| 8.2. Evolution de la production mondiale de la viande blanche | 8 |
| 8.3. Evolution de la production de la viande blanche en algerie | 9 |
| 8.4. Consommation de la viande blanche..... | 9 |

CHAPITRE II : LES ANTIBIOTIQUES

| | |
|---|----|
| 1. Historique ----- | 11 |
| 2. Decouverte des antibiotiques ----- | 11 |
| 3. Definition d'un antibiotique----- | 12 |
| 4. Mode d'action des antibiotiques----- | 12 |
| 5. Effet bacteriostatique et bactericide des antibiotiques----- | 13 |
| 6. Usages des antibiotiques en medecine veterinaire ----- | 14 |
| 7. Les molecules utilisees----- | 15 |
| 7.1. En medecine veterinaire----- | 15 |
| 7.2. Les antibiotiques utilises en elevage avicole ----- | 17 |
| 8. Utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs ----- | 17 |
| 8.1. Definition d'additif----- | 17 |
| 8.2. Les effets des additifs ----- | 17 |
| 8.3. Actions des antibiotiques en tant que facteur de croissance----- | 19 |

| | |
|--|----|
| 9. Classification des antibiotiques----- | 20 |
| 9.1. Criteres de classification----- | 20 |
| 9.2.1. Classification des antibiotiques selon leur origine ----- | 21 |
| 9.2.1.1. Fermentation ou extraction----- | 21 |
| 9.2.1.2. Semi-synthese ----- | 21 |
| 9.2.1.3. Synthese chimique totale----- | 22 |
| 9.2.2. Classification des antibiotiques selon la structure chimique ----- | 22 |
| 9.2.3. Classification des antibiotiques selon la cible bacterienne ----- | 22 |
| 9.2.3.1. Antibiotiques agissant au niveau de la paroi bacterienne ----- | 22 |
| 9.2.3.2. Antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique ----- | 23 |
| 9.2.3.3. Antibiotiques agissant au niveau des ribosomes ----- | 23 |
| 9.2.3.4. Antibiotiques agissant au niveau de la biosynthese des acides nucleiques----- | 24 |
| 9.2.3.5. Antibiotiques agissant par autres mecanismes ----- | 24 |
| 9.2.4. Classification des antibiotiques le spectre d'activite----- | 24 |
| 9.2.5. Classification des antibiotiques par famille ----- | 24 |
| 10. Associations d'antibiotiques----- | 29 |
| 11. Pharmacocinetique des antibiotiques ----- | 29 |
| 11.1. L'absorption ----- | 30 |
| 11.2. La distribution ----- | 30 |
| 11.3. Les transformations ----- | 31 |
| 11.4. Excretion ----- | 31 |

CHAPITRE III : LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ALIMENTS ET LE RISQUE POUR LE CONSOMMATEUR

| | |
|--|----|
| 1. Les residus d'antibiotiques ----- | 33 |
| 1.1. Definition du residu----- | 33 |
| 1.2. Facteurs de persistance des residus ----- | 33 |
| 1.3. Consequences negatives de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux ----- | 34 |
| 2. Les risques presentes par les residus ----- | 34 |
| 2.1. Risques pour la sante publique ----- | 34 |
| 2.1.1. Toxicite directe----- | 34 |
| 2.1.2. Les reactions allergiques----- | 35 |
| 2.1.3. L'acquisition de resistances aux antibiotiques----- | 35 |
| 2.1.3.1. Definition de la resistance ----- | 35 |
| 2.1.3.2. Modalites d'acquisition et de transmission de la resistance ----- | 36 |
| 2.1.4. Les autres effets pour l'homme dus a la presence de residus d'antibiotiques----- | 38 |
| 2.2. Risques pour la sante animale ----- | 39 |
| 2.3. Risques d'ordre technologique----- | 39 |
| 2.4. Risques pour l'environnement----- | 39 |
| 3. Antibiotiques dont l'usage est interdit pour le traitement des animaux dont les productions sont destinees a la consommation humaine. ----- | 40 |
| 4. Delai d'attente ----- | 41 |
| 4.1. Definition----- | 41 |
| 4.2. Fixation du temps d'attente ----- | 41 |
| 4.3. Modalites de determination du temps d'attente ----- | 42 |
| 4.3.1. La methode classique----- | 42 |

| | |
|---|----|
| 4.3.2. La nouvelle methode proposee----- | 43 |
| 5. LMR des antibiotiques ----- | 43 |
| 5.1. Definition----- | 43 |
| 5.2. Fixation de la LMR ----- | 44 |
| 5.3. Tableau des lmr des antibiotiques ----- | 44 |
| 6. Objectifs et strategie d'evaluation des residus----- | 48 |
| 6.1. L'appréciation des risques ----- | 48 |
| 6.1.1. L'identification des dangers ----- | 48 |
| 6.1.2. La caracterisation des dangers----- | 48 |
| 6.1.3. L'evaluation de l'exposition----- | 49 |
| 6.1.4. La caracterisation des risques ----- | 49 |
| 6.2. La gestion des risques ----- | 49 |
| 6.3. La communication sur les risques----- | 49 |

CHAPITRE IV : LES METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS VIANDE BLANCHE

| | |
|---|----|
| 1. Methodes de detection (depistage)----- | 50 |
| 1.1. Methodes de detection biologique (microbiologique)----- | 51 |
| 1.1.1. Methode alternative (PREMITEST) ----- | 51 |
| 1.1.1.1. Principe du PREMITEST----- | 51 |
| 1.1.1.2. Mode operatoire----- | 51 |
| 1.1.2. La methode de reference (methode des 4 boites) ----- | 52 |
| 1.1.2.1. Principe de la methode----- | 52 |
| 1.1.2.2. Mode operatoire ----- | 52 |
| 1.2. Methodes biochimiques----- | 54 |
| 1.2.1. Methode enzymatique (PENZYM test) ----- | 54 |
| 1.2.1.1. Principe du PENZYM test ----- | 54 |
| 1.2.1.2. Mode operatoire ----- | 54 |
| 1.2.2. Methode sur tiges (le test BETA STAR) ----- | 55 |
| 1.2.2.1. Principe du BETA STAR test ----- | 55 |
| 1.2.2.2. Mode operatoire ----- | 56 |
| 1.2.2.3. Interpretation des resultats----- | 58 |
| 1.3. Methodes immunologiques ----- | 58 |
| 1.3.1. RIA (Radio-Immuno Assay) et RRA (Radio-Recepteur Assay)----- | 58 |
| 1.3.1.1. Principe du test RIA et du test RRA----- | 58 |
| 1.3.2. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ----- | 59 |
| 1.3.3.1. Principe de l'ELISA----- | 59 |
| 2. Methodes de confirmation et de quantification ----- | 60 |
| 2.1. Les methodes chromatographiques ----- | 60 |
| 2.1.1. Historique ----- | 60 |
| 2.1.2. Definition ----- | 62 |
| 2.1.3. Principe de base de la chromatographie ----- | 62 |
| 2.1.4. Buts de la chromatographie ----- | 62 |
| 2.1.4.1. Objectif analytique----- | 63 |
| 2.1.4.2. Objectif preparatif----- | 63 |
| 2.1.5. Traitement des trois parincipaux chromatographies----- | 63 |
| 2.1.5.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC) ----- | 63 |
| 2.1.5.1.1. Instrumentation ----- | 63 |
| 2.1.5.1.2. Nature des deux phases ----- | 64 |

| | |
|--|----|
| 2.1.5.1.3. Principaux solvants utilises en HPLC | 65 |
| 2.1.5.1.4. Schema de principe d'une HPLC | 66 |
| 2.1.5.1.5. Champs d'application de l'HPLC | 67 |
| 2.1.5.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) | 68 |
| 2.1.5.2.1. Definition et principe | 68 |
| 2.1.5.2.2. Organes d'un appareillage CPG | 69 |
| 2.1.5.2.3. Principaux gaz utilises en CPG | 70 |
| 2.1.5.2.4. Domaines d'application de la CPG | 71 |
| 2.1.5.3. Chromatographie sur couche mince (CCM) | 71 |
| 2.1.5.3.1. Principe de la CCM | 71 |
| 2.1.5.3.2. Organes d'un appareillage CCM | 72 |
| 2.1.5.3.3. Principaux eluants utilises en CCM | 73 |
| 2.1.5.3.4. Domaines d'applications de la CCM | 73 |
| 2.2. Methode spectrometrique (spectrometrie de masse (SM)) | 74 |
| 2.2.1. Historique | 74 |
| 2.2.2. Definition | 74 |
| 2.2.3. Principe de la SM | 74 |
| 2.2.4. Organes d'un appareillage (SM) | 75 |
| 2.3. Couplage CPG – SM et couplage HPLC – SM | 76 |

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

| | |
|--|----|
| 1. Materiels | 77 |
| 1.1. Appareillage HPLC | 77 |
| 1.2. Le dispositif de filtration | 80 |
| 1.3. Le petit materiel | 81 |
| 1.3.1. Balance analytique | 81 |
| 1.3.2. Seringues d'injections | 82 |
| 1.3.3. Agitateur vibrant | 82 |
| 1.3.4. Flacons steriles en plastique | 83 |
| 1.3.5. Macro-pipette digitale | 83 |
| 1.3.6. Bain a ultra-son | 83 |
| 1.3.7. Filtre millipore | 84 |
| 2. Reactifs et produits chimiques | 85 |
| 2.1. Compose PHYWEE | 85 |
| 2.2. Standards purs (etalons) | 85 |
| 2.2.1. Caracteristiques chimiques du standard oxytetracycline | 85 |
| 2.2.2. Caracteristiques chimiques du standard colistine | 87 |
| 3. Autres produits chimiques | 88 |
| 4. Protocole generale d'analyse | 88 |
| 4.1. Calibrage de l'appareillage | 88 |
| 4.2. Preparation des solutions de travail | 88 |
| 4.2.1. Solution-mere d'oxytetracycline | 88 |
| 4.2.2. Solution-mere colistine | 88 |
| 4.3. Optimisation des parametres d'analyse des residus de l'oxytetracycline et de la colistine | 89 |
| 4.4. Systeme de filtration | 90 |

| | |
|---|----|
| 5. Expressions des resultats et test applique ----- | 90 |
|---|----|

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|-----|
| 1. Calibrage de l'appareillage ----- | 91 |
| 2. Optimisation des parametres d'analyse des residus d'oxytetracycline et de colistine ----- | 93 |
| 2.1. Application des parametres d'analyse du fournisseur----- | 93 |
| 2.1.1. Oxytetracycline ----- | 93 |
| 2.1.2. Colistine ----- | 94 |
| 2.2. Investigations experimentales pour l'optimisation des parametres d'analyse ----- | 94 |
| 2.2.1. Oxytetracycline ----- | 94 |
| 2.2.1.1. Optimisation de la phase stationnaire ----- | 94 |
| 2.2.1.2. Optimisation de la phase mobile----- | 95 |
| 2.2.1.3. Optimisation de la longueur d'onde ----- | 97 |
| 2.2.1.4. Optimisation du debit de la phase mobile ----- | 99 |
| 2.2.1.5. Optimisation du volume injecte ----- | 102 |
| 2.2.1.6. Tableau recapitulatif des parametres retenus pour detecter et quantifier les residus d'oxytetracycline----- | 106 |
| 2.2.2. Colistine ----- | 108 |
| 2.2.2.1. Optimisation de la phase stationnaire ----- | 108 |
| 2.2.2.2. Optimisation de la phase mobile----- | 108 |
| 2.2.2.3. Optimisation de la longueur d'onde ----- | 110 |
| 2.2.2.4. Optimisation du debit de la phase mobile ----- | 113 |
| 2.2.2.5. Optimisation du volume injecte ----- | 115 |
| 2.2.2.6. Tableau recapitulatif des parametres retenus pour detecter et quantifier les residus de la colistine----- | 119 |
| 3. Etude statistique de la fidelite de la methode ----- | 121 |
| 3.1. Oxytetracycline----- | 121 |
| 3.1.1. Verification de la repetabilite ----- | 121 |
| 3.1.2. Verification de la reproductibilite ----- | 122 |
| 3.1.3. Verification de la linearite ----- | 124 |
| 3.1.3.1. Preparations des solutions pour la gamme d'etalonnage ----- | 124 |
| 3.1.3.2. Courbe d'etalonnage ----- | 124 |
| 3.2. Colistine----- | 125 |
| 3.2.1. Verification de la repetabilite ----- | 125 |
| 3.2.2. Verification de la reproductibilite ----- | 126 |
| 3.2.3. Verification de la linearite ----- | 128 |
| 3.2.3.1. Preparations des solutions pour la gamme d'etalonnage ----- | 128 |
| 3.2.3.2. Courbe d'etalonnage ----- | 128 |
| Conclusion ----- | 130 |

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau n° 1 : Composition moyenne du muscle squelettique----- | 3 |
| Tableau n° 2 : Principales espèces à l'origine de viande blanche----- | 4 |
| Tableau n° 3 : Evolution de production de la viande blanche (1968 - 2007) en Algérie----- | 9 |
| Tableau n° 4 : Evolution de la consommation de viande, en kg/personne/an----- | 10 |
| Tableau n° 5 : Date de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles ----- | 11 |
| Tableau n° 6 : Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine. ----- | 15 |
| Tableau n° 7 : Les molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire ----- | 16 |
| Tableau n° 8 : Principaux antibiotiques utilisés en aviculture----- | 17 |
| Tableau n° 9 : Liste des antibiotiques autorisés comme additifs en France ----- | 18 |
| Tableau n° 10 : Classification des antibiotiques par famille----- | 25 |
| Tableau n° 11 : Anti-infectieux dont l'usage est interdit pour le traitement des animaux dont les productions sont destinées à la consommation humaine----- | 41 |
| Tableau n° 12 : Délai d'attente de quelques antibiotiques ----- | 42 |
| Tableau n° 13 : Limites maximales résiduelles (LMR) des antibiotiques exprimées en $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou ppb----- | 45 |
| Tableau n° 14 : Les microorganismes utilisés dans la méthode des quatre boîtes et les antibiotiques détectés ----- | 53 |
| Tableau n° 15 : Les principaux solvants utilisés en HPLC ----- | 65 |
| Tableau n° 16 : Tableau résumé des différents types de chromatographie liquide -- | 66 |
| Tableau n° 17 : Principaux gaz utilisés en CPG ----- | 71 |

| | |
|---|-----|
| Tableau n° 18 : Les paramètres retenus pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline ----- | 106 |
| Tableau n° 19 : Les paramètres retenus pour la détection et la quantification des résidus de colistine ----- | 119 |
| Tableau n° 20 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la répétabilité des mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline ----- | 122 |
| Tableau n° 21 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la reproductibilité des mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline ----- | 123 |
| Tableau n° 22 : L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline----- | 124 |
| Tableau n° 23 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la répétabilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard colistine ----- | 126 |
| Tableau n° 24 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la reproductibilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard colistine ----- | 127 |
| Tableau n° 25 : L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline----- | 128 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure n°1 : Structure du muscle ----- | 5 |
| Figure n° 2 : Evolution de la dureté de la viande u cours du temps ----- | 7 |
| Figure n° 3 : Evolution de la production mondiale de viande par type, 1965-2005 --- | 8 |
| Figure n° 4 : Consommation mondiale de viande par habitant en 2004----- | 10 |
| Figure n° 5 : Principaux sites d'action des antibiotiques----- | 13 |
| Figure n° 6 : Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les antibiotiques ----- | 20 |
| Figure n° 7 : Les quatre stratégies de la résistance aux antibiotiques ----- | 37 |
| Figure n° 8 : Schéma de principe du Penzym test ----- | 55 |
| Figure n° 9 : Schéma de principe du test B-star ----- | 56 |
| Figure n° 10 : Mode opératoire et résultats du Bêta STAR test----- | 57 |
| Figure n° 11 : Schéma de principe de RIA et RRA ----- | 59 |
| Figure n° 12 : Schéma de principe D'ELISA----- | 60 |
| Figure n° 13 : Schéma de principe d'une HPLC ----- | 67 |
| Figure n° 14 : Schéma de principe d'un appareillage CPG ----- | 69 |
| Figure n° 15 : Schéma de principe d'un appareillage CCM----- | 73 |
| Figure n° 16 : Schéma de principe de base d'une spectrométrie de masse----- | 75 |
| Figure n° 17 : Appareillage HPLC et le PC utilisés ----- | 80 |
| Figure n° 18 : Dispositif de filtration----- | 81 |
| Figure n° 19 : Balance analytique ----- | 81 |
| Figure n° 20 : Seringue d'une capacité de 25 µl----- | 82 |
| Figure n° 21 : Agitateur vibrant----- | 82 |
| Figure n° 22 : Macro-pipette automatique----- | 83 |
| Figure n° 23 : Bain ultrason servant à l'élimination des bulls d'air emprisonnés dans les différentes solutions liquides utilisées durant l'optimisation----- | 84 |

| | |
|---|-----|
| Figure n° 24 : Deux boites de papier filtre----- | 84 |
| Figure n° 25 : Structure d'oxytétracycline ----- | 86 |
| Figure n° 26 : Structure chimique de la colistine ----- | 87 |
| Figure n° 27 : Chromatogramme obtenu avec le standard PHYWEE à une longueur d'onde de 254 nm ----- | 91 |
| Figure n° 28 : Chromatogramme obtenu avec le standard PHYWEE à une longueur d'onde de 270 nm ----- | 92 |
| Figure n° 29 : Chromatogramme obtenu en appliquant les paramètres d'analyse recommandés par le fournisseur du standard oxytétracycline ----- | 94 |
| Figure n° 30 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée d'acétonitrile ----- | 96 |
| Figure n° 31 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée de méthanol----- | 97 |
| Figure n° 32 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 325 nm ----- | 98 |
| Figure n° 33 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 370 nm ----- | 99 |
| Figure n° 34 : Chromatogramme obtenu avec débit de 1 ml/mn ----- | 100 |
| Figure n° 35 : Chromatogramme obtenu avec débit de 2 ml/mn ----- | 101 |
| Figure n° 36 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 2 µl ----- | 103 |
| Figure n° 37 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 6 µl ----- | 103 |
| Figure n° 38 : Premier exemple d'un chromatogramme enregistré durant un essai de nettoyage----- | 104 |
| Figure n° 39 : Second exemple d'un chromatogramme enregistré durant un autre essai de nettoyage----- | 105 |
| Figure n° 40 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus (325 nm) -- | 107 |
| Figure n° 41 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus (344 nm) -- | 107 |
| Figure n° 42 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée 100 % d'acétonitrile ----- | 109 |

| | |
|--|-----|
| Figure n° 43 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée de 100% de méthanol ----- | 110 |
| Figure n° 44 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 240nm ---- | 111 |
| Figure n° 45 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 220 nm --- | 112 |
| Figure n° 46 : Chromatogramme obtenu avec débit de 1.5ml/mn----- | 114 |
| Figure n° 47 : Chromatogramme obtenu avec débit de 1.7 ml/mn----- | 114 |
| Figure n° 48 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 10 µl----- | 116 |
| Figure n° 49 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 12 µl----- | 116 |
| Figure n° 50 : Premier exemple d'un chromatogramme enregistré durant un essai de nettoyage (optimisation des paramètres d'analyse de la colistine). ----- | 117 |
| Figure n° 51 : Second exemple d'un chromatogramme enregistré durant un autre essai de nettoyage durant (optimisation des paramètres d'analyse de la colistine). ----- | 118 |
| Figure n° 52 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus mais avec une longueur d'onde de 245 nm----- | 120 |
| Figure n° 53 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus mais avec une longueur d'onde de 245 nm----- | 120 |
| Figure n° 54 : Droite de calibration de l'oxytétracycline----- | 125 |
| Figure n° 55 : Droite de régression de la colistine ----- | 129 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

AFNOR : Agence Française de Normalisation

AGP : Antibiotic Growth Promotors (antibiotiques promoteurs de croissance)

ARF : Antibiotiques Régulateurs de Flore

ARN : Acide Ribo-Nucléique

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CCVRDF : Comité du Codex Alimentarius sur les Résidus de Médicaments
Vétérinaires dans les Aliments

CEE : Communauté Economique Européenne

CPG : Chromatographie Phase Gazeuse

DES : Dose Sans Effet.

DJE : Dose Journalière Admissible

ELISA : Enzym Linked Immuno Sorbent Assay

GMQ : Gain Moyen Quotidien

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IC : Indice de Consommation

kg : kilogramme

l : litre.

LMR : Limite Maximale de Résidus

mg : milligramme

ml : millilitre

µg : microgramme

MRL : Maximum Residue Level/Limit

ppb : Parties Par Billion (milliard)

ppm : Parties Par Million

RIA : Radio Immuno Assay

RRA : Radio-Recepteur Assay

SM : Spectrométrie de Masse

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Actuellement, le recours aux antibiotiques est fréquent en production animale et plus spécialement en élevage du poulet de chair. L'utilisation correcte de certains antibiotiques comme promoteurs de croissance ne doit pas entraîner de résidus. Par contre leur administration dans un but préventif ou thérapeutique surtout lorsqu'elle est réalisée par des profanes doit faire craindre la subsistance de quantités non négligeables de ces substances particulièrement actives, dans la viande de cette espèce.

Outre les qualités nutritionnelles et organoleptiques, et pour être propre à la consommation humaine, la viande du poulet de chair doit être avant tout un produit sain, c'est à dire exempt de germes pathogènes, mais aussi de résidus des médicaments et plus spécialement de résidus d'antibiotiques qui sont dangereux pour la santé humaine.

Aujourd'hui, le prix de cette viande qui est relativement moins élevé que celui des viandes rouges, en fait un produit attractif pour la ménagère algérienne. Cependant, les contrôles des résidus de ces substances dans la denrée mise à la vente sont trop rares voire inexistants ; d'où la nécessité de prévoir des dispositifs adéquats de détection et de quantification de ces résidus. L'analyse de cette denrée alimentaire est donc nécessaire afin de garantir la maîtrise de la qualité (ou de la conformité) d'un point de vue sanitaire ou purement commercial.

L'acuité et l'importance de ce problème de santé publique nous ont amené à s'intéresser à ce thème.

Dans la première partie de notre travail nous avons résumé les principales données bibliographiques récentes relatives au thème abordé.

La partie expérimentale est consacrée à l'optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus de deux antibiotiques par chromatographie liquide haute performance (HPLC), la colistine et l'oxytétracycline. Les résultats de nos investigations expérimentales, traitées statistiquement nous permettent de fixer les différents paramètres d'analyse.

CHAPITRE I

LA VIANDE BLANCHE

La viande et ses dérivés occupent une place de choix dans notre alimentation tant pour des raisons nutritionnelles que pour des raisons socioculturelles (Clinquart et al, 1999). Dans les temps préhistoriques, il n'y avait pas de production de viande ; les hommes chassaient et satisfaisaient ainsi leurs besoins en protéines. Lorsque les hommes sont devenus sédentaires, ils ont élevé des animaux pour l'obtention de produits comme le lait, les œufs et la laine. Ce n'est que plus tard que le cheptel a été élevé pour la consommation de viande, (Anonyme 1 d, 2007).

1. DEFINITIONS

1.1. DEFINITION DE LA VIANDE

On appelle viande la chair des animaux dont on a coutume de se nourrir. Dans ce vocabulaire on inclut la chair des mammifères, des oiseaux et des poissons. La viande est donc toute partie comestible de ces animaux, (Fosse, 2003)

1.2. DEFINITION DE LA VIANDE BLANCHE

La viande blanche est une protéine animale présentant autant de qualités nutritives que la viande rouge (ovine, bovine, Etc.). Dans le passé cette protéine était qualifiée de viande de pauvres. Actuellement et compte tenu des avantages qu'elle présente en matière de lipides (moins de matières grasses), cette viande est conseillée aux patients au titre d'un régime alimentaire non gras pour la maîtrise du taux de cholestérol. Elle est recommandée également aux sportifs et aux personnes intéressées par une taille fine et une bonne forme (fitness), (Boukhalfa, 2006).

2. IMPORTANCE

L'aviculture prend une place de choix dans les plans de développement de nombreuses nations tant pour des raisons nutritionnelles et économiques que de goût. Parmi les nutriments indispensables à la vie figure les matières azotées et plus particulièrement celles d'origine animale. L'azote peut être apportés par les viandes dont celles de volailles, (Ndiaye, 2002).

3. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA VIANDE

La composition globale de la viande est variable. Elle varie selon l'espèce et chez une même espèce d'un animal à un autre (selon l'état d'engraissement) et au sein d'un même animal d'un muscle à un autre.

On peut toutefois retenir comme composition moyenne les chiffres indiqués dans le tableau (1).

Tableau n° 1 : Composition moyenne du muscle squelettique, (Ouali, 1991).

| Composant chimique | Pourcentage (%) |
|------------------------------------|-----------------|
| Eau | 75 |
| Protéines totales | 20 |
| Lipides | 2.5 |
| Glucides | 1.2 |
| Substances solubles non protéiques | 1.3 |

4. VALEUR NUTRITIVE DE LA VIANDE

La valeur nutritive de la viande peut être résumée dans les quatre points essentiels suivants :

- tout d'abord la viande est une source d'azote de grande valeur biologique. Cet azote est présent sous forme de protéines, (Belhadj, 2008). Ces protéines sont composées essentiellement de myosine, myoalbumine et de collagène. Il s'agit, pour la myosine et la myoalbumine, de protéines d'excellente qualité comportant tous les acides aminés indispensables, ce qui confère aux viandes un très bon coefficient d'efficacité protidique, (Anonyme 1 f, 2007)
- elle est également une source d'énergie. Son potentiel calorique dépend énormément de sa teneur en matières grasses. La teneur en glucides est négligeable car il n'y a pratiquement plus de glycogène dans la viande au stade de sa commercialisation, (Anonyme 1 f, 2007)
- elle est aussi une bonne source de minéraux. Les viandes sont riches en phosphore et représentent la meilleure source alimentaire de fer héminique, (Belhadj, 2008). Il s'agit de fer ferreux, mieux absorbé que le fer ferrique des végétaux. Cette catégorie d'aliments est pauvre en calcium et présente un très mauvais rapport Ca/P. Les abats, en particulier le foie, sont très riches en fer et en phosphore, (Anonyme 1 f, 2007)

- les viandes sont dépourvues de vitamines liposolubles. Elles sont plutôt riches en vitamines du groupe B, (Anonyme 1 f, 2007)

5. PRINCIPALES ESPECES PRODUCTRICES DE VIANDE BLANCHE

Le tableau (2) présent les différentes espèces productrices de viande blanche.

Tableau n° 2 : Principales espèces à l'origine de viande blanche, (Anonyme 1 h, 2007).

| | | |
|-------------------|---|--------------|
| Poussin | | 0.4 à 0.7 kg |
| Poulet | Mâle et femelle | 0.8 à 1.3 kg |
| Poularde | Femelle bien engraisée, os fins et chair abondante. On caractérise la poularde par ses pattes bleues. | 1.3 à 1.8 kg |
| Chapon | Coq castré | 2 à 3 kg |
| Poule | Femelle en fin de croissance, abattue après la 1ère période de ponte. | 1.2 à 1.8 kg |
| Dindonneau | | 2 à 3 kg |
| Dinde | | 3 à 6 kg |
| Dindon | | 6 à 12 kg |

A ces principales catégories s'ajoute la viande blanche issue des veaux et des agneaux nourris exclusivement avec du lait.

6. STRUCTURE DU MUSCLE

6.1. DEFINITION DU MUSCLE

C'est une structure anatomique faite de cellules spécialisées regroupées en faisceaux (point de vue de l'anatomie, en physiologie il s'agit de loges), capable de contractions et de décontractions et génératrice de mouvements, (Ziane, 2007).

6.2. LES DIFFERENTS TYPES DE MUSCLE

Il existe trois types de muscles :

6.2.1. LES MUSCLES LISSES

Ils sont involontaires et automatiques, c'est à dire qu'ils échappent au contrôle de la volonté. Ils sont dits aussi parasymphatiques, {Ex : les muscles des viscères}, (Ziane, 2007).

6.2.2. LES MUSCLES INTERMEDIAIRES

Ils sont dits aussi mixtes ou striés automatiques. {Ex : les muscles sphincter, utérin ou encore cardiaque}, (Ziane, 2007).

6.2.3. LES MUSCLES STRIES SQUELETTIQUES DITS M.S.S.

Ils sont striés et le plus souvent relient des os entre eux, (Ziane 2007).

La figure (1) présente la structure du muscle.

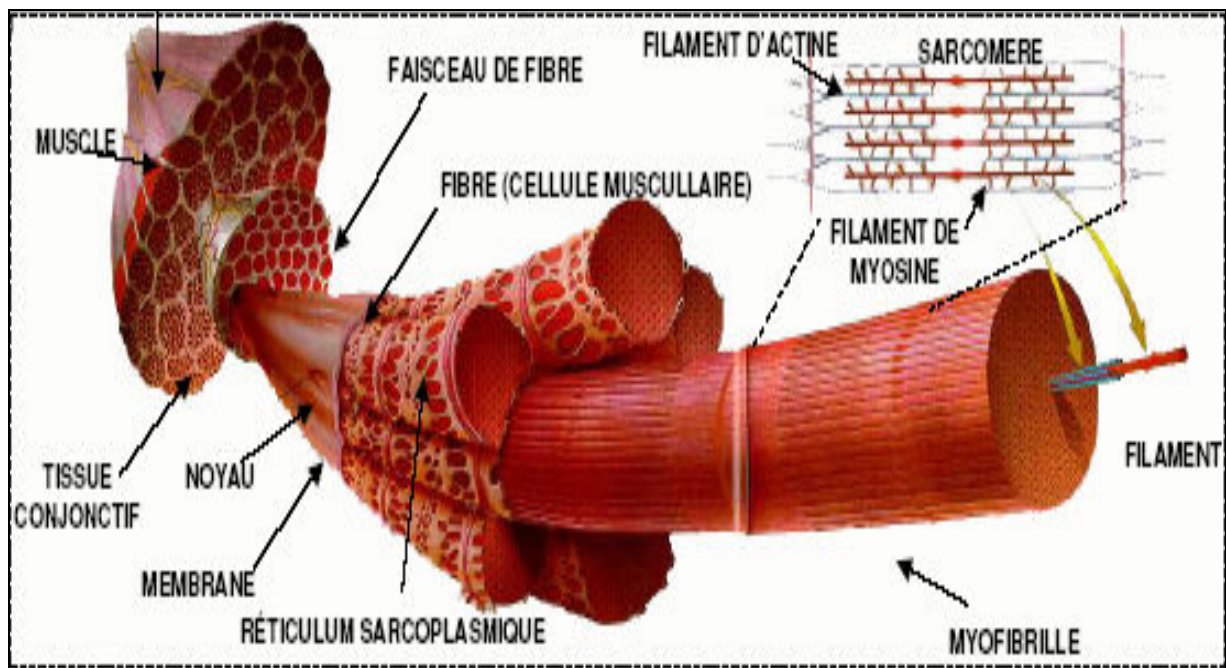


Figure n°1 : Structure du muscle, (Gariépy, 2005).

7. TRANSFORMATION DU MUSCLE EN VIANDE

Sur la base de tendreté qualité qui évolue le plus, on peut considérer qu'au cours de sa transformation en viande, le muscle passe successivement par trois états différents, et qui sont principalement l'état pantelant, l'état rigide, et l'état mature, (Frayse et Darré, 1990) ; (Ouali, 1991) ; (Dufey, 2005).

7.1. ETAT ANTE-RIGOR (L'ETAT PANTELANT)

Dans les secondes qui suivent l'abattage, la musculature demeure excitable pendant une courte durée correspondant à la durée de survie du système nerveux après la mort. Cette phase d'excitabilité est désignée sous le terme d'état pantelant, état

encore très mal caractérisé. Pendant cette phase, le muscle réagit à toute agression extérieure par des réactions, (Ouali, 1991).

7.2. ETAT RIGIDE OU RIGOR MORTIS

Cette deuxième phase correspond à l'installation de la rigidité cadavérique, et conduit à l'acidification du pH et la perte de l'élasticité du tissu musculaire qui devient rigide et dont la dureté est maximale en fin de rigor. Elle résulte de l'épuisement des réserves énergétiques (ATP, glycogène...). La durée de cette phase est très variable. Elle varie en fonction du type du muscle et bien sûr de l'espèce animale, (Ouali, 1991) ; (Santé et al 2001) ; (Dufey, 2005).

7.3. ETAT MATURE OU PHASE DE MATURATION

Après l'état rigide vient s'installer l'étape correspondant à l'amélioration de la tendreté de la viande, étape considérée pendant longtemps, à tort, comme étant la phase de résolution de la rigor mortis. En effet cette phase commence dès la mort de l'animal mais elle n'est décelable qu'après la rigor. Elle affecte principalement les protéines. Elle dure 2 à 3 jours chez le poulet de chair, (Ouali, 1991).

L'évolution de la dureté de la viande au cours du temps après l'abattage est représentée par la figure (2).

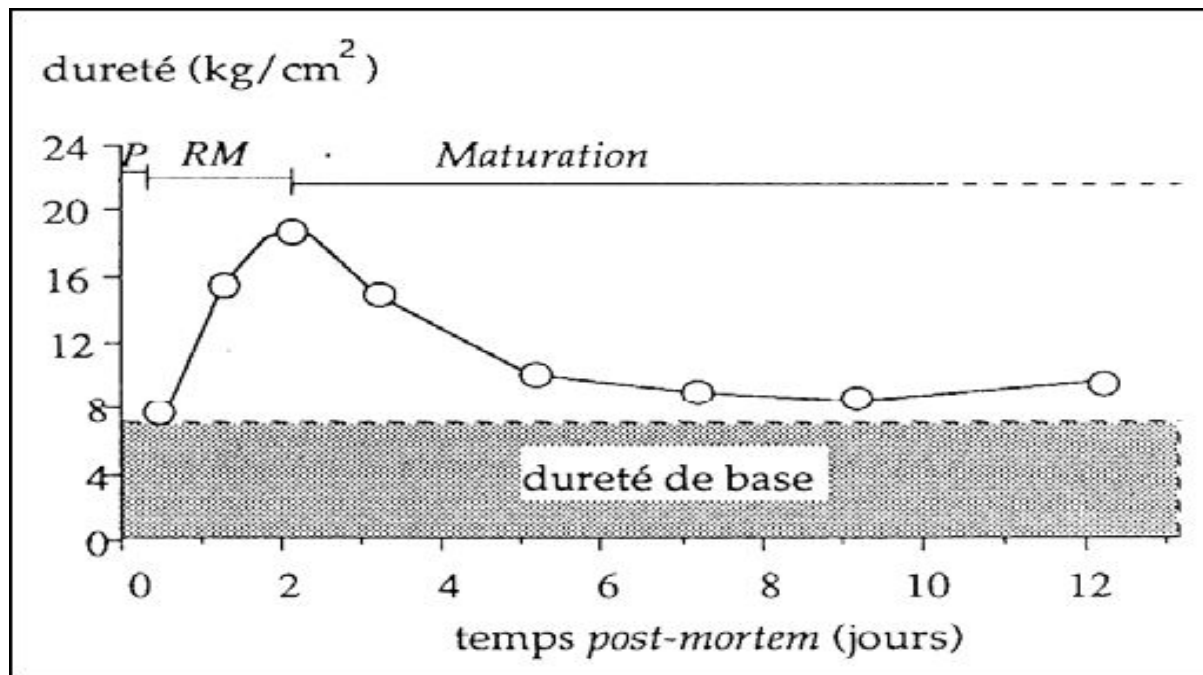


Figure n°2 : Evolution de la dureté de la viande au cours du temps (d'après Ouali, 1991 cité par Molette, 2004).

8. LA PRODUCTION DE VIANDE BLANCHE

8.1. HISTORIQUE

Les premiers signes d'une évolution des élevages artisanaux vers des élevages plus industrialisés sont survenus avec la crise de l'agriculture en 1880. Jusque là les fermes spécialisées en élevage étaient rares et très locales. Les premiers élevages industriels de volailles sont développés dans les années 1920. Les poules sont maintenues à l'intérieur des bâtiments et reçoivent du grain. Ces changements ont entraîné des problèmes de santé chez les animaux, notamment des carences en vitamine D dues au manque d'exposition à la lumière naturelle. Dès lors il a fallu compenser ce manque par des apports artificiels en vitamine D.

En 1936, les élevages industriels connaissent un nouvel essor. John Tyson, un américain, charge 500 poulets dans son camion et les livre 1000 km plus loin. Ainsi prennent fin les filières exclusivement locales. Les abattoirs ne dépendent plus des productions régionales mais peuvent s'approvisionner en poulets à bas prix sur un plus vaste marché.

A partir des années 1950, on a commencé à nourrir les poulets avec des aliments enrichis grâce auxquels le poids d'abattage est atteint en seulement six semaines.

Ce rapide historique rappelle que la production de viande blanche a fortement évolué après la deuxième guerre mondiale. Le secteur a eu recours à des méthodes plus intensives, basées sur la mécanisation et l'utilisation plus importante d'intrants tels les aliments supplémentés en vitamines, antibiotiques, étables éclairées et chauffées,... se traduisant par une forte croissance de la production et des rendements plus élevés par unité de surface, (Anonyme 1 d, 2007).

8.2. EVOLUTION DE LA PRODUCTION MONDIALE DE LA VIANDE BLANCHE

Au niveau mondial, le secteur de l'élevage croît plus vite que tout autre secteur agricole. En 2005, 265 millions de tonnes de viande ont été produites dans le monde. Cette production a cru d'un facteur 5 depuis les années 1950 et a doublé depuis les années 1970. Alors qu'en 1961 la production atteignait 75 millions de tonnes, elle s'élève à plus de 265 millions aujourd'hui, soit 3 fois plus. Les principaux producteurs sont la Chine (28%), les USA (15%) et le Brésil (8%), (Anonyme 1 d, 2007). Cette production mondiale a évolué comme suit (figure 3).

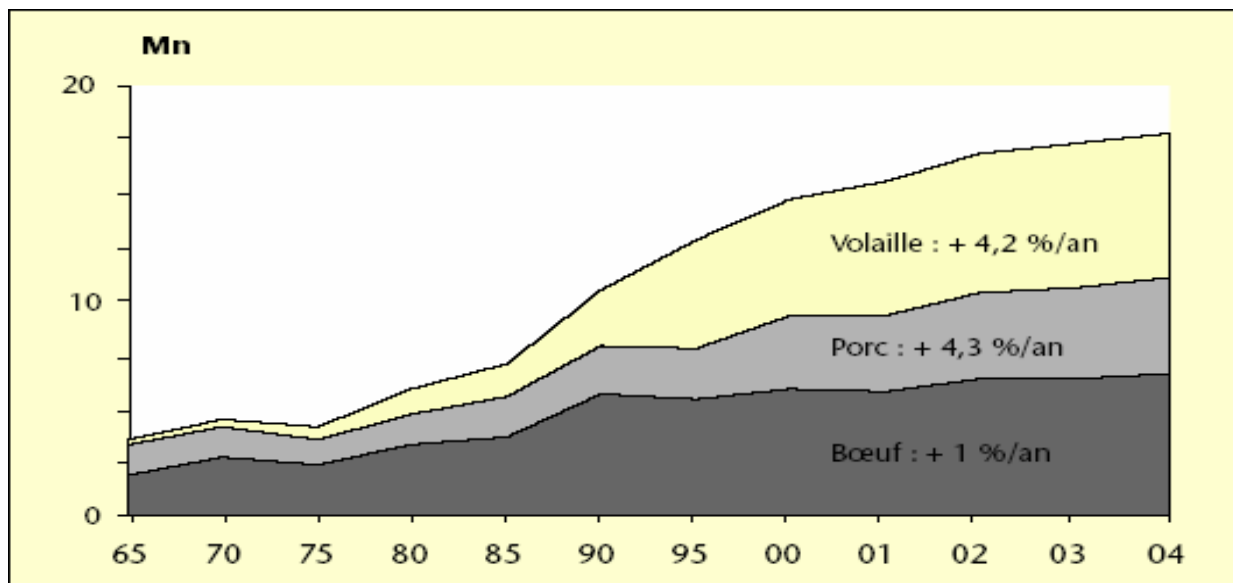


Figure n° 3 : Evolution de la production mondiale de viande par type, 1965-2005, (Frayse et Darré, 1990), (Dusser, 2005)

Cette forte augmentation est due à l'industrialisation des méthodes d'élevage : la production industrielle est à l'origine de 74% de la production de poulet, 50% de la production de porc, 43 % du bœuf.

D'après certaines estimations, la production mondiale de viande devrait encore augmenter, passant de 229 millions de tonnes en 1999/2001 à 465 millions de tonnes en 2050, (Anonyme 1 d, 2007).

8.3. EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE LA VIANDE BLANCHE EN ALGERIE

La production de viandes blanches a connu une progression appréciable passant de 24000 tonnes en 1968 à 200000 tonnes en 1999 soit une croissance moyenne annuelle de 7%. Cette augmentation s'explique par les efforts accomplis dans le domaine avicole, notamment en direction des facteurs de production ce qui a permis de faire passer la consommation de viande blanche de 0,5 kg/an/habitant en 1968 à 9 kg/an/habitant en 1995, (Feliachi 2003).

L'évolution de la production nationale de la viande blanche est résumée dans le tableau (3).

Tableau n° 3 : Evolution de production de la viande blanche en Algérie (1968-2007), (Ferrah et al, 2001) ; (Feliachi 2003) ; (Ferrah, 2005).

| Années et périodes | Viandes blanches (Tonne) |
|--------------------|--------------------------|
| Moyenne 1968 | 24000 |
| Moyenne 1973 | 27000 |
| Moyenne 1977 | 70000 |
| Moyenne 1982 | 116000 |
| Moyenne 1984-89 | 200000 |
| Moyenne 1990-95 | 220000 |
| Moyenne 1996-1999 | 185585 |
| Moyenne 2000-2004 | 174454 |
| Moyenne 2005-2007 | 330000 |

8.4. CONSOMMATION DE LA VIANDE BLANCHE

A l'échelle mondiale, la consommation de viande (viande rouge incluse) diffère fortement dans les pays occidentaux et les pays en voie de développement. Dans le monde industrialisé, la consommation de viande a augmenté au cours du temps ; elle est passée de 62 kg par personne et par an en 1964 à 88 kg par personne et par an en 1997. Depuis 1990, la consommation est restée relativement stable. Dans les pays en voie de développement, la consommation de viande a aussi augmenté mais dans des proportions moindres. Elle est passée d'une moyenne de 10 kg par personne et par an en 1964 à 36 kg par personne et par an en 1999. Aujourd'hui, la

consommation moyenne de viande au niveau mondial est de 40 kg par personne dont 70 % de viande blanche, Mialot (2008). La consommation de viandes blanches connaît donc une forte croissance. La production mondiale est en hausse de 3 à 4 % par an (en 2004, elle atteint 90 millions de tonnes), (Dusser, 2005).

A l'échelle nationale, la consommation de viande blanche (poulet de chair) est de 10 kg par habitant/an, (Anonyme 7 c, 2008).

Le tableau (4) montre l'évolution de la consommation de viande, en kg/personne/an.

Tableau n° 4 : Evolution de la consommation de viande, en kg/personne/an, (Frayse et Darré, 1990).

| | 1964/1966 | 1974/1976 | 194/1986 | 1997/1999 |
|------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Monde | | | | |
| Viande (poids de carcasse) | 24 | 27 | 31 | 36 |
| Pays en développement | | | | |
| Viande (poids de carcasse) | 10 | 11 | 16 | 26 |
| Pays industrialisés | | | | |
| Viande (poids de carcasse) | 62 | 74 | 81 | 88 |
| Pays en transition | | | | |
| Viande (poids de carcasse) | 43 | 60 | 66 | 46 |

La figure (4) représente la consommation mondiale de viande par habitant et par pays en 2004.

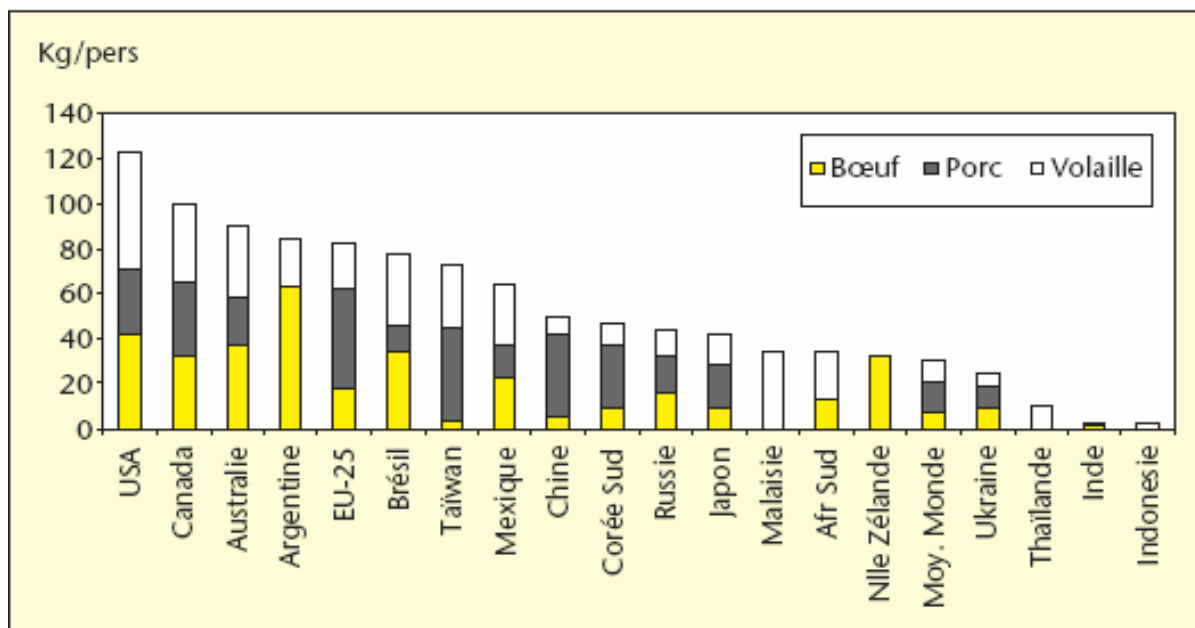


Figure n° 4 : Consommation mondiale de viande par habitant en 2004, (Dusser, 2005).

CHAPITRE II

LES ANTIBIOTIQUES

1. HISTORIQUE

La découverte des antibiotiques revient à sir FLEMING Alexander en 1929. Au cours d'examens de routine de cultures de staphylocoques en boîtes de Pétri au Saint Mary's Hospital de Londres, il découvre le développement accidentel de certaines moisissures de *Penicillium notatum* autour desquelles les colonies bactériennes ne se développaient pas. Il émet l'hypothèse que ce champignon devait sécréter une substance nuisible à la croissance des staphylocoques et il a démontré que le bouillon filtré de ce champignon permet de reproduire ce phénomène. Il a donné à ce produit qui a pu empêcher la croissance de ces bactéries le nom pénicilline qui est introduit en thérapeutique pendant la deuxième guerre mondiale (1941).

Parallèlement sont préparés en 1935, les sulfamides, le premier groupe d'antibactériens artificiels. Par la suite de nombreux autres antibiotiques ont été isolés à partir de champignons inférieurs, mais aussi et surtout des bactéries telluriques (genre *Actinomycètes*, *Bacillus* ...) les plus productrices d'antibiotiques. Les tétracyclines sont découvertes dans les années 1950, (Duval et Soussy, 1990) ; (Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

2. DECOUVERTE DES ANTIBIOTIQUES

Les dates de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles sont rappelées dans le tableau (5).

Tableau n° 5 : Date de découverte de quelques molécules d'antibiotiques naturelles, (Anonyme 2 e, 2005) ; (Chatellet, 2007) ; (Anonyme 7 d, 2008).

| Micro-organisme | Famille | Molécule | Date de découverte |
|---------------------|-----------------|---------------|--------------------|
| <i>Penicillium</i> | Pénicillines | Pénicilline | 1929 |
| <i>Streptomyces</i> | Aminoglycosides | Streptomycine | 1944 |
| | | Néomycine | 1949 |
| | | Kanamycine | 1957 |
| | | Tobramycine | 1967 |

| | | | |
|----------------------|-----------------|--------------------|------|
| | | Amikacine | 1975 |
| | Tétracyclines | Chlorotétracycline | 1948 |
| | | Oxytétracycline | 1949 |
| | Quinolones | Acide nalidixique | 1962 |
| Céphalosporum | Macrolides | Chloramphénicol | 1946 |
| | Phénicolés | Erythromycine | 1952 |
| | Céphalosporines | Céphalotine | 1954 |

3. DEFINITION D'UN ANTIBIOTIQUE

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber spécifiquement la vitalité d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe, (Gogny, Puyt et al, 2001) ; (Morin et al, 2005) ; (Gauthier, 2006) ; (Anonyme 7 d, 2008).

4. MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES

- A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne ; cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés (figure 5), (Mevius et al, 1999) ; (Cohen et Jaquot, 2001) ; (Oxoby, 2002) ; (Anonyme 2 a, 2005) ; (Anonyme 3 c, 2006) ; (Cuq, 2008) :
- sur la paroi bactérienne : en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire, la nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne
- sur la membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur

- sur les ribosomes : ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales
- sur l'ADN : en empêchant sa réplication et en inhibant la biosynthèse protéique
- autres : en agissant entant qu'antimétabolites bactériens (c'est à dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries)

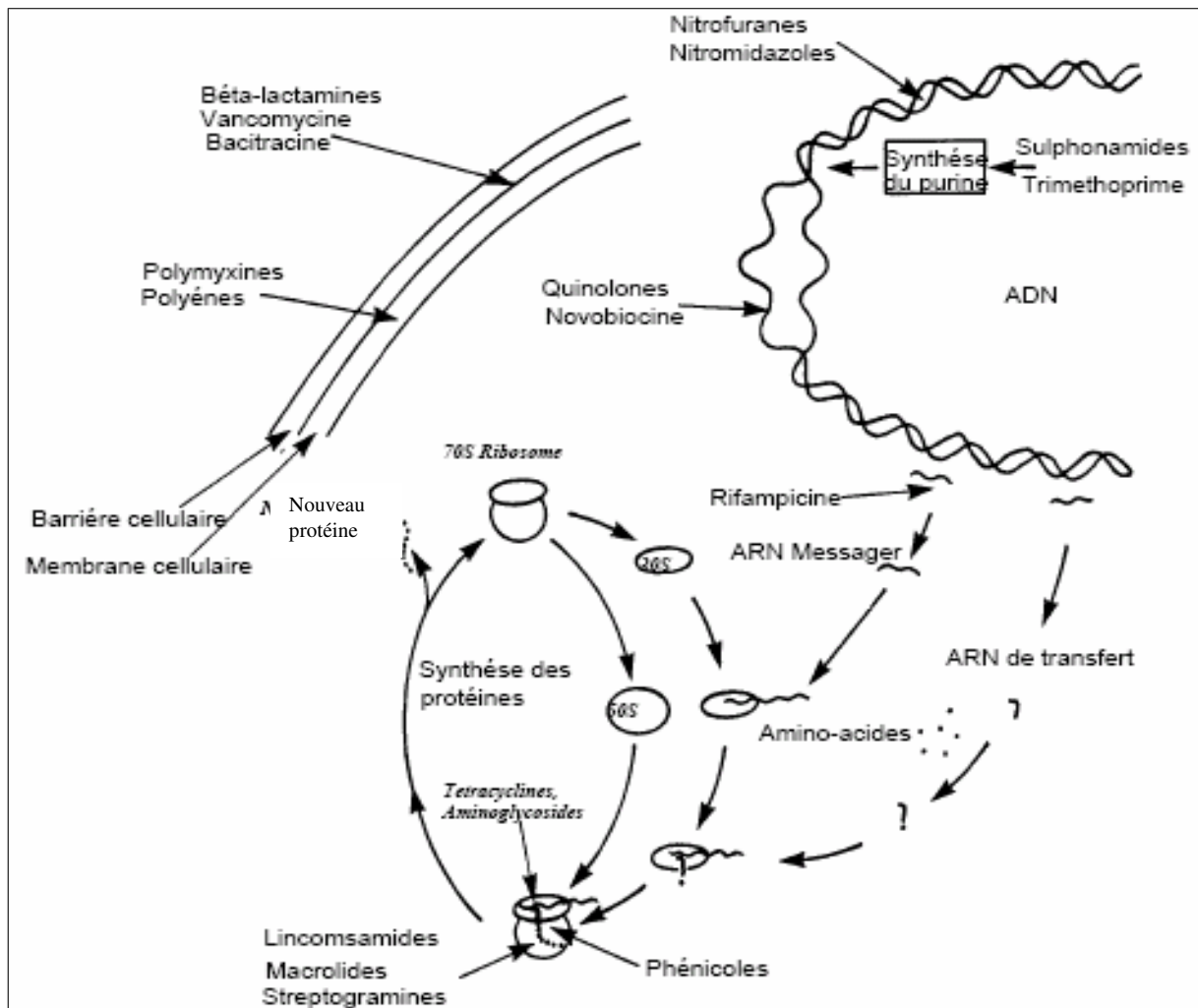


Figure n° 5 : Principaux sites d'action des antibiotiques, (Mevius et al, 1999) ; (Oxoby, 2002) ; (Anonyme 3 c, 2006) ; (Puyt et Guérin-Faubleé, 2006) ; (Errecalde, 2007), (Cuq, 2008).

5. EFFET BACTERIOSTATIQUE ET BACTERICIDE DES ANTIBIOTIQUES

En fonction de leur type d'activité vis-à-vis des bactéries, on distingue classiquement les antibiotiques bactériostatiques et bactéricides, Morin et al (2005). Cette activité s'apprécie in vitro par le dénombrement de la population bactérienne après mise en culture en présence de l'antibiotique à des concentrations proches de la CMI, (Duval et Soussy, 1990) ; (Fontaine, 1992).

6. USAGES DES ANTIBIOTIQUES EN MEDCINE VETERINAIRE

Selon Bezoen et al (1999) ; Guillemot (2006) ; Jacquemin (2006) les antibiotiques peuvent être utilisés de quatre façons différentes, avec des objectifs variables :

- les antibiotiques sont tout d'abord utilisés à titre thérapeutique curatif. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Le traitement a aussi pour effet de réduire la souffrance et de restaurer la production (lait, viande). Il réduit l'excrétion bactérienne, permettant dans certains cas d'obtenir une guérison bactériologique et, lors d'infection zoonotique, il peut éviter la contamination humaine
- lorsqu'une infection collective et très contagieuse se déclare dans un élevage avec de grands effectifs et évolue sur un mode aigu, avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer une (des) bactérie(s), l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques (sains ou en incubation) font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades. Cette pratique est qualifiée de métaphylaxie. Elle permet de traiter les animaux soumis à la pression infectieuse alors qu'ils sont encore en incubation ou lorsque les manifestations cliniques sont très discrètes
- les antibiotiques peuvent, parfois, être administrés à des périodes critiques de leur vie, sur des animaux soumis à une pression de contamination régulière et bien connue, après contrôle de la nature de l'infection par des examens de laboratoire. Dans ces conditions, on parle d'antibioprévention car le traitement permet d'éviter totalement l'expression clinique. Cette modalité d'utilisation des antibiotiques est adaptée à une situation sanitaire donnée et doit être

provisoire. L'antibioprophylaxie est également utilisée lors d'opérations chirurgicales pour prévenir les infections bactériennes

- l'usage des antibiotiques dans l'aliment à titre d'additifs en vue d'améliorer la croissance a fait l'objet de nombreuses critiques. Il est très limité actuellement et a été totalement abandonné fin 2005 en Europe. Ces antibiotiques régulateurs de flore (ARF) ou antibiotiques promoteurs de croissance (AGP pour antibiotic growth promoters) sont utilisés à des doses très faibles, non curatives et sont tous des agents chimiothérapeutiques non utilisés en médecine humaine pour limiter les risques de sélection de résistance vis-à-vis de molécules d'intérêt médical majeur

Le tableau (6) résume les principaux types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à la consommation humaine.

Tableau n° 6 : Types d'utilisation d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation humaine, (Kirkpatrick, 2002).

| Type d'utilisation d'antimicrobiens | But | Voie ou mode d'administration | Administration individuelle ou par groupe | Animaux malades |
|--|-------------------------------------|---|--|--|
| Thérapeutique | Thérapie | Injection, aliments, eau | Individuelle ou par groupe | Animaux malades ou certains animaux dans des groupes |
| Métaphylactique | Prophylaxie de la maladie, thérapie | Injection (veaux en parc d'engraissement), aliments, eau) | Groupe | Certains |
| Prophylaxie | Prévention de la maladie | Aliments | Groupe | Rien d'évident, bien que certaines infections |

| | | | | |
|----------------------------------|------------------------------|----------|--------|----------------------------|
| | | | | puissent être subcliniques |
| Stimulateur de croissance | Stimulation de la croissance | Aliments | Groupe | Aucun |
| | Indice de consommation | Aliments | Groupe | Aucun |

7. LES MOLECULES UTILISEES

7.1. EN MEDECINE VETERINAIRE

Le tableau (7) présente les molécules utilisées en médecine humaine et précise si elles le sont également chez l'animal.

Tableau n° 7 : Les molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire, (Colatrella, 2000) ; (Chatellet, 2007).

| Famille | Sous-famille | Molécule(s) | Usage chez l'Homme | Usage chez l'animal |
|------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Bêta-lactamines | Pénicillines | Pénicilline G | X | X |
| | | Pénicilline V | X | |
| | | Pénicilline M | X | X |
| | | Pénicilline A | X | X |
| | | Carboxypénicilline | X | |
| | | Uréidopénicilline | X | |
| | Céphalosporines | Première génération | X | X |
| | | Deuxième génération | X | X |

| | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|----------------------|------------|---|--|
| | | Troisième génération | X | X | |
| | | Monobactames | X | | |
| Cyclines | | | X | X | |
| Aminosides | | | X | X | |
| Macrolides | | | X | X | |
| Apparentés aux Macrolides | Lincosamides | | X | X | |
| | Kétolides | | X | | |
| | Synergistines/streptogramines | | X | | |
| Quinolones | Première génération | | X | X | |
| | Deuxième génération | | X | X | |
| Furanes | | | X | X | |
| Phénicolés | | | X | X | |
| Triméthoprimés | | | X | X | |
| Polymoxines | | | X | X | |
| Sulfamides | | | X | X | |
| Glycopeptides | | | X | | |
| Imidazolés | | | X | X | |
| Antituberculeux | | | X | X | |
| Divers | | Acide fusidique | X | X | |
| | | Bacitracine | X | X | |
| | | Clofazimine | X | | |
| | | Dapsone | X | | |
| | | Fosfomycine | X | | |
| | | Fumagilline | X | | |
| | | Mupirocine | X | | |
| | | Oxazolidinones | Linézolide | X | |
| | | Thyroricine | X | X | |

7.2. LES ANTIBIOTIQUES UTILISES EN ELEVAGE AVICOLE

Le tableau (8) indique les principaux antibiotiques utilisés en élevage avicole.

Tableau n° 8 : Principaux antibiotiques utilisés en aviculture, (d'après Mogenet et Fedida, 1998 cité par Messai, 2006).

| Famille | Exemples |
|---------------------------------|--|
| Bêta-lactamines | Aminopénicillines : Ampicilline et Amoxicilline |
| | Céphalosporines : Ceftiofur |
| Aminosides et apparentés | Dihydrostreptomycine (DHS), Gentamycine, Néomycine, Spectinomycine, Framycétine |
| Quinolones | Acide oxolinique, Fluméquine, Enrofloxacin, Difloxacin, etc |
| Tétracyclines | Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline |
| Polypeptides | Colistine (polymyxine E) |
| Macrolides et apparentés | Érythromycine, Josamycine, Lincomycine, Spiramycine, Tylosine, Tilmicosine, Tiamuline (pleuromutiline) |
| Sulfamides | Sulfadiazine, Sulfadimidine, Sulfadiméthoxine, Sulfaquinoxaline |
| Diaminopyrim-idines | Triméthoprime |

8. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES EN TANT QU'ADDITIFS

8.1. DEFINITION D'ADDITIF

Un additif est défini selon l'Union Européenne comme étant toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique au stade de leur fabrication, transformation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage, a pour effet qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant de ces denrées alimentaires, (Pujol-Dupuy, 2004).

8.2. LES EFFETS DES ADDITIFS

Selon Guillemot (2006) les additifs sont ajoutés aux aliments pour animaux ou à l'eau pour remplir notamment une ou plusieurs des fonctions suivantes :

- avoir un effet positif sur les caractéristiques des aliments pour animaux
- avoir un effet positif sur les caractéristiques des produits d'origine animale
- répondre aux besoins nutritionnels des animaux

- avoir un effet positif sur les conséquences environnementales de la production animale
- avoir un effet positif sur la production, le rendement ou le bien être des animaux notamment en influençant la flore gastro-intestinale ou la digestibilité des aliments pour animaux
- avoir un effet coccidiostatique ou histomonostatique

Le règlement n° 1831/2003 du 22/11/2003 du CEE prévoit la suppression définitive de l'usage des antibiotiques comme additifs en alimentation animale. Dans ce contexte, l'utilisation des 4 antibiotiques (Monensin : E714, Salinomycine : E716, Avilamycine : E717 et Flavophospholipol : E712) a été supprimée fin 2005. Il est important de noter que certains additifs antibiotiques sont encore largement utilisés dans différents pays. Les données disponibles pour la France sont présentées dans le tableau (9).

Tableau n° 9 : Liste des antibiotiques autorisés comme additifs en France, (Gurérin-Faublée, 2001).

| Molécule | Animaux | Teneur en ppm dans l'aliment complet | Age maximal d'administration |
|--|--|---|-------------------------------------|
| Orthosomycines Avilamycine* (E717) | Porcelets | 20 à 40 | 4 mois |
| | Porcs | 10 à 20 | 6 mois |
| | Poulets d'engraissement | 2.5 à 10 | - |
| | Dindons | 5 à 10 | - |
| Bambermycines Flavophospholipol (E712) | Poules pondeuses | 2 à 5 | - |
| | Dindons | 1 à 20 | 26 semaines |
| | Toutes volailles sauf canards, oies, pigeons | 1 à 20 | 16 semaines |
| | Porcelets | 10 à 25 | 3 mois |
| | Porcs | 1 à 20 | 6 mois |
| | Animaux à fourrure sauf lapin | 2 à 4 | - |
| | Veaux | 6 à 16 | 6 mois |
| | Bovins à l'engrais | 2 à 10 | - |

| | | | |
|----------------------------------|--------------------|---------|--------|
| | Lapins | 2 à 4 | - |
| Ionophores polyéthers | Porcelets | 30 à 60 | 4 mois |
| | Porcs | 15 à 30 | 6 mois |
| Salinomycine (E716) | | | |
| Monensin* (E714) | Bovins à l'engrais | 10 à 40 | - |

8.3. ACTIONS DES ANTIBIOTIQUES EN TANT QUE FACTEUR DE CROISSANCE

Après la naissance la flore intestinale des animaux se développe. Des microorganismes proviennent de la mère et de l'environnement. Cette flore va se localiser dans les différentes portions du tube digestif en fonction de l'adéquation entre les besoins des espèces bactériennes et les conditions locales. Elle comporte à la fois une flore endogène dominante et sous-dominante fortement impliquée dans les phénomènes digestifs et une flore d'opportunité composée de bactéries saprophytes pouvant être pathogènes. Si cette flore se multiplie exagérément, cela peut provoquer des manifestations cliniques. Mais à l'inverse, si elles se développent en bas bruit, cela affecte les performances zootechniques des animaux. Ainsi les antibiotiques exercent leur action sur la flore endogène et d'opportunité. Par ce biais, les facteurs de croissance permettent d'amoindrir les effets négatifs dus aux déséquilibres rencontrés lors de certaines périodes critiques de l'élevage ou dus à leurs conditions de vie insalubres. A faibles doses dans l'alimentation, ils permettent d'éviter ces déséquilibres en agissant sur les flores perturbatrices, généralement cataboliques. Par conséquent, les facteurs de croissance permettent une stimulation de l'anabolisme de l'animal. Les doses utilisées (de quelques mg à 50 mg/kg d'aliment) ne sont ni bactéricides ni bactériostatiques en regard de celles (quelques centaines de mg/kg) mises en œuvre dans les aliments médicamenteux, mais elles exercent un effet métabolique chez certaines espèces bactériennes qui se traduit par une modification des conditions de compétition au sein de ces flores complexes, (Corpet, 1999).

Les avantages observés au plan nutritionnel et environnemental sont :

- l'amélioration de l'indice de consommation (IC : quantité de matière sèche consommée pour produire 1kg de poids vif de l'animal) et de la vitesse de croissance (GMQ : gain moyen quotidien de poids vif)

- la réduction de l'excrétion de matières azotées, de phosphore et de méthane. Sur le plan quantitatif, il y a des résultats variables en termes d'amélioration de l'IC et du GMQ, mais en moyenne ils sont tous nettement positifs, (Devie et al, 2006)

La figure (6) résume les mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les antibiotiques.

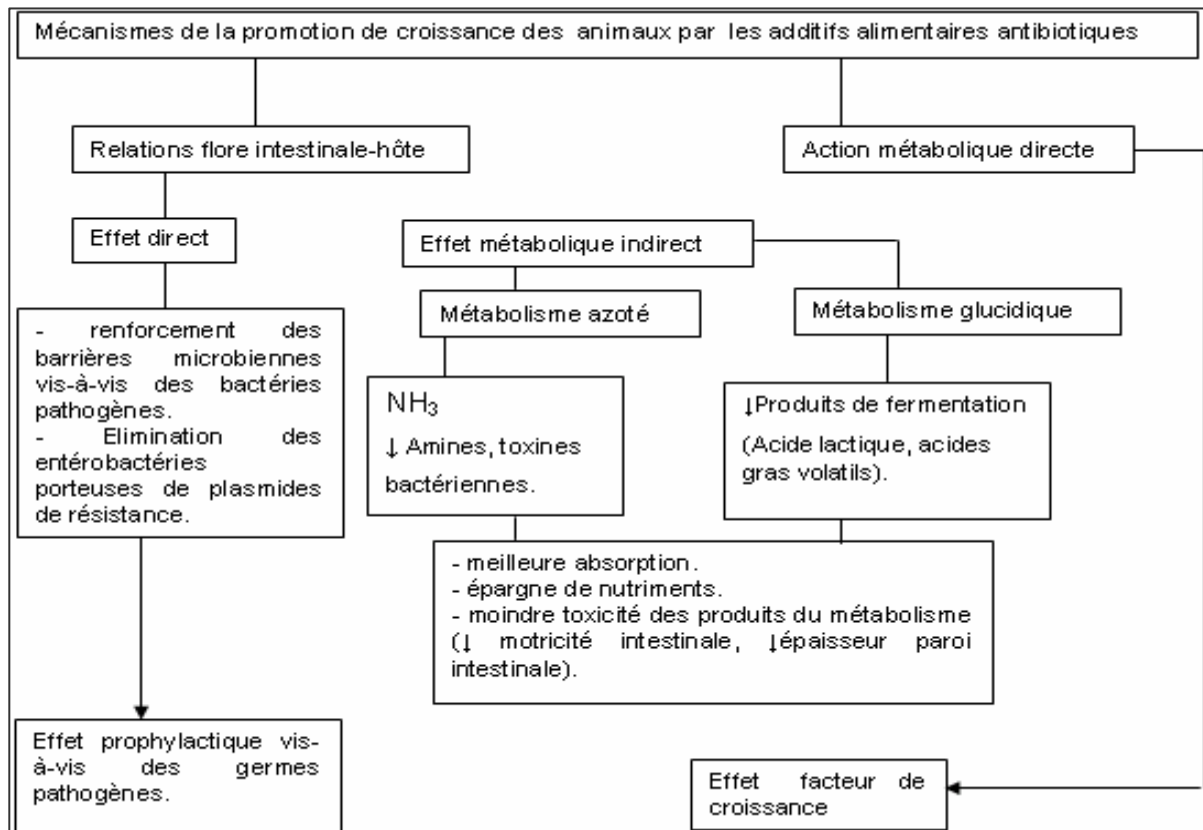


Figure n° 6 : Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les antibiotiques, (Frayssé et Darré, 1990).

9. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES

9.1. CRITERES DE CLASSIFICATION

Selon Duval et Soussy (1990) ; Anonyme 3 a (2006) ; Fontaine (1992) les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

- leur origine (biosynthétisés par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, issus du génie chimique)

- leur composition chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques)
- leur activité (antibactériens, antifongiques, antimétabolites). Nous nous intéresserons ici uniquement aux antibiotiques à activité antibactérienne.
- mode d'action
- modalité d'action

De toutes ces classifications possibles, la classification la plus courante est celle par famille, possédant un certain nombre de caractères communs : composition chimique ou origine, spectre d'action similaire ou très rapproché, cibles bactériennes identiques, résistance bactérienne et sensibilisation croisée, effets indésirables rapprochés, etc., (Duval et Soussy, 1990) ; (Maur, 1990).

9.2. CLASSIFICATION

9.2.1. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LEUR ORIGINE

Les anti-infectieux peuvent être produits de trois façons, par fermentation (naturelle), par semi-synthèse ou par synthèse chimique.

9.2.1.1. fermentation ou extraction

Les antibiotiques sont fondamentalement des substances naturelles issues du métabolisme azoté de divers micro-organismes, (Maur, 1990) ; (Mevius et al, 1999) ; (Puyt et Guérin-Faubleé, 2006) :

- soit des champignons inférieurs (mycètes) : du genre *Penicillium* pour les Pénicillines, Griséofulvine et genre *Céphalosporium* pour les Céphalosporines
- soit des bactéries : du genre *Streptomyces* (90 % des antibiotiques sont produits par des bactéries du genre *Streptomyces*) et genre *Bacillus*. Comme antibiotiques dont l'origine est bactérienne on trouve, la Bacitracine, Polymyxine-Colistine, Mupirocine, Céphamycines, Monobactames (les Monobactames obtenues initialement par extraction, sont obtenues actuellement par synthèse)

9.2.1.2. semi-synthèse

Les antibiotiques ainsi produits par voie fermentaire sont parfois utilisés pour la préparation de dérivés artificiels voisins, mais qu'il est impossible de faire sécréter par la souche microbienne, même en recourant à des précurseurs.

Dans ce but, on fait subir certains traitements chimiques simples à des antibiotiques produits par voie fermentaire, notamment des hydrolyses pour séparer la partie fondamentale de la molécule, trop complexe pour être préparée par synthèse à un coût raisonnable ; on greffe ensuite sur ce squelette de base différents groupements particuliers grâce à des estérifications ou des amidifications.

On obtient ainsi des antibiotiques de semi-synthèse. C'est le cas des pénicillines ou des céphalosporines dont la plupart des représentants sont ainsi produits. Certains sont des pro-drogues antibiotiques, totalement dénuées par elles-mêmes d'activité biologique mais qui acquièrent leur pouvoir antimicrobiens après hydrolyse de la fonction ester qui a été greffée, (Mevius et al, 1999) ; (Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

9.2.1.3. synthèse chimique totale

Certains antibiotiques dont la structure est assez simple sont produits plus économiquement par synthèse que par fermentation. C'est le cas du Florphénicol, Chloramphénicol, Monobactames, et tous les agents antibactériens de synthèse : Sulfamides, Triméthoprime, Quinolones, Nitrofuranes, etc.

Le fait que certains antibiotiques (Chloramphénicol, Aztréonam etc.) obtenus au début par fermentation sont actuellement produits par synthèse chimique, fait de plus en plus disparaître la distinction initiale entre antibiotiques et agents antibactériens de synthèse, (Maur, 1990) ; (Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

9.2.2. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LA STRUCTURE CHIMIQUE

Très variable, souvent une structure de base comme le cycle β -lactame (famille des Bêtalactamines) sur laquelle il y a hémi synthèse. Elle donne souvent, le nom à la famille (Anonyme 3 a, 2006).

9.2.3. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LA CIBLE BACTERIENNE

Selon la cible bactérienne au niveau de la quelle ils agissent, les antibiotiques peuvent être classés en quatre groupes :

9.2.3.1. antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne

Contrairement aux cellules animales, les bactéries possèdent une enveloppe extérieure rigide : la paroi. C'est elle qui lui donne sa forme, et la protège des perturbations osmotiques que pourrait lui imposer le milieu environnant. Cette structure est tout à fait originale. Ainsi tout antibiotique agissant spécifiquement sur cette paroi, aura une grande sélectivité d'action et sera dépourvu d'effets sur les cellules animales.

La paroi est constituée essentiellement de peptidoglycane, ou mucopeptide, qui est une macromolécule polysaccharidique constituée par une succession régulière d'acétoglucosamine et d'acide N-acétylmuramique. Ces acides aminés sont attachés en petits peptides et ceux-ci sont reliés entre eux par des ponts peptidiques conférant une grande rigidité à l'ensemble. Cette transpeptidation est la dernière étape de la synthèse de la paroi bactérienne et elle se fait sous l'influence d'une enzyme, la transpeptidase, (Bourin et al, 1993).

Privées de leur paroi, les bactéries deviennent molles, fragiles et sans défense vis-à-vis des agressions mécaniques et des perturbations osmotiques ; on les appelle alors des protoplastes ou sphéroplastes, et leur vie est brève.

Les antibiotiques agissant de cette façon sont soit des inhibiteurs sélectifs de synthèse de la paroi bactérienne grâce à leur ressemblance structurale avec les acides aminés sur les quels agit la transpeptidase. Ils se fixent sur cet enzyme et inhibent son action, empêchant ainsi la formation des ponts poly-glycines du mucopeptide pariétal rigides, soit des inhibiteurs du transfert et de la polymérisation du mucopeptide pariétal, soit enfin des inhibiteurs de la première phase de l'utilisation de l'alanine au niveau de la paroi. Parmi ces antibiotiques on trouve les Béta-lactamines, Vancomycine, Fosfomycine, et la Cyclosérine, (Maur, 1990) ; (Bourin et al, 1993) ; (Anonyme 3 a, 2006).

9.2.3.2. antibiotiques agissant au niveau de la membrane cytoplasmique

Ces antibiotiques agissent même sur les bactéries en phase de repos. Ils exercent une action directe et immédiate sur la membrane cytoplasmique. Cette action est comparable à celle des antiseptiques surf actifs. Parmi ces antibiotiques, on trouve la tyrothricine, les polypeptides cycliques, poly myxines, colistine...etc., (Bourin et al, 1993), (Maur, 1990), (Anonyme 3 a, 2006).

9.2.3.3. antibiotiques agissant au niveau des ribosomes

Ces antibiotiques inhibent la synthèse des protéines bactériennes par action sur les ribosomes, (Maur, 1979 et 1990), (Anonyme 3 a, 2006) :

- inhibition au niveau des sous unités 30 S des ribosomes : Aminoglycosides (lecture de l'ARN_m est perturbée)
- inhibition au niveau des sous unités 50 S des ribosomes : soit par inhibition du site A (aminoacyl) avec translocation perturbée pour les macrolides, soit par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN pour les tétracyclines, soit par inhibition du facteur d'élongation EF-G pour l'acide fusidique, soit enfin par inhibition de la fixation de l'aminoacyl-tARN et l'inhibition de la peptidyltransférase pour les Phénicolés

9.2.3.4. antibiotiques agissant au niveau de la biosynthèse des acides nucléiques

Selon Anonyme 3 a (2006) ces antibiotiques inhibent soit :

- la réplication de l'ADN : inhibition de l'ADN-gyrase ou topoisomérase II (sous unité A), c'est le cas des quinolones
- la transcription de l'ARN : inhibition de l'ARN polymérase-ADN dépendante (sous unité B), c'est le cas des rifamycines

9.2.3.5. antibiotiques agissant par autres mécanismes

Ces antibiotiques agissent en tant qu'antimétabolites bactériens en inhibant une des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries. C'est le cas des sulfamides, triméthoprim (qui inhibent la dihydroptéroate synthétase : DHPS), et l'isoniazide (analogues structuraux du NAD), (Anonyme 3 a, 2006).

9.2.4. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LE SPECTRE D'ACTIVITE

Chaque antibiotique est caractérisé par un spectre qui correspond à l'éventail des germes qu'il peut toucher, à dose plus ou moins élevée. Il est différent pour chaque famille d'antibiotiques, bien qu'il puisse se recouper, en partie ou en totalité, avec celui d'autres antibiotiques, c'est à dire que les mêmes germes peuvent être sensibles à plusieurs antibiotiques à la fois. On a ainsi des antibiotiques à spectre très large, large, moyen, ou étroit, (Maur, 1979).

Ce spectre va guider le vétérinaire dans son choix, même si les sensibilités mesurées en laboratoire ne sont pas forcément celles obtenues en élevage. Les

bactéries, en effet, peuvent acquérir des résistances et un certain nombre d'entre elles ne manquent pas d'imagination pour se protéger des antibiotiques, (Anonyme 4, 2003) ; (Anonyme 1 a, 2007).

9.2.5. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES PAR FAMILLE

Les antibiotiques sont divisés en familles (tableau 10) ; le classement n'est pas tout à fait cohérent, puisque le point commun des divers antibiotiques d'une classe peut être tantôt chimique (les bêta-lactamines, les sulfamides, les polypeptidiques, les aminosides, les macrolides, les fluoroquinolones), tantôt une bactérie sur laquelle ils sont efficaces (les antituberculeux, les antistaphylococciques). Il peut s'y rajouter une notion de moment d'apparition : ex : céphalosporines de 1^{ère}, de 2^{ème}...génération.

Les familles chimiques contiennent plusieurs molécules, dont les spectres d'action sont semblables, mais non identiques, et les effets indésirables assez voisins. D'où l'intérêt de savoir toujours situer un antibiotique dans sa classe, même si les différentes molécules d'une classe peuvent parfois être très différents en terme de devenir dans l'organisme, (Anonyme 3 d, 2006).

Tableau n° 10 : Classification des antibiotiques par famille, (Gogny et Puyt, 2001).

| |
|---|
| <p>1- Bétalactamines</p> <p>Antibiotiques bactéricides, actifs par voie orale (à l'exception de la benzylpénicilline ou pénicilline G), de distribution extracellulaire, caractérisés par une forte élimination urinaire.</p> |
| <p>1.1. Pénicillines</p> |
| <p>1.1.1. Pénicillines du groupe G</p> <p>Spectre d'activité : bactéries à Gram positif et pasteurelles.</p> <p>Sensibles aux β-lactamases.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Benzylpénicilline (pénicilline G), action immédiate : sel sodique ; action semi retard : sel de procaïne ; action retard : sel de benzathine - Pénéthacilline (ester basique et lipophile dérivé de la pénicilline G qui favorise la distribution intracellulaire et l'élimination mammaire) |
| <p>1.1.2. Pénicillines du groupe M</p> <p>Spectre d'activité identique à celui de la benzylpénicilline mais étendu aux staphylocoques producteurs de β-lactamases.</p> <p>Résistantes aux pénicillinases staphylococciques.</p> |

Sel sodique d'action brève réservée au traitement des mammites en cours de lactation, sel de benzathine à action prolongée réservée au traitement des mammites hors lactation) :

- Oxacilline et Cloxacilline (sels sodique ou de benzathine),
- Dicloxacilline et Nafcilline (sels sodique).

1.1.3. Pénicillines du groupe A

Spectre d'activité élargi aux bactéries à Gram négatif.

Résistantes aux pénicillinases des bactéries à Gram négatif mais sensibles aux pénicillinases staphylococciques : Ampicilline, Amoxicilline.

1.2. Céphalosporines

Antibiotiques à large spectre antibactérien. Activité de plus en plus prononcée sur les bactéries à Gram négatif de la première à la quatrième génération.

Résistances accrue vis-à-vis des β -lactamases par rapport aux pénicillines du groupe A.

| Génération | Antibiotique |
|----------------------|--|
| Première génération | Céfalexine Céfapirine Céfazoline |
| Deuxième génération | Céfalonium Céfuroxime |
| Troisième génération | Ceftiofur Céfopérazone |
| Quatrième génération | Cefquinome |

1.3. Acide clavulanique

Bêtalactamine dépourvue d'action antibactérienne mais à forte activité inhibitrice sur les bêta-lactamases bactériennes, d'où un effet synergique en association avec les pénicillines et des céphalosporines. Seule l'association avec l'Amoxicilline est disponible.

2. Aminosides (aminocyclitols)

Antibiotiques bactéricides, dénués d'activité sur les bactéries anaérobies, non résorbés par voie digestive, à distribution extracellulaire et élimination urinaire.

Spectre d'activité : étroit, essentiellement bactéries anaérobies à Gram négatif pour la plupart ; spectre large (bactéries à Gram positif et négatif) pour la gentamicine.

Inactives sur les bactéries anaérobies.

Résistances se développant rapidement.

- Dihydrostreptomycine, Framycétine, Kanamycine, Néomycine, Gentamicine, Apramycine
- Spectinomycine (aminocyclitol apparenté aux aminosides, caractérisé par une action bactériostatique avec un spectre étendu aux mycoplasmes ainsi que par une moindre toxicité (néphrotoxicité et ototoxicité)

3. Tétracycline

Antibiotiques bactériostatiques, à spectre large, résorbés par voie digestive.

- Tétracycline, Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline

4. Phénicolés

Antibiotiques bactériostatiques à large spectre, résorbés par voie digestive et à large diffusion dans l'organisme.

- Chloramphénicol (antibiotique interdit chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR), Thiamphénicol (uniquement disponible en aérosols) et Florfénicol

5. Macrolides et apparentés

5.1. Macrolides

Antibiotiques bactériostatiques, à spectre étroit surtout dirigé vis-à-vis des bactéries à Gram positif, des mycoplasmes, et pour certains composés vis-à-vis des pasteurelles, résorbés par voie digestive, à forte distribution intracellulaire et à fortes concentration dans les sécrétions acides (lait dans toutes les espèces, urine et salive des carnivores)

- Érythromycine, Oléandomycine, Spiramycine (également additif), Tylosine (également additif), Josamycine, Tilmicosine

5.2. Apparentés aux macrolides

Antibiotiques apparentés aux macrolides par leur activité antibactérienne.

- Lincosamides (clindamycine et lincomycine), Rifamycines (rifaximine)
- Pleuromutilines: antibiotiques actifs sur les mycoplasmes, les tréponèmes, *Hemophilus* et *Campylobacter*, résorbés par voie digestive. Tiamuline
- Synergistines : virginiamycine (exclusivement additif)
- Autres : novobiocine, acide fusidique

6. Antibiotiques polypeptidiques

6.1. Polymyxines

Antibiotiques bactéricides à spectre étroit dirigé contre les bactéries à Gram négatif, non résorbés par voie digestive, à distribution extracellulaire et élimination urinaire.

- Colistine (polymyxine E), Polymyxine B (usage local exclusivement)

6.2. Antibiotiques polypeptidiques non tensio-actifs

Antibiotiques bactériostatiques à spectre étroit dirigé contre les bactéries à Gram positif, non résorbés par voie digestive.

- Bacitracine (additif également sous forme de sel de zinc)
- Tyrothricine, Thiostrepton (antibiotique polypeptidique soufré)

7. Sulfonamides antibactériens

Dérivés de l'acide para-amino-benzoïque, bactériostatiques, à large spectre d'activité antibactérienne (bactéries à Gram positif et négatif) ainsi que parfois anticoccidienne, en majorité résorbés par voie digestive.

7.1. Sulfonamides d'action générale

7.1.1. Sulfamides à brève durée d'action (3 à 6 heures)

- Sulfamérazine, Sulfadimidine (sulfadimérazine)

7.1.2. Sulfamides semi-retard (6 à 10 heures)

- Sulfapyridine, Sulfaméthoxazole, Sulfanilamide, Sulfadiazine

7.1.3. Sulfamides retard (10 à 24 heures)

- Sulfaméthoxypyridazine, Sulfadiméthoxine, Sulfadoxine.

7.2. Sulfonamides d'action digestive

Sulfamides pratiquement pas résorbés par voie digestive.

- Sulfaguanidine, Phtalylsulfathiazole.

7.1.5. Sulfamides cocccidiostatiques

8. Diaminopyrimidines

Antibactériens bactériostatiques à large spectre d'activité, possédant une synergie d'action (effet bactéricide) en association avec des sulfamides, bien résorbés par voie orale et présentant une distribution intracellulaire : Triméthoprime, Baquiloprime.

9. Quinolones

Antibactériens bactéricides, dénués d'activité sur les bactéries anaérobies, bien résorbés par voie orale.

| Génération | Antibiotique |
|----------------------|---|
| Première génération | Acide oxolinique : Spectre antibactérien étroit (bactéries à Gram négatif : entérobactéries). |
| Deuxième génération | Fluméquine : Spectre antibactérien plus large (bactéries à Gram négatif et à Gram positif), distribution tissulaire élargie. |
| Troisième génération | Enrofloxacin, Marbofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin et sarafloxacin (en développement) : Spectre antibactérien large, y compris sur les mycoplasmes ; excellente distribution tissulaire et action à très faible concentration. |

10. Nitrofuranes

Composés bactériostatiques à spectre large, tous interdits chez les espèces dont les

productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR.

Nitrofuranes d'action générale : Résorbés par voie digestive. Furaldone, Nitrofurantoïne (action urinaire).

Nitrofuranes d'action locale digestive : Peu absorbés par voie digestive, mais risques d'intoxication lors de surdosage (chez veaux et volailles) : Furazolidone.

11. Nitro-imidazoles

Activité mixte à la fois antibactérienne à spectre étroit (aérobies à Gram positif, anaérobies à Gram positif et négatif, fusiformes et spirochètes : *Treponema hyodysenteriae*, *Fusiformis*) et antiparasitaire protistocide (*Trichomonas*, *Histomonas*, *Balantidium*).

Le dimétridazole et le ronidazole (prochainement le métronidazole) sont interdits chez les espèces dont les productions sont destinées à la consommation humaine par absence de LMR. Les autres nitro-imidazoles utilisés comme médicaments en

productions animales seront interdits au 1er janvier 98, si des LMR ne sont pas fixés rapidement avant cette date. À noter toutefois que ces interdictions ne portent pas sur les utilisations des nitro-imidazoles comme additif en alimentation animale.

- Diméridazole (aussi additif), Métronidazole (carnivores domestiques), Ronidazole (aussi additif), Carnidazole (pigeons), Ipronidazole (exclusivement additif).

12. Hydroxyquinoléines

Composés bactériostatiques, spectre d'activité large (bactéries à Gram positif et négatif, protozoaires, certains champignons, utilisés essentiellement en antiseptie externe : Oxyquinol (oxyquinoléine), Clioquinol (chloriodoquine).

13. Polyéthers ionophores (exclusivement additifs)

Antibiotiques à la fois antibactériens bactéricides, à spectre étroit (bactéries à Gram positif), et antiprotozoaires (anticoccidiens), utilisés exclusivement à titre d'additifs alimentaires comme facteurs de croissance et anticoccidiens.

- Monensin, Lasalocide, Narasin, Salinomycine, Maduramycine, Avilamycine, Semduramicine (additif en développement).

14. Quinoxaline N-dioxydes (exclusivement additifs)

Facteurs de croissance à large spectre antibactérien utilisés uniquement en tant qu'additifs : Carbadox, Olaquinox.

15. Antibiotiques divers

- Avoparcine, Flavophospholipol et Efortomycine (exclusivement additifs).

10. ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES

Selon Cohen et Jaquot (2001) ; Puyt, Anonyme 2 a (2005) et Guérin-Faubleé (2006) 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
- et afin de limiter les effets indésirables, notamment la toxicité de certains antibiotiques en réduisant les doses de chacun

11. PHARMACOCINETIQUE DES ANTIBIOTIQUES

Pour éradiquer une infection, l'antibiotique doit parvenir à son site d'action, c'est-à-dire atteindre les germes situés dans une structure donnée d'un organe, dans une cellule ou dans des liquides extra / péri-cellulaires, à des concentrations adéquates, et cela, pendant le temps nécessaire. Ce passage du lieu d'administration jusqu'au site (s) d'action se fait en quatre phases différentes, (Anonyme 3 e, 2006).

11.1. L'ABSORPTION

L'absorption d'une molécule, c'est-à-dire son passage du site d'administration à la circulation sanguine est fonction à la fois des propriétés de la molécule et des modalités d'administration notamment de la voie (orale, parentérale) et de la formulation du médicament, (Guillemot, 2006). Elle doit permettre le passage du médicament du site d'administration vers la circulation générale, pour que l'antibiotique puisse ensuite parvenir au site de l'infection. Certaines classes d'antibiotiques ont une bonne absorption digestive (macrolides, tétracyclines, sulfamides). Pour d'autres classes, l'absorption est nulle (aminosides, polypeptides), et la voie injectable est nécessaire pour obtenir un effet systémique. Enfin, dans certaines classes d'antibiotiques (béta-lactamines), certaines molécules sont bien absorbées, ce qui permet l'administration orale alors que d'autres devront être injectées, (Anonyme 3 e, 2006).

Pour les antibiotiques administrés par voie orale, il peut exister des interactions gênantes : ainsi, l'absorption des tétracyclines est très diminuée par l'ingestion concomitante de sels d'aluminium, de fer ou de calcium. L'absorption peut aussi être modifiée (en plus ou en moins) lorsqu'il existe chez un malade une pathologie du tube digestif, (Anonyme 3 d, 2006) ; (Anonyme 3 e, 2006).

11.2. LA DISTRIBUTION

L'antibiotique parvient au site de l'infection plus ou moins bien : certains organes sont mieux irrigués que d'autres ; le site même de l'infection peut être mal irrigué

(amas fibrino-leucocytaire de végétations valvulaires cardiaques, abcès entouré d'une coque). Les germes peuvent être situés dans le sang ou dans les espaces extracellulaires, ou à l'intérieur de cellules qui les ont phagocytés. Lorsque le passage de l'antibiotique du sang vers un site d'infection se fait par diffusion passive, Il se fera d'autant mieux que le gradient des concentrations (de la forme libre, seule diffusible) entre le plasma et les tissus sera important. Dans ce but, on peut même chercher un mode d'administration qui procure des concentrations les plus élevés possibles (des pics), avec pour limite la toxicité propre éventuelle de l'antibiotique. La pénétration dans le système nerveux, l'œil et la prostate sont dépendants d'un transport actif. Si les bactéries se développent à l'intérieur de cellules, il faudra que les antibiotiques puissent y parvenir, sous une forme active ; un pH intra cellulaire plus ou moins acide ou basique modifie la vitesse de traversée des membranes des molécules, plus ou moins ionisées.

Les quinolones, la rifampicine, l'isoniazide, l'association sulfaméthoxazole – triméthoprime pénètrent particulièrement bien.

L'administration d'une molécule à une dose et à un rythme donné peut donc être efficace sur une infection causée par un germe donné si elle est située dans un organe, et pas efficace si elle est située dans un autre. Le tube digestif, les méninges, la prostate, l'os ou les cavités urinaires par exemple posent des problèmes d'accès très différents, (Anonyme 3 d, 2006).

11.3. LES TRANSFORMATIONS

Comme tout les médicaments, les antibiotiques peuvent subir des transformations, en métabolites, actifs ou non sur les bactéries, toxiques ou non (c'est à dire induisant des effets indésirables). Les substances actives peuvent être métabolisées par différents organes. Si toutes les cellules de l'organisme possèdent une capacité métabolique de base, certains organes ont une capacité métabolique importante (foie, rein, poumon). La transformation d'une molécule par le métabolisme dépend de la structure de la molécule et des voies métaboliques exprimées chez l'animal. Certaines molécules sont rapidement dégradées en métabolites inactifs au plan de l'activité antimicrobienne tandis que d'autres sont peu métabolisées ou que le métabolisme conduit à des métabolites actifs au plan microbiologique, (Guillemot, 2006).

11.4. EXCRETION

Les concentrations dans un certain nombre de sécrétions ou excréta de l'organisme (bile, urine, lait, salive, mucus pulmonaire, sécrétion intestinale, sueur, etc.) varient au cours du temps en fonction des modalités d'excrétion passive ou active de la molécule et de ses métabolites. L'étude de la cinétique plasmatique d'une molécule après administration intraveineuse et la mesure des quantités émises sous forme de substance parentale et de métabolites, estimée sur la base des concentrations moyennes mesurées sur des quantités d'excréta collectés au cours du temps, permet de mesurer la clairance totale et la part relative de la clairance métabolique et de la contribution des principaux organes d'élimination. La capacité d'élimination d'un principe actif, est exprimée par la clairance totale (ou clairance plasmatique) qui est la somme des différentes clairances (clairance métabolique du foie, clairance d'excrétion biliaire, clairance d'excrétion rénale...). Ces clairances peuvent présenter de grandes variabilités interspécifiques.

Compte tenu de la complexité des étapes impliquées dans la pharmacocinétique d'un antibiotique, les concentrations mesurées à un instant chez différents animaux traités à la même dose, avec le même médicament, par la même voie d'administration, ont une variabilité importante qui s'accroît avec le temps, (Guillemot, 2006).

CHAPITRE III

LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LES ALIMENTS ET LE RISQUE POUR LE CONSOMMATEUR

Au cours de leur vie, les animaux doivent parfois être traités avec des antibiotiques destinés à prévenir ou à guérir certaines maladies infectieuses. Il arrive que des résidus de ces médicaments aboutissent dans des produits alimentaires (viande, lait ou œufs, par exemple) provenant d'animaux producteurs d'aliments tels que bovins, ovins, volailles et poissons. Néanmoins, ces résidus ne doivent pas être nocifs pour les consommateurs. Afin de garantir un niveau élevé de protection des consommateurs, la législation communautaire européenne subordonne l'autorisation d'utilisation d'une substance médicamenteuse chez des animaux producteurs d'aliments à l'évaluation de la toxicité des résidus potentiels. Lorsque cela s'avère nécessaire, des limites maximales de résidus (LMR) sont fixées et, dans certains cas, l'utilisation de la substance concernée est interdite, (Châtaigner et Stevens, 2005).

1. LES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

1.1. DEFINITION DU RESIDU

Ce sont toutes les substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse des principes actifs, d'excipients ou de produits de dégradation, ainsi que leurs métabolites restant dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux auxquels le médicament vétérinaire en question a été administré, (Article 1, point 1, du règlement (CEE) n°2377/90), (Milhaud et Pinault, 1999) ; (Pouliquen et Le Bris, 2001) ; (Kölbener et al, 2005).

1.2. FACTEURS DE PERSISTANCE DES RESIDUS

Selon Châtaigner et Stevens (2005) la persistance de résidus varie selon plusieurs facteurs :

- l'antibiotique lui-même
- la forme pharmaceutique
- les modalités d'injection

- le site d'injection
- la dose injectée
- la sévérité de l'irritation locale
- facteurs liés à l'animal

1.3. CONSEQUENCES NEGATIVES DE L'UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES CHEZ LES ANIMAUX

Les conséquences négatives de l'utilisation des antibiotiques chez les animaux sont :

- présence de résidus dans les produits alimentaires d'origine animale (si les délais d'attente avant l'abattage ne sont pas respectés), (Klotins, 2006)
- contamination de l'environnement (excrétion des antibiotiques par les fèces, urines...), (Klotins, 2006)

Selon Scippo (2008) ces conséquences sont surtout dues aux mauvaises pratiques :

- produits du marché noir
- administration sans prescription vétérinaire
- non respect des doses et des délais d'attente

2. LES RISQUES PRESENTES PAR LES RESIDUS

Selon Scippo (2008) les risques présentés par les résidus suite à leur utilisation chez les animaux sont de quatre ordres :

- risques pour la santé publique
- risques pour la santé animale
- risques pour l'environnement
- et des risques d'ordre technologique

2.1. RISQUES POUR LA SANTE PUBLIQUE

2.1.1. TOXICITE DIRECTE

- les antibiotiques dont l'utilisation est actuellement interdite et qui présentent plus de toxicité sont le chloramphénicol et nitrofurannes
- les nitrofurannes sont soupçonnés de fœto-toxicité
- certains sulfamides sont fœtotoxiques à forte dose. Ces molécules passent dans le lait maternel, et sont toxiques pour les nourrissons de moins d'un

mois. Ils ont des Effets néfastes sur le matériel génétique et notamment l'ADN, sur la reproduction, la fertilité, et une toxicité pour le système nerveux, et le système immunitaire, (Châtaigner et Stevens, 2005)

2.1.2. LES REACTIONS ALLERGIQUES

On note des réactions allergiques chez des personnes déjà sensibilisées (risques très faibles si les LMR sont respectées).

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des bêtalactames. Quand aux macrolides, ils causent peu d'effets secondaires et seulement très peu d'entre eux semblent causés par des mécanismes allergiques. Cependant, compte tenu des très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotique administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu, (Châtaigner et Stevens, 2005).

2.1.3. L'ACQUISITION DE RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES

Toute utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire ou en médecine humaine accroît les risques d'apparition de bactéries résistantes. Les risques les plus grands sont associés à certaines pratiques d'administration des antibiotiques, comme celles qui consistent à administrer simultanément le produit à tout un troupeau, à administrer le produit de façon prolongée ou de sur utiliser un même antimicrobien. Aucun lien direct n'a été établi entre l'usage d'antibiotiques comme stimulateurs de croissance dans les élevages et les antibio-résistances apparues chez les humains. Des chercheurs étudient cependant la possibilité qu'un tel lien puisse exister, (Klotins, 2006).

2.1.3.1. définition de la résistance

La capacité d'adaptation d'une bactérie dans un milieu contenant des agents chimiques néfastes pour elle est connue depuis longtemps. La résistance aux antibiotiques peut être définie selon différents points de vue, (Bourin et al, 1993) :

- pour le clinicien, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si le traitement n'est pas efficace (on ne peut plus l'éradiquer par l'antibiothérapie), (Bourin et al, 1993)

- pour le pharmacologue, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si les concentrations atteintes au site d'action, sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice, (Guillemot, 2006)
- pour le microbiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle dispose d'un mécanisme de résistance augmentant la valeur de la concentration minimale inhibitrice, (Guillemot, 2006)
- pour l'épidémiologiste, une souche bactérienne est résistante à un antibiotique si elle a une concentration minimale inhibitrice significativement différente de celles de la population normale, (Guillemot, 2006)

Ce phénomène de résistance peut être mis en évidence, in vitro, par la croissance du germe en présence de concentrations d'antibiotiques pouvant être atteintes en thérapeutique, (Bourin et al, 1993).

2.1.3.2. modalités d'acquisition et de transmission de la résistance

Pour résister, la bactérie a développé quatre stratégies principales pour empêcher l'interaction entre l'antibiotique et la cible bactérienne (Figure 7) :

- **brouillage** : il s'agit du mécanisme le plus répandu dans la nature. La bactérie synthétise une enzyme qui modifie l'antibiotique et le rend inoffensif. L'inactivation peut être intracellulaire, dans le cas des antibiotiques dont les cibles sont cytoplasmiques (par exemple : les aminosides). En revanche, les bêtalactamines visent des cibles extracellulaires, et doivent donc être inactivées avant leur contact avec la cellule. Des enzymes appropriées appelées bêtalactamases sont excrétées dans le milieu de culture (bactéries à Gram positif : staphylocoques) ou dans l'espace péri plasmique (bactéries à Gram négatif) et interceptent l'antibiotique avant même qu'il n'atteigne sa cible, (Bourin et al, 1993) ; (Oxoby, 2002)
- **camouflage** : la bactérie modifie la cible de l'antibiotique pour la rendre insensible à son action. Il en est ainsi de la résistance aux macrolides chez les bactéries à Gram positif. Par exemple, la cible de l'érythromycine est l'ARN ribosomal 23S. Dans ce cas, les bactéries synthétisent une méthylase qui modifie cet ARN du ribosome bactérien. L'antibiotique n'a plus d'affinité pour le ribosome ainsi modifié, (Bourin et al, 1993) ; (Oxoby, 2002)
- **blindage** : il s'agit d'empêcher l'accès de l'antibiotique à sa cible. Pour cela, la bactérie peut rétrécir ou fermer les canaux qui rendent la membrane

perméable ou synthétiser une pompe membranaire (pompe d'efflux) qui refoule l'antibiotique hors de la bactérie. Sa concentration intracellulaire restera insuffisante pour être toxique. C'est le cas, par exemple, de la résistance à la tétracycline, (Bourin et al, 1993) ; (Oxoby, 2002)

- **esquive** : la bactérie substitue à la cible une autre molécule, non vulnérable. Elle met en place une dérivation métabolique. Deux molécules différentes (l'une sensible, l'autre non) possédant une même fonction coexistent alors dans une même bactérie. Il importe que le phénotype résistant domine le phénotype sensible pour que la résistance soit observée (cas de la résistance aux sulfamides, (Bourin et al, 1993) ; (Oxoby, 2002)

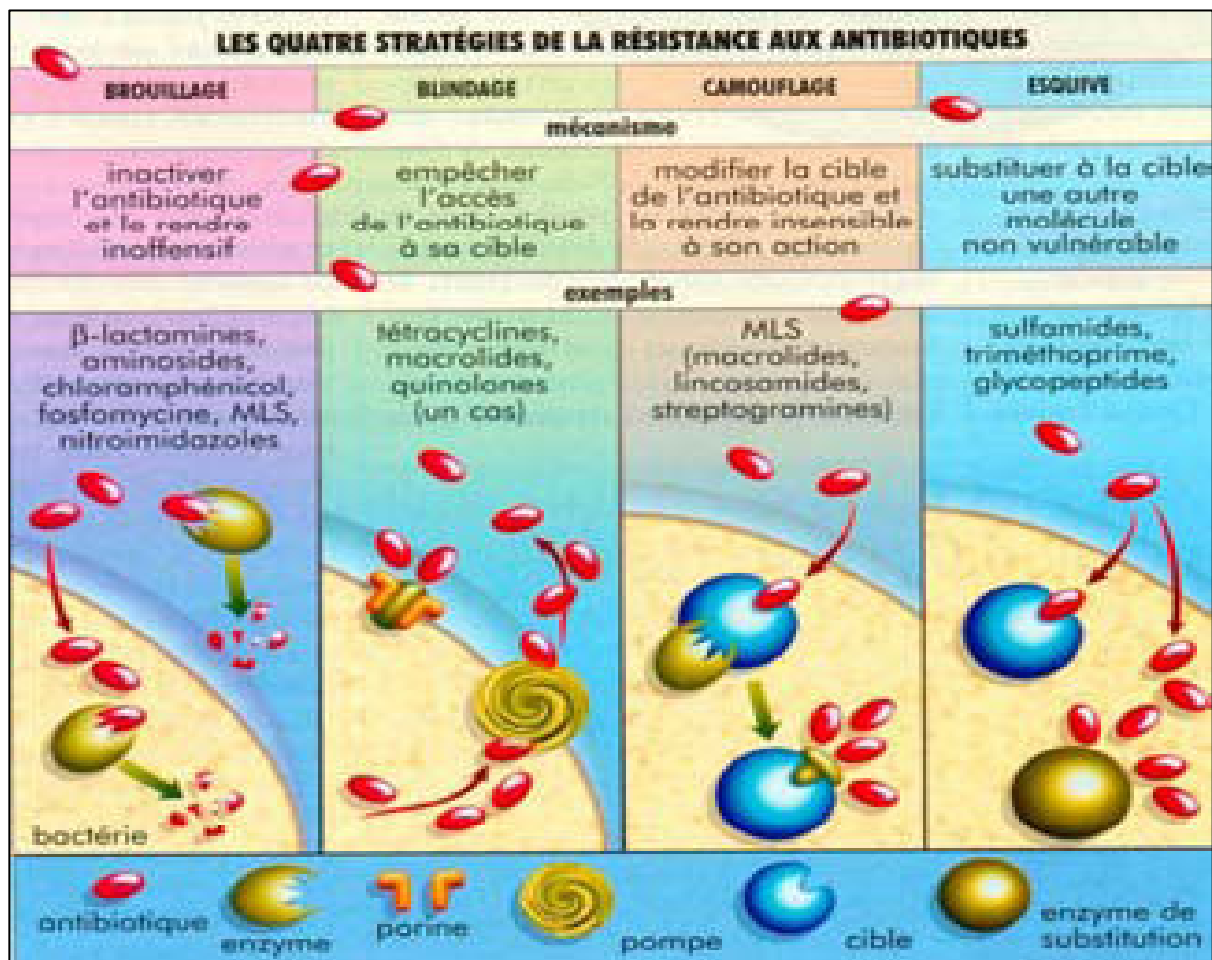


Figure n° 7 : Les quatre stratégies de la résistance aux antibiotiques, (Oxoby, 2002).

On distingue la résistance naturelle ou intrinsèque et la résistance acquise. La première est présente dans toutes les souches de l'espèce considérée et préexiste à l'usage des antibiotiques. Elle constitue une caractéristique propre à l'espèce et

délimite le spectre d'activité des antibiotiques. En revanche, la résistance acquise n'est présente que chez quelques souches d'une espèce normalement sensible et apparaît à la suite de l'utilisation des antibiotiques, (Rod et al 2001) ; (Klotins, 2006).

Sur le plan génétique, deux mécanismes ont été identifiés, (Rod et al 2001) :

- soit une mutation génétique survient sur le chromosome bactérien en présence répétée avec des antibiotiques ; dans ce cas, la résistance est transmise uniquement à la descendance (transmission verticale)
- soit la bactérie acquiert une information génétique provenant d'une autre bactérie déjà résistante via des plasmides ou des transposons ; dans ce cas, la résistance se transmet aussi d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) et d'une espèce à l'autre

2.1.4. LES AUTRES EFFETS POUR L'HOMME DUS A LA PRESENCE DE RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES

Les autres effets potentiellement dus aux résidus sont d'ordre toxicologique et pharmacologique. On note entre autre une influence sur la flore intestinale humaine :

- en modifiant sa composition par inhibition sélective
- en favorisant ou en sélectionnant des microorganismes résistants

Mais il n'y a pas de preuves scientifiques que des concentrations en résidus inférieures aux LMR puissent modifier sérieusement la flore intestinale, (Scippo, 2008).

Certaines molécules comme le chloramphénicol, sont interdite en Europe sur les animaux de rente, en raison du risque potentiel d'apparition d'effet secondaires tels que des formes idiosyncratiques d'anémie aplasique chez l'homme.

Des études in vivo sur des modèles animaux visant à évaluer les effets de doses thérapeutiques et de résidus de tétracycline sur la flore intestinale humaine ont mis en évidence les modifications engendrées sur la flore intestinale. Il y a effectivement eu une sélection de bactéries résistantes à la tétracycline, ainsi qu'un effet sur les populations fécales aérobies et anaérobies, sans compter les modifications de certains paramètres métaboliques de la microflore. Par contre, la barrière contre les salmonelles exogènes a été maintenue, (Châtaigner et Stevens, 2005).

On note aussi une action cancérigène (certains médicaments ou les produits de leur métabolisme sont cancérigènes). L'ingestion répétée et prolongée de ces produits

peut induire le développement de tumeurs cancéreuses, (Châtaigner et Stevens, 2005).

2.2. RISQUES POUR LA SANTE ANIMALE

Les antibiotiques utilisés en thérapeutique possèdent en règle générale une faible toxicité. Ceci les différencie des antiseptiques externes qui ne peuvent en aucun cas être employés par voie générale. Néanmoins, certains antibiotiques présentent une forte toxicité générale qui empêche leur emploi dans beaucoup d'espèces animales. C'est le cas des antibiotiques ionophores (monensin) qui présentent une toxicité cardiaque majeure.

En dehors des toxicités directes d'organe spécifique à chaque antibiotique, toute antibiothérapie doit faire craindre au praticien surtout deux types d'effets indésirables, une perturbation de la flore digestive et des échecs thérapeutiques par sélection de résistance, (Puyt et Guérin-Faubleé, 2006).

2.3. RISQUES D'ORDRE TECHNOLOGIQUE

Selon Scippo (2008) :

- la présence d'antibiotiques dans le lait entraîne des accidents de fabrication du fromage, du yaourt et autres produits de fermentation du lait
- la présence d'antibiotiques dans la viande entraîne des accidents de fabrication du salami et autres produits de fermentation de la viande

2.4. RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT

Il est aujourd'hui admis qu'après un traitement antibiotique, les animaux excrètent dans leur environnement une fraction de la dose administrée (présente notamment dans les fumiers ou les lisiers, ainsi que dans les poussières en suspension avant d'être dégradée plus ou moins rapidement dans les fosses de rétention). En effet, on constate de fortes disparités dans le temps de demi-vie selon la molécule : la tylosine, par exemple, est dégradée beaucoup plus rapidement que l'oxytétracycline, détectable dans le fumier de veaux traités pendant 5 mois contre moins de 45 jours pour la tylosine. Ceci implique une persistance longue de certains antibiotiques dans l'environnement, ces derniers pouvant alors être présents dans les eaux de surface ou les rivières. Ceci conduit donc à une pollution chimique de l'environnement, avec une action sur la flore microbienne pouvant être la même que sur la flore

commensale, d'autant plus que les antibiotiques excrétés le sont à des doses très inférieures à la Concentration Minimale Inhibitrice, (Chatellet, 2007).

L'administration d'antibiotiques, par la sélection de mutants résistants dans la flore intestinale des animaux traités, peut avoir des conséquences indirectes sur l'environnement : par la défécation, les animaux excrètent certains de ces mutants, qui peuvent alors, par les mécanismes génétiques de transfert de résistance déjà évoqués plus haut, transmettre leurs mécanismes d'échappement aux bactéries environnementales. Ces mutants peuvent accidentellement contaminer les denrées alimentaires : c'est ainsi qu'après l'utilisation, entre 1983 et 1990, de la streptothricine en ex-Allemagne de l'Est pour l'alimentation animale, les premières souches résistantes d'*E. Coli* apparues deux ans plus tard, ont transmis leur gène de résistance par l'intermédiaire d'un transposon, aboutissant à l'émergence de mutants résistants à l'antibiotique chez les porcs mais aussi chez les éleveurs et les membres de leur famille. Des souches résistantes d'*E. Coli* sont fréquemment retrouvées lors de l'analyse des eaux usées, et il est prouvé que ces dernières peuvent très bien y survivre, et échanger entre elles des plasmides porteurs de gènes de résistance. Les eaux usées sont utilisées pour irriguer, et des bactéries résistantes ont été retrouvées sur des plantations 15 jours après qu'elles eurent été arrosées. De plus, un animal peut se contaminer en s'abreuvant aux eaux de surface. De la même façon, des bactéries d'origine fécale sont épandues avec le fumier, et par conjugaison peuvent transmettre leurs éventuels gènes de résistance aux bactéries du sol. L'utilisation des antibiotiques en élevage représente donc un risque de sélection de résistance chez les bactéries environnementales, (Chatellet, 2007).

3. ANTIBIOTIQUES DONT L'USAGE EST INTERDIT POUR LE TRAITEMENT DES ANIMAUX DONT LES PRODUCTIONS SONT DESTINEES À LA CONSOMMATION HUMAINE.

Le tableau (11) présent les anti-infectieux dont l'usage est interdit pour le traitement des animaux dont les productions sont destinées à la consommation humaine.

Tableau n° 11 : Anti-infectieux dont l'usage est interdit pour le traitement des animaux dont les productions sont destinées à la consommation humaine, (Guillemot, 2006).

| Principe actif | Règlement | Date |
|-----------------------|------------------|-------------|
| Chloramphénicol | 1430/94 (CEE) | 22/06/94 |
| Dapsone | 3426/93 (CEE) | 14/12/93 |
| Diméridazole | 1798/95 (CEE) | 25/07/95 |
| Metronidazole | 613/98 (CEE) | 18/10/98 |
| Furazolidone seule | 14402/95 (CEE) | 26/06/95 |
| Autres nitrofuranes | 2901/93 (CEE) | 18/10/93 |
| Ronidazole | 3426/93 (CEE) | 14/12/92 |

4. DELAI D'ATTENTE

4.1. DEFINITION

Selon l'article L. 617-2 du CSP de la CEE, le temps d'attente est défini comme étant le délai à observer entre la dernière administration du médicament à l'animal dans les conditions normales d'emploi et l'obtention des denrées alimentaires provenant de cet animal, afin de garantir qu'elles ne contiennent pas de résidus en quantités supérieures aux limites maximales établies par le règlement n° 90-2377 (CEE), (Milhaud et Pinault, 1999).

Le délai d'attente ou période de retrait représente donc le temps nécessaire à l'excrétion complète d'un médicament après sa dernière prise, (Broes1 et al, 1999). C'est aussi le délai à observer entre l'administration du médicament à un animal dans les conditions normales et l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal pour garantir que ces denrées alimentaires ne contiennent pas de résidus pouvant présenter des dangers pour la santé du consommateur, (Milhaud, 1978).

Les délais d'attente indiqués sur les notices qui accompagnent les produits sont valables pour les doses recommandées par le fabricant. Lorsque des doses supérieures sont prescrites par le vétérinaire, le délai d'attente est prolongé et on doit tenir compte de ce qui est inscrit sur l'ordonnance, (Broes1 et al, 1999).

4.2. FIXATION DU TEMPS D'ATTENTE

Pour fixer le temps d'attente d'une substance, il faut dans ce cas étudier son métabolisme pour connaître les lieux d'accumulation et les voies d'excrétion du composé de départ et de ses métabolites et étudier leur décroissance en fonction du temps. Ce ci nécessite une première investigation avec des molécules marquées, puis de nombreux travaux complémentaires pour identifier les métabolites et mettre au point des méthodes non radioactives pour les doser. Les différents temps d'attente proposés devront assurer qu'il n'y a pas de résidus mesurables dans les productions de l'animal vivant (lait, œufs) ou dans les denrées alimentaires obtenues après l'abattage, (Milhaud, 1978).

Le délai d'attente de quelques antibiotiques chez différents animaux est résumé dans le tableau (12).

Tableau n° (12) : Délai d'attente de quelques antibiotiques, (Milhaud, 1978).

| Antibiotique | Animaux de boucherie | Animaux laitiers | Volailles pondeuses (Œufs) |
|------------------------|---|-------------------------|---|
| Oxytétracycline | 2 semaines | 1 semaine | |
| spiramycine | 3 semaines | 3 semaines | 3 jours (Voie orale) 3 semaines (autres voies) |
| Oléandomycine | Voie orale 5 jours | 5 jours | |
| Tylosine | 3 semaines | 3 semaines | 3 jours (Voie orale), 2 semaines (formes injectables) |
| Polymyxine B | Voie orale 3 jours Autres voies 1 mois | | |

4.3. MODALITES DE DETERMINATION DU TEMPS D'ATTENTE

Le temps d'attente est calculé en utilisant les résultats des études pharmacocinétiques de déplétion des résidus, réalisées sur un nombre suffisant d'animaux, recommandé par la ligne directrice.

Il est en effet indispensable que les instances d'évaluation des divers pays aient un même mode de jugement. Il est impératif d'éviter des divergences d'appréciations pouvant les conduire à fixer des temps d'attente différents pour une même spécialité

susceptibles de provoquer un blocage du processus de reconnaissance mutuelle, une entrave à la libre circulation des médicaments et, par ailleurs, susciter de la perplexité chez les utilisateurs, (Milhaud et Pinault, 1999).

4.3.1. LA METHODE CLASSIQUE

La plus simple, consiste à fixer comme temps d'attente, le délai nécessaire pour que tous les tissus, de tous les animaux d'essai, présentent une teneur en résidus inférieure à la LMR fixée pour chacun d'eux. Certains États ajoutent un délai complémentaire de sécurité, si par exemple on constate une grande variabilité des cinétiques de déplétion entre les animaux. Ce délai de sécurité peut être estimé à 10 à 30 % du délai précité, ou 1 à 3 fois la demi-vie d'élimination, en tout cas au moins 1 à 2 jours. (Milhaud et Pinault, 1999).

4.3.2. LA NOUVELLE METHODE PROPOSEE

Cette nouvelle méthode utilise une approche statistique se basant sur des principes de pharmacocinétique bien établis. Elle considère que l'élimination des résidus correspond à un modèle cinétique monocompartimental, la décroissance des concentrations en fonction du temps pouvant être décrite de manière satisfaisante par une équation monoexponentielle. Il est alors possible de déterminer le temps d'attente par une analyse de régression linéaire du log de la concentration en fonction du temps. Le principe est de calculer le temps, au terme duquel on peut garantir, avec des limites de confiance préétablies (par exemple 95 %), que la droite de régression des concentrations correspondant par exemple au 95^{ème} percentile supérieur des valeurs mesurées passera au dessous de la LMR. Cette seconde méthode nécessite un nombre d'animaux plus élevé que la première. (Milhaud et Pinault, 1999).

5. LMR DES ANTIBIOTIQUES

5.1. DEFINITION

Une LMR est la concentration maximale de résidus ((exprimée en parties par million (ppm) ou parties par milliard (ppb)) qui peut demeurer dans les tissus ou les produits alimentaires (lait, viande, œufs...) issus d'un animal destiné à l'alimentation humaine

à qui l'on a administré des médicaments vétérinaires et que les scientifiques et les autorités la considèrent sans risque sanitaire pour le consommateur et sans effet sur les processus de fabrication. Cette LMR ne doit pas être dépassée pour des aliments issus des productions animales, (Pouliquen et Le Bris, 2001) ; (Fabre et al, 2006).

5.2. FIXATION DE LA LMR

La notion de LMR constitue une synthèse entre les attentes des consommateurs et les contraintes des producteurs permettant, sans interdire l'utilisation des médicaments, leur utilisation en toute sécurité. Cette LMR est calculée en prenant en compte d'une part le risque toxicologique et, d'autre part, l'effet potentiel des résidus sur la flore digestive de l'homme.

La LMR toxicologique est définie pour assurer la sécurité du consommateur. Cette notion intègre tous les éléments liés à la toxicité de la molécule à court ou à long terme, quelle que soit la nature des effets observés sur l'individu ou sur sa descendance, (Fabre et al, 2006)

La LMR bactériologique est une limite qui vise, quant à elle, à garantir l'absence d'effet des résidus d'antibiotiques sur la flore digestive humaine. Elle est prise en compte indépendamment du fait que cette modification ait ou non un effet sur l'homme.

La LMR finale (officielle) prend la valeur la plus basse entre la LMR toxicologique et bactériologique, (Fabre et al, 2006).

Selon Fabre et al (2006) la fixation de la LMR s'appuie sur trois notions essentielles :

- recherche de la Dose Sans Effet (DSE) sur l'animal par différents tests biologiques
- partant de cette DSE et de facteurs de sécurité (100 ou 1000), calcul d'une Dose Journalière Admissible (DJA) : consommation inférieure à 1 pour 100 ou pour mille de la concentration qui entraîne un effet
- partant de cette DJA, de la connaissance de la consommation alimentaire moyenne des habitants et de l'analyse de la répartition dans les différents tissus et organes, on calcule les LMR (lait, viande...)

5.3. TABLEAU DES LMR DES ANTIBIOTIQUES

Conformément à la réglementation européenne concernant les LMR (limites maximales résiduelles) dans les différentes denrées alimentaires, les médicaments

anti-infectieux utilisés en médecine vétérinaire sont classés dans l'un des quatre tableaux suivants résumés dans le tableau (13).

Tableau n° 13 : Limites maximales résiduelles (LMR) des antibiotiques exprimées en µg/kg ou ppb, (Pinault, 1998) ; (Puyt et Guérin-Faublée, 2006).

| Substances avec LMR définitives | | | | | | | |
|--|------------------------|---------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| Substances | Espèces | Muscle | Foie | Rein | Graisse | Lait | Œufs |
| Benzylpénicilline | Toutes | 50 | 50 | 50 | 50 | 4 | |
| Nafcilline | Bovins | 300 | 300 | 300 | 300 | 30 | |
| Ampicilline | Toutes | 50 | 50 | 50 | 50 | 4 | |
| Amoxicilline | Toutes | 50 | 50 | 50 | 50 | 4 | |
| Oxacilline | Toutes | 300 | 300 | 300 | 300 | 30 | |
| Cloxacilline | Toutes | 300 | 300 | 300 | 300 | 30 | |
| Dicloxacilline | Toutes | 300 | 300 | 300 | 300 | 30 | |
| Cefquinome | Bovins | 50 | 100 | 200 | 50 | 20 | |
| | porcs, équidés | 50 | 100 | 200 | 50 | | |
| Ceftiofur | Bovins | 1000 | 2000 | 6000 | 2000 | 100 | |
| | porc | 1000 | 2000 | 6000 | 2000 | | |
| Céfalexine | Bovins | 200 | 200 | 1000 | 200 | 100 | |
| Céfapirine | Bovins | 50 | | 100 | 50 | 60 | |
| Céfalonium | Bovins | | | | | 20 | |
| Céfopérazone | Bovins | | | | | 50 | |
| Céfacétrile | Vache laitière | | | | | 125 | |
| Céfazoline | Bovins, ovins, caprins | | | | | 50 | |
| Stréptomycine | Bovins, Ovins | 500 | 500 | 1000 | 500 | 200 | |
| | Porcs | 500 | 500 | 1000 | 500 | | |

| | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|------|----------|------|------|---------|-----|
| Gentamycine | Bovin | 50 | 200 | 750 | 50 | 10 0 | |
| | Porcs | 50 | 200 | 750 | 50 | | |
| Néomycine | Toutes | 500 | 500 | 5000 | 500 | 50 0 | 500 |
| Kanamycine | Toutes | 100 | 600 | 2500 | 100 | 15 0 | |
| Apramycine | Bovins | 1000 | 100 0 | 2000 | 1000 | | |
| Spectinomycine | Toutes sauf ovins | 300 | 100 0 | 5000 | 500 | 20 0 | |
| | ovins | 300 | 200 0 | 5000 | 500 | 20 0 | |
| Bacitracine | Bovins | 150 | 150 | 150 | 150 | 10 0 | |
| | Lapins | 150 | 150 | 150 | 150 | | |
| Colistine | Toutes | 150 | 150 | 200 | 150 | 50 | 300 |
| Tétracycline | Toutes | 100 | 300 | 600 | | 10 0 | 200 |
| Oxytétracycline | Toutes | 100 | 300 | 600 | | 10 0 | 200 |
| Chlortétracycline | Toutes | 100 | 300 | 600 | | 10 0 | 200 |
| Doxycycline | Bovins, porc, volaille | 100 | 300 | 600 | 300 | | |
| Florfénicol | Bovins, ovins, caprins | 200 | 300 0 | 300 | 500 | | |
| | Porc | 300 | 200 0 | 500 | 200 | | |
| | Poulet | 100 | 250 0 | 750 | | | |
| | poissons | 1000 | | | 200 | | |
| | Toutes autres | 100 | 200 | 300 | | | |

| | | | | | | | |
|----------------|-----------------|-----|----------|------|-----|---------|------|
| | espèces | | 0 | | | | |
| Thiamphénicol | Bovins, poulet | 50 | 50 | 50 | 50 | | |
| Erythromycine | Bovins | 200 | 200 | 200 | 200 | 40 | |
| | Ovins, Porc | 200 | 200 | 200 | 200 | | |
| | Poulet | 200 | 200 | 200 | 200 | | 150 |
| Spiramycine | Bovins | 200 | 300 | 300 | 300 | 20 0 | |
| | Porc | 250 | 200 0 | 1000 | | | |
| | Poulet | 200 | 400 | | | | |
| Tylosine | Bovins | 100 | 100 | 100 | 100 | 50 | |
| | Porc | 100 | 100 | 100 | 100 | | |
| | Volaille | 100 | 100 | 100 | 100 | | 200 |
| Tilmicosine | Bovins, Ovins | 50 | 100 0 | 1000 | 50 | 50 | |
| | Porc, Lapin | 50 | 100 0 | 1000 | 50 | | |
| | Poulet | 75 | 100 0 | 250 | 75 | | |
| Tulathromycine | Bovins, Porcins | | 300 0 | 3000 | 100 | | |
| Lincomycine | Toutes | 100 | 500 | 1500 | 50 | 15 0 | 50 |
| Tiamuline | Porc | 100 | 500 | | 100 | | 1000 |
| | Poulet | 100 | 100 0 | | 100 | | |
| | Dinde | 100 | 300 | | | | |
| Valnémuline | Porc | 50 | 500 | 100 | | | |
| Sulfamides | Toutes | 100 | 100 | 100 | 100 | 10 0 | |
| Baquiloprime | Bovins | | 300 | 150 | 10 | 30 | |
| | Porc | | 50 | 50 | 40 | | |
| Triméthoprime | Bovins | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | |

| | | | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------|-----------------|------|--------------------------------|-----|-----|--|
| | Porc, Volailles | 50 | 50 | 50 | 50 | | |
| | Poissons | 50 | | | | | |
| | Equins | 100 | 100 | 100 | 100 | | |
| Acide oxolinique | Porc | 100 | 150 | 150 | 50 | | |
| | Poulet | 100 | 150 | 150 | 50 | | |
| | Poissons | 100 | | | | | |
| Fluméquine | Bovins | 200 | 500 | 1500 | 300 | 50 | |
| | Ovins, Porc | 200 | 500 | 1500 | 300 | | |
| | Poulet, Dinde | 400 | 800 | 1000 | 250 | | |
| | Salmonidés | 600 | | | | | |
| Enrofloxacin | Bovins | 100 | 300 | 200 | 100 | 100 | |
| | Ovins | 100 | 300 | 200 | 100 | | |
| | Porc, Lapin, Volailles | 100 | 300 | 200 | 100 | | |
| Sarafloxacin | Poulet | | 100 | | 10 | | |
| | Salmonidés | 30 | | | | | |
| Danofloxacin | Bovins | 200 | 400 | 400 | 100 | 30 | |
| | Porc | 100 | 200 | 200 | 50 | | |
| | Poulet | 200 | 400 | 400 | 100 | | |
| Difloxacin | Bovins | 400 | 1400 | 800 | 100 | | |
| | Porc | 400 | 800 | 800 | 100 | | |
| | Poulet, Dinde | 300 | 1900 | 600 | 400 | | |
| Marbofloxacin | Bovins | 150 | 150 | 150 | 50 | 75 | |
| | Porc | 150 | 150 | 150 | 50 | | |
| Novobiocine | Bovins | | | | | 50 | |
| Rifaximine | Bovins | | | | | 60 | |
| Substances non soumises au LMR | | | | | | | |
| Substances | Espèce | Tissu | | Condition d'emploi | | | |
| Céfacétrile | Bovins | Tout tissu sauf | | Voie intra mammaire seulement. | | | |

| | | lait | | | | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------------|------|--|---------|------|------|------------|
| Céfalonium | Bovins | Tout tissu sauf lait | | Voie intra mammaire seulement. | | | | |
| Céfazoline | Bovins, ovins, caprins | Tout tissu sauf lait | | Voie intra mammaire seulement. | | | | |
| Céfoperazone | Bovins | Tout tissu sauf lait | | Voie intra mammaire seulement. | | | | |
| Apramycine | Bovins, porc, lapin et poulet | Tout tissu sauf lait et œuf | | Voie orale seulement, Interdiction d'emploi chez les femelles laitières et poules pondeuses. | | | | |
| Bacitracine | Bovins | Tout tissu sauf lait | | Voie intra mammaire seulement. | | | | |
| Novobiocine | Bovins | Tout tissu sauf lait | | Voie intra mammaire seulement. | | | | |
| Rifaximine | Toutes espèces animales Bovins | Tout tissu sauf lait | | Voie intra mammaire seulement. | | | | |
| Substances avec LMR provisoires | | | | | | | | |
| Substances | Espèces | Muscle | Foie | Rein | Graisse | Lait | Œufs | Date |
| Acide oxolinique | Bovins | 100 | 150 | 150 | 50 | | | 01-01-2006 |
| Substances avec LMR impossibles à fixer | | | | | | | | |
| Substances | | | | Chloramphénicol, nitrofuranes, nitroimidazoles. | | | | |

6. OBJECTIFS ET STRATEGIE D'EVALUATION DES RESIDUS

C'est une démarche visant la protection de la santé publique consistant à définir la concentration maximale de résidus, résultant de l'utilisation normale du médicament, reconnue comme acceptable, dans ou sur un aliment, sans qu'il en résulte un risque

d'altération de la santé du consommateur. Cette concentration est la Limite Maximale de Résidus (LMR) ou Maximum Residue Level/Limit (MRL).

La fixation des LMR est l'aboutissement de la première phase de l'analyse des risques formalisés en dernier lieu par le Comité du Codex Alimentarius sur les Résidus de Médicaments Vétérinaires dans les Aliments (CCVRDF). Cette analyse des risques comporte trois composantes (Milhaud et Pinault, 1999) :

- l'appréciation des risques
- la gestion des risques
- la communication sur les risques

6.1. L'APPRECIATION DES RISQUES

C'est un processus à base scientifique en 4 étapes :

6.1.1. L'IDENTIFICATION DES DANGERS

Il a pour objet d'identifier les résidus médicamenteux (nature, concentration et éventuellement biodisponibilité) susceptibles de provoquer des effets adverses pour la santé et qui peuvent être présents dans un aliment, (Sachot et Puyt, 2001).

6.1.2. LA CARACTERISATION DES DANGERS

Elle consiste à évaluer le potentiel toxique (nature, relations dose/effet) et les autres effets défavorables éventuels des résidus qui seront effectivement présents dans les denrées destinées à l'alimentation de l'homme. Le premier objectif de cette étape est la connaissance de la relation dose-réponse qui doit être établie expérimentalement en grande partie sur l'animal de laboratoire et qui permet de déterminer une Dose Sans Effet (DSE). Son second objectif est l'établissement d'une Dose Journalière Acceptable (DJA) pour l'homme par extrapolation des résultats de l'évaluation expérimentale ayant conduit à la DSE, (Milhaud et Pinault, 1999).

6.1.3. L'EVALUATION DE L'EXPOSITION

C'est l'estimation qualitative et quantitative de l'ingestion probable des résidus médicamenteux par le biais des aliments ou de l'exposition à d'autres sources le cas échéant, (Milhaud et Pinault, 1999).

6.1.4. LA CARACTERISATION DES RISQUES

Qui consiste enfin à estimer qualitativement et/ou quantitativement la probabilité de fréquence et de la gravité des effets adverses connus ou potentiels sur la santé susceptibles de se produire dans une population donnée sur la base des trois précédents points. Il convient ici d'estimer les conditions d'utilisation de la substance médicamenteuse et les résidus acceptables compte tenu du niveau de risque acceptable pour le consommateur. C'est à cette étape que l'on aboutit ainsi à la proposition d'une ou plusieurs LMR compatibles avec les bonnes pratiques d'utilisation des médicaments vétérinaires qui permettent de garantir sur la base des ingérés alimentaires retenus de garantir que les valeurs de DJA ne soient pas dépassées, (Sachot et Puyt, 2001).

6.2. LA GESTION DES RISQUES

C'est le processus consistant à mettre en balance les différentes politiques possibles compte tenu des résultats de l'appréciation des risques et au besoin, à choisir et à mettre en œuvre les mesures de contrôle appropriées et les mesures réglementaires. Entre notamment dans cette partie le choix des valeurs des facteurs de sécurité utilisés pour le calcul des LMR, (Sachot et Puyt, 2001).

6.3. LA COMMUNICATION SUR LES RISQUES

C'est définie comme étant un échange interactif d'informations et d'opinions sur les risques entre les responsables de leur appréciation et de leur gestion, les consommateurs et les autres parties intéressées.

Cette procédure vise les médicaments vétérinaires destinés aux animaux dont les productions sont destinées à la consommation humaine ; elle est définie dans ce cas par le règlement (CEE) n° 2377/90 et l'arrêté du 4 septembre 1994. Mais une démarche similaire est suivie avec d'autres contaminants alimentaires potentiels tels que les résidus de produits phytosanitaires ou des contaminants de l'environnement tels que des métaux, (Milhaud et Pinault, 1999).

CHAPITRE IV

LES METHODES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS VIANDE BLANCHE

Le contrôle des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale s'effectue en deux étapes avec la recherche d'un effet antibiotique par une méthode de dépistage (microbiologique, immunologique ou physico-chimique) et la confirmation de la présence de l'antibiotique par une méthode physico-chimique (chromatographie liquide couplée à la détection UV, fluorimétrie ou la spectrométrie de masse), (Guillemot, 2006).

Selon Scippo (2008) le contrôle de ces résidus dans les denrées alimentaires est un processus complexe et coûteux. Mais il est indispensable pour garantir :

- la protection de la santé publique
- le respect des règles qui régissent le commerce
- la production de matières premières de qualité pour l'industrie agroalimentaire

Toutefois, un examen en vue de la détection de résidus d'antibiotiques est effectué lors de chaque examen bactériologique de la viande. Les recherches des résidus de ces substances sont effectuées en cas de suspicion ou par sondage.

1. METHODES DE DETECTION (DEPISTAGE)

Les méthodes biologiques/biochimiques de dépistage des résidus des antibiotiques sont généralement rapides et peu coûteuses. Elles permettent de traiter un grand nombre d'échantillons. Elles doivent avoir des limites de détection suffisamment basses (inférieures aux LMR ou aux niveaux minimum de performance requise). Comme toute méthode de dépistage, elles ne doivent engendrer qu'un faible nombre de faux négatifs (échantillons faussement conformes) et un nombre limité de résultats faussement positifs pour rester attrayantes d'un point de vue économique, les résultats positifs enregistrés en pratiquant ces méthodes de dépistage devant être nécessairement confirmés par des méthodes chromatographiques plus fiables

comme celles qui associent chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) couplées à la spectrométrie de masse (SM), (Scippo, Maghuin-Rogister, 2006).

1.1. METHODES DE DETECTION BIOLOGIQUE (MICROBIOLOGIQUE)

1.1.1. METHODE ALTERNATIVE (PREMITEST)

Développé par DSM, le Premitest, permet de détecter les résidus d'antibiotiques présentes dans la viande fraîche, la charcuterie, les reins, le poisson et les œufs.

C'est un test à large spectre, il détecte un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande. Au bout de 4 heures, il donne un résultat fiable, (Eloit, 2004).

1.1.1.1. principe du PREMITEST

Le PremiTest est basé sur l'inhibition de la croissance du *Bacillus stearothermophilus*, bactérie très sensible à de nombreux antibiotiques et aux sulfamides. Des spores standardisés sont inclus dans de la gélose additionnés de nutriments sélectionnés. Couvrant une large gamme d'antibiotiques, le Premitest est un test rapide, sensible, fiable donne un résultat fiable en moins de quatre heures, prêt à l'emploi et d'un bon rapport coût/performance. Il permet de déterminer rapidement le devenir de la viande. Le champ de validation de ce test sera la viande de bovin et de volaille, avec une extension à la viande de porc. La sensibilité du Premitest quelque soit l'espèce concernée est similaire, (Anonyme 3 f, 2006).

1.1.1.2. mode opératoire

Le Premitest est d'une utilisation simple. Le jus de viande est déposé dans des tubes à essais contenant la gélose au sein de laquelle se trouvent les spores de *Bacillus stearothermophilus*. Après 20 minutes de diffusion puis élimination du jus et préchauffage de l'incubateur pendant 20 minutes, il faut incuber le tube pendant environ 3 heures à 64°C et vérifier la couleur, (Anonyme 3 f, 2006).

La lecture du résultat se limite à une comparaison de couleurs. En l'absence d'antibiotiques, les spores germent et se développent, entraînant l'acidification du milieu et un changement de couleur. Si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que la quantité de composés antimicrobiens se situe en deçà des limites de détection du Premitest. Inversement, en présence d'antibiotiques, les

spores ne se développent pas, elles sont inhibées par l'antibiotique ; une couleur violette indique un taux d'antibiotiques supérieur ou égal à la limite de détection du test, (Anonyme 3 f, 2006).

1.1.2. LA METHODE DE REFERENCE (METHODE DES 4 BOITES)

C'est la méthode officielle française de détection des résidus d'antibiotiques dans la viande (généralement sur le rein, test rénal, officiel en Belgique comme test de dépistage des résidus d'antibiotiques). Elle a pour objet, à l'aide de microorganismes sensibles, la mise en évidence de résidus de substances à activité antibiotique sans en déterminer leur identité. Elle est applicable aux muscles d'animaux de boucherie et volailles, aux muscles et foies de palmipèdes gras, (Gaudin et al, 2006) ; (Scippo, Maghuin-Rogister, 2006).

1.1.2.1. principe de la méthode

Elle est basée sur l'inhibition de la croissance de bactéries du genre *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*. Elle est réalisée au moyen de boîtes de Pétri contenant une géloseensemencée avec la souche *Micrococcus luteus* ou la souche *Bacillus subtilis*. Les zones d'inhibition dépourvues de colonies bactériennes autour des points de dépôts des échantillons (morceau de rein ou papier filtre imbibé d'exsudat de cortex rénal) sont révélatrices de la présence potentielle d'antibiotiques, (Scippo, Maghuin-Rogister, 2006) ; (Berthe et al, 2007).

1.1.2.2. mode opératoire

Cette méthode requiert l'utilisation des deux espèces suivantes : *Bacillus subtilis* cultivé à trois pH différents (6, 7,4 et 8) et *Micrococcus luteus* cultivé à pH 8. Pour la méthode de diffusion réalisée avec *Bacillus subtilis* à pH 7,4, l'addition de triméthoprime permet la détection des sulfamides dans le muscle grâce à la synergie triméthoprime sulfamides.

Selon Gaudin et al (2006) les principales étapes de cette méthode sont les suivants :

- sortir les échantillons du congélateur, quelques minutes avant d'opérer, et les déposer sur un plateau en acier inoxydable
- prélever sur chaque échantillon une carotte cylindrique de 8 mm de diamètre et de 2 cm de long environ, à l'aide d'un emporte-pièce

- tout en poussant le cylindre de muscle hors de l'emporte-pièce, découpé à l'aide d'un bistouri huit rondelles de viande de 2 mm d'épaisseur
- placer deux rondelles en positions diamétralement opposées sur chacune des quatre boîtes d'essai, en utilisant des pinces. Il est ainsi possible de déposer dans chacune de ces boîtes jusqu'à six rondelles, correspondant à trois échantillons à examiner, toutes ces rondelles devant se situer sur un cercle à environ 1 cm de la périphérie de la boîte

Pour chacune des quatre boîtes, sont considérés comme positifs, les échantillons de viande donnant des zones d'inhibition dont la taille de la zone annulaire est au moins égale à 2 mm. Il faut recommencer l'essai chaque fois que le résultat semble douteux (pour un même échantillon une rondelle étant positive et l'autre négative, colonies éparses dans la zone d'inhibition, contaminations, etc). Si le second résultat n'est pas considéré comme positif, le résultat douteux doit être considéré.

Sont considérés comme contenant des résidus de substances à activité antibiotique, les échantillons trouvés positifs par l'une au moins des quatre techniques de diffusion en gélose. De plus chaque boîte présente une sensibilité particulière pour certaines familles d'antibiotiques, ce qui permet de donner les orientations résumés dans le tableau (14), (Gaudin et al, 2006).

Tableau n° 14 : Les microorganismes utilisés dans la méthode des quatre boites et les antibiotiques détectés, (Gaudin et al, 2006).

| Boites | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Micrococcus luteus</i> |
|-------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| pH | 6 | 7.4 | 8 | 8 |
| Observation | | Ajout Triméthoprième | | |
| Molécules cibles | Béta-lactamines ou tétracyclines | Sulfamides. | Aminosides | Béta-lactamines et macrolides |

1.2. METHODES BIOCHIMIQUES

1.2.1. METHODE ENZYMATIQUE (PENZYM TEST)

Ce test qui sert pour la détection des résidus des antibiotiques de type Béta-lactamines (test qualitatif) dans le lait a été adapté à la mise en évidence de ces résidus dans la viande toute en tirant parti de la propriété de l'hydroxylapatite d'adsorber les protéines à faible force ionique et à pH neutre. C'est un test enzymatique colorimétrique, basé sur l'inhibition d'une DD carboxypeptidase par les B-lactames. Il permet une estimation semi-quantitative des antibiotiques dans la viande à une concentration de 0.016 à 0.018 UI/G. L'application de ce test à la détermination des antibiotiques dans la viande est entravée par la présence des pigments rouges liés à des protéines (hémoglobine, myoglobine), (Danhaive, 1986).

1.2.1.1. principe du PENZYM TEST

L'enzyme (DD carboxypeptidase) ajouté dans l'échantillon, réagit lors de l'incubation avec les antibiotiques pour former un complexe stable. L'excès d'enzyme libre toujours présent dans l'extrait de viande hydrolyse un substrat de type R-D-Ala-D-Ala. La D-Ala ainsi formée est oxydée en acide pyruvique par une D-amino-acide oxydase avec formation simultanée d'eau oxygénée. Cette dernière est utilisée pour oxyder, sous l'action d'une peroxydase, un indicateur organique redox non coloré (l'o-dianisidine) qui évoluera en un composé de couleur rose orange, (Maghuin-Rogister et al, 2001). La figure (8) montre le principe de base du Penzym test.

1.2.1.2. mode opératoire

Deux grammes de l'échantillon sont homogénéisés dans 2 ml d'eau au moyen d'un Ultra-Turax à 20°C et à vitesse maximale pendant 1 minute dans un bain de glace afin d'éviter une augmentation excessive de la température. L'homogénat est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 g. Le surnageant (1 ml) est déposé sur la colonne et élué à l'eau sous pression d'azote afin d'accroître le débit. Les 25 premières gouttes sont écartées tandis que les gouttes 26 à 40 sont collectées. Une aliquote de cette fraction est soumise au test Penzym qui est réalisé selon les prescriptions du fabricant, (Danhaive, 1986).

La lecture des résultats se fait de manière très rapide. Les colorations obtenues dans les tubes à essai sont comparées visuellement aux différentes colorations de la carte des couleurs fournie par le fabricant, (Danhaive, 1986). Si la couleur finale est :

- rose orange : l'échantillon est négatif: concentration en AB < 0,005 UI PenG/ml échantillon, (Maghuin-Rogister et al, 2001)
- orange : l'échantillon est douteux: concentration en AB = 0,008 UI PenG/échantillon, (Maghuin-Rogister et al, 2001)
- jaune : l'échantillon est positif: concentration en AB > 0,017 UI PenG/échantillon, (Maghuin-Rogister et al, 2001)

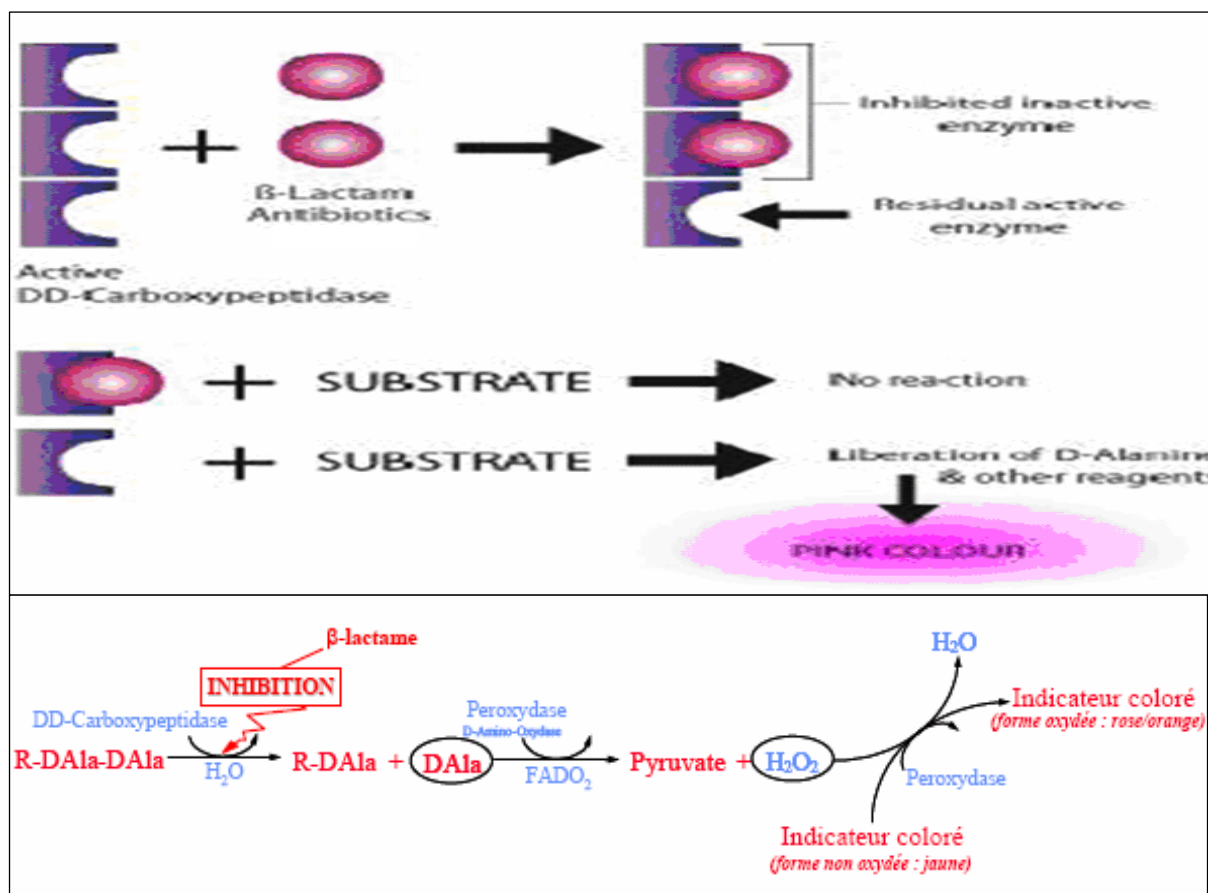


Figure n° 8 : Schéma de principe du PENZYME TEST, (Romnee, 2007).

1.2.2. METHODE SUR TIGETTES (LE TEST BETA STAR)

1.2.2.1. principe du BETA STAR TEST

C'est un test du type Récepteur Assay. Il est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Il est très spécifique des Béta-lactamines (pénicillines et céphalosporines). Par contre, les concentrations élevées en résidus

d'antibiotiques autres que les Béta-lactamines ont donné dans tous les cas des résultats positifs, (Maghuin-Rogister et al, 2001) ; (Scippo, 2008).

Le principe de base du test β - STAR est résumé dans la figure (9).

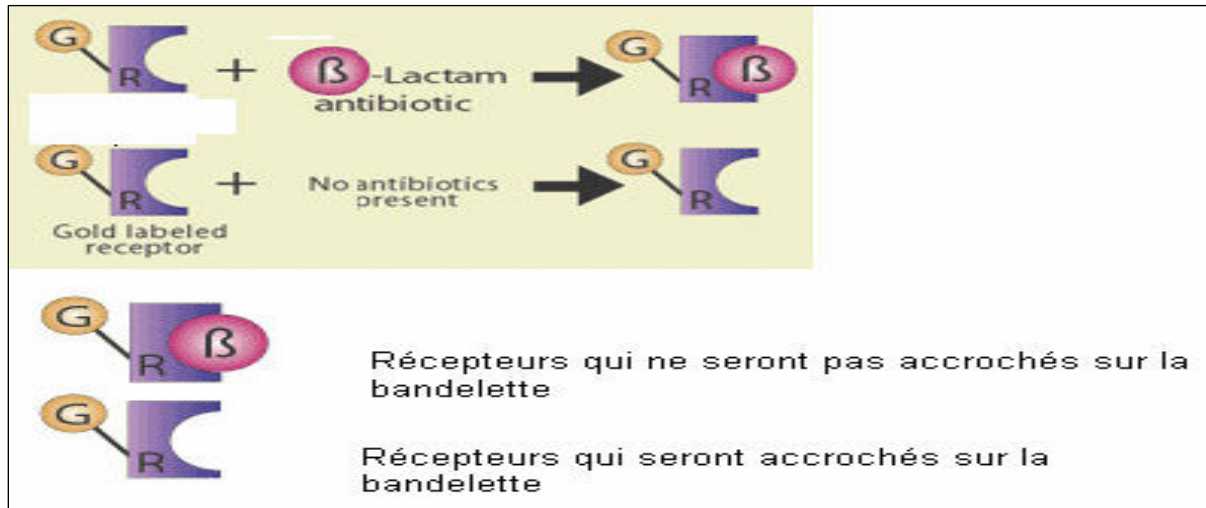


Figure n° 9 : Schéma de principe du test B-star, (Gaudin, 2005).

1.2.2.2. mode opératoire

Au cours de la première incubation, les antibiotiques du type β -lactames présents dans l'échantillon se lient au récepteur. Pendant la deuxième incubation, l'échantillon migre sur un support immuno-chromatographique (membrane fixée à une bandelette) qui présente deux bandes de capture. La première bande retient tous les récepteurs non liés aux antibiotiques faisant apparaître une coloration rouge intense qui traduit une absence de résidus. En cas de présence de Béta-lactamines en excès, les complexes récepteurs antibiotiques formés ne peuvent pas se lier et aucune coloration n'apparaît (Gaudin, 2005). La seconde bande permet de contrôler

le bon déroulement du test (c'est la bande dite de référence). Au plus il y aura d'antibiotiques présents dans l'échantillon, au moins il y aura de récepteurs libres susceptibles de migrer sur le support et donc la première bande de capture sera moins visible. Le résultat est exprimé en comparant l'intensité des deux bandes.

Le β -STAR est un test prévu initialement pour détecter la présence des β -lactames présents dans le lait. L'application directe du test sur le surnageant d'un échantillon de rein broyé et centrifugé, n'est pas réalisable. Toute la tigette devient rougeâtre et les résultats ne sont pas interprétables. L'application du test β -STAR aux échantillons de tissus animaux (rein, muscles...) a donc également nécessité une extraction préalable des antibiotiques, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

Tout comme pour le Penzym, le tissu sera broyé et centrifugé. Le surnageant sera ensuite purifié à l'aide d'une colonne d'hydroxylapatite qui a la particularité de retenir les protéines tout en laissant passer les antibiotiques. Et enfin, l'éluat aqueux récolté sera soumis au test β -STAR sans étape de concentration sur une colonne SPE, ni évaporation sous flux d'azote, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

Une première observation a montré que contrairement au lait, la solution aqueuse migre plus rapidement sur la colonne immuno-chromatographique. Le test dure dès lors 4 minutes au lieu de 5 initialement prévu. Il faut aussi constater que dans certains cas, un problème de précipitation a lieu, ce qui fausse le résultat. En effet, si aucun précipité n'est observé lors du mélange entre les antibiotiques et le récepteur, une bande supplémentaire non conforme au β -STAR apparaît parfois sur le support immuno-chromatographique, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

Après plusieurs essais, il est apparu que la troisième bande qui apparaissait sur la tigette était due à la présence de tampon phosphate recommandée pour la mise en suspension et la régénération du gel d'hydroxylapatite. Pour contrer ce problème, un compromis a été trouvé entre la quantité d'échantillon extrait au départ et chargé sur la colonne, la taille de la colonne d'hydroxylapatite, et l'utilisation d'eau à la place du tampon phosphate. L'utilisation de 750 μ l de suspension à la place de 5ml, nous permet de ne pas régénérer les colonnes sans en augmenter leur coût et d'éviter tout problème de contamination éventuelle, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

La figure (10) résume le mode opératoire ainsi que les résultats du β - STAR test.

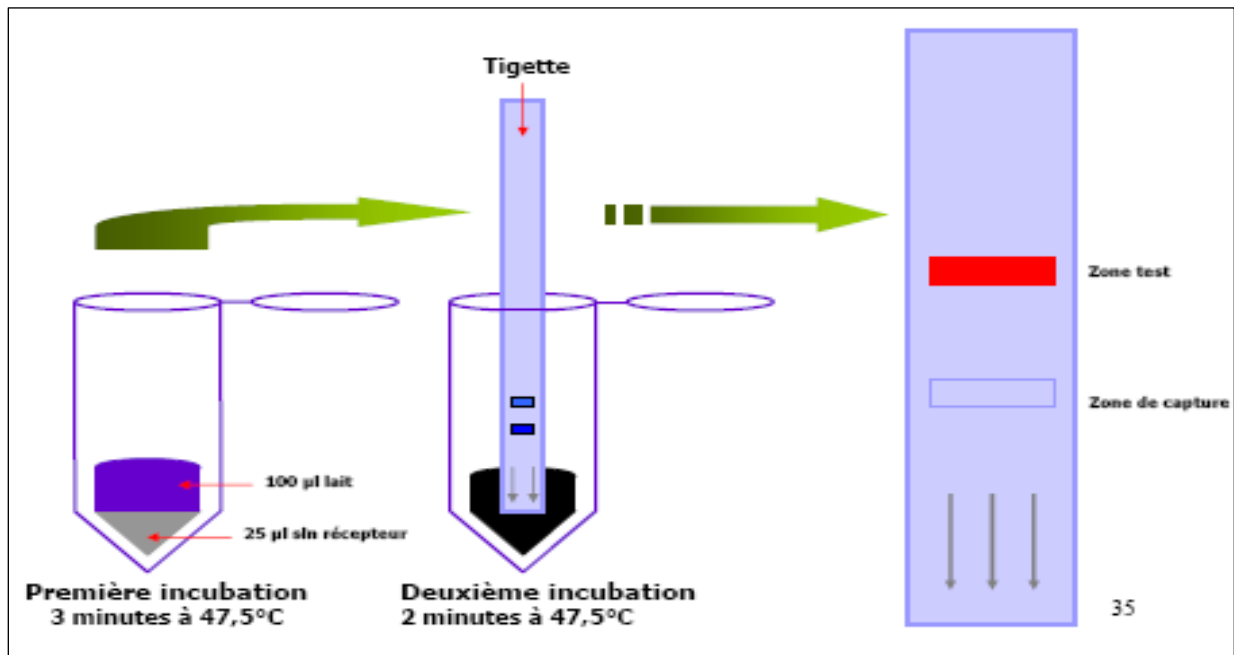


Figure n° 10 : Mode opératoire et résultats du Bêta STAR test, (Anonyme 3 f, 2006) ; (Scippo, 2008).

1.2.2.3. interprétation des résultats

Si la bande de référence n'apparaît pas, le test est considéré comme non-valide. Si la première bande a une intensité supérieure à celle de la bande de référence, le test est considéré comme étant négatif. Si par contre, l'intensité de la première bande est égale ou plus faible que la bande de référence, l'échantillon sera positif. Et dans le

dernier cas, si la première bande n'apparaît pas du tout, l'échantillon sera ultra contaminé.

En excluant tout les faux négatifs mais en admettant une quantité négligeable de faux positifs. Le B-STAR étant un test qualitatif, voire semi quantitatif, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

1.3. METHODES IMMUNOLOGIQUES

Il existe plusieurs sortes de tests rapides immunologiques qui détectent les résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. Sur le marché, les immuno-essais décrits pour l'analyse des antibiotiques sont répartis principalement en 2 groupes. Il y a les tests RIA (Radio Immuno Assay) et les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

1.3.1. RIA (RADIO-IMMUNO ASSAY) ET RRA (RADIO-RECEPTEUR ASSAY)

1.3.1.1. principe du test RIA et du test RRA

Le test RIA est basé sur la compétition qui existe entre l'antibiotique marqué par un isotope et ce même antibiotique non marqué présent dans l'échantillon à doser, pour un récepteur bactérien. C'est à dire des bactéries porteuses de sites de liaisons spécifiques vis-à-vis de ces antibiotiques. Une variante du RIA est le RRA (Radio-Recepteur Assay) qui recourt à des récepteurs pour la famille d'antibiotiques envisagée au lieu d'anticorps dans le RIA. Les seuls receptor assays qui sont couramment utilisés pour l'analyse des résidus d'antibiotiques, sont ceux développés par CHARM SCIENCES. Le kit appelé Charm II Receptor Assays permet de détecter les β lactames, les tétracyclines, les macrolides, les aminoglycosides et le chloramphénicol dans les échantillons de lait, de viandes, dans les œufs et dans les fluides biologiques. En général, les tests RRA sont spécifiques à certaines familles d'antibiotiques et sont reproductibles mais ce type de test nécessite l'utilisation d'un compteur de rayons bêta ou gamma, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

La figure (11) résume le principe base des tests immunologiques RIA et RRA.

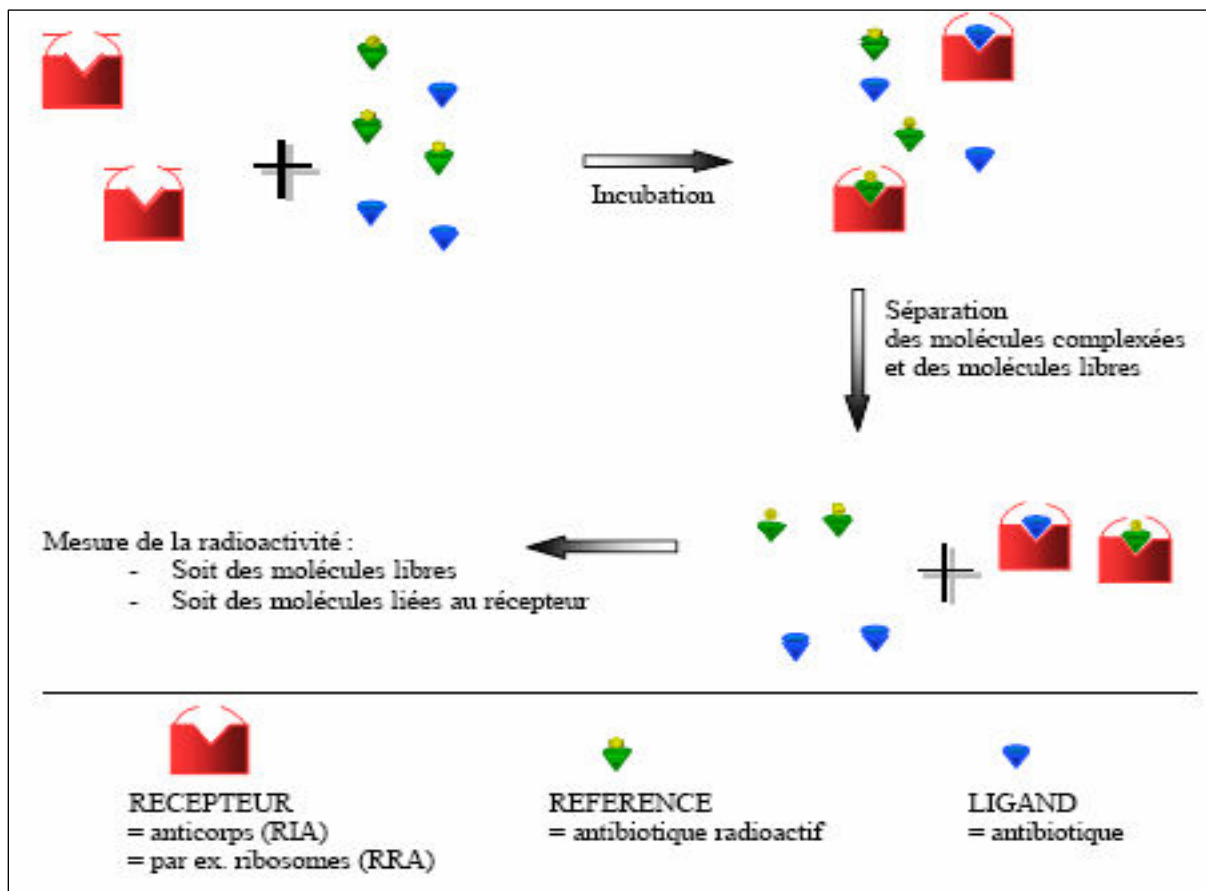


Figure n° 11 : Schéma de principe de RIA et RRA, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

1.3.2. ELISA (ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY)

1.3.3.1. principe de l'ELISA

Le test ELISA, quand à lui, se base sur le même principe que le RIA mise à part le fait que le marquage est enzymatique au lieu d'être radioactif. Les tests ELISA disponibles dans le commerce sont entre autres: le LacTek β -lactam, le Cite Probe et le Delvotest. Les résultats finaux obtenus sont basés sur un changement de couleur (Maghuin-Rogister et al, 2001).

La figure (12) montre le principe de base de l'ELISA.

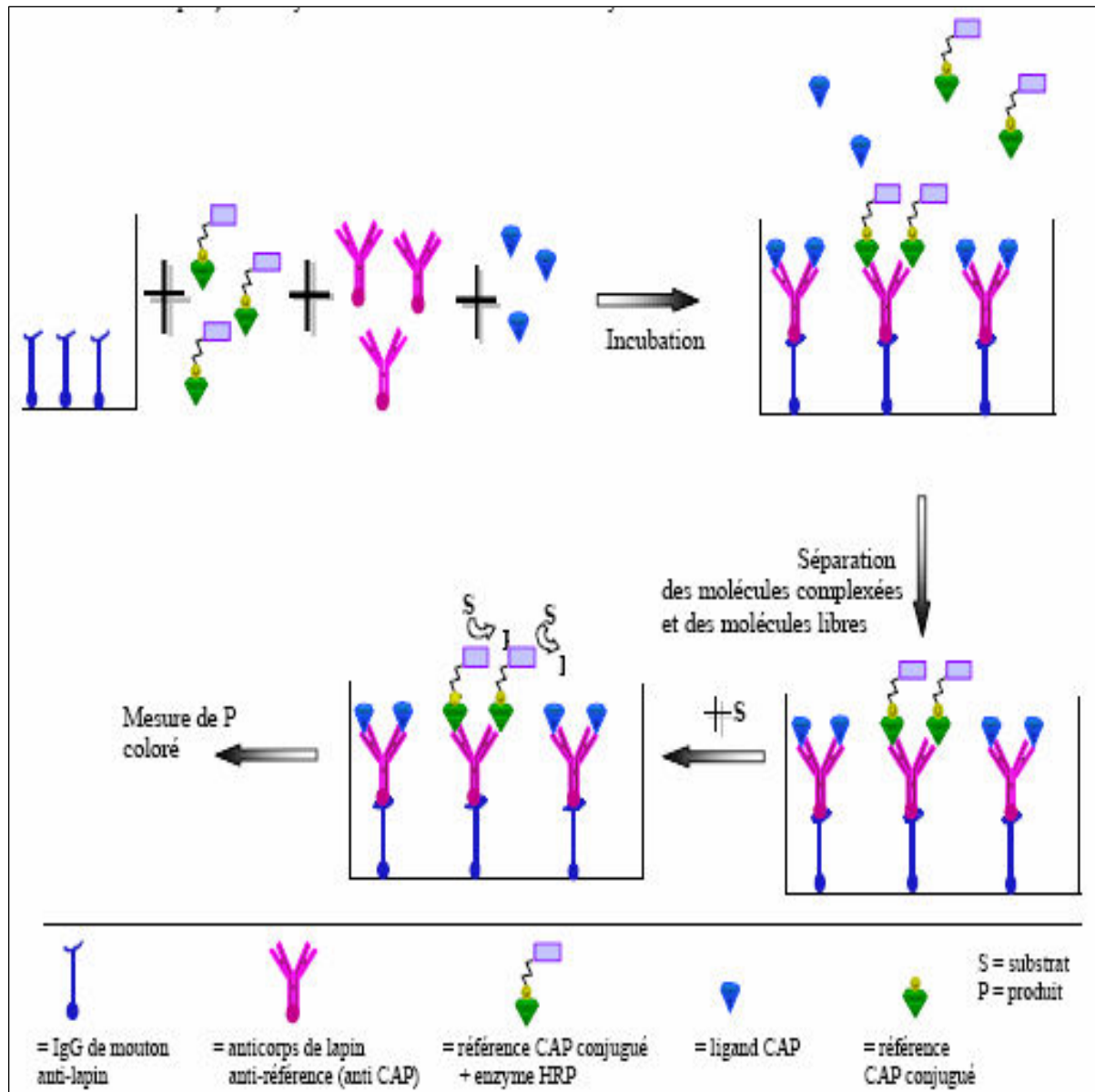


Figure n° 12 : Schéma de principe d'ELISA, (Maghuin-Rogister et al, 2001).

2. METHODES DE CONFIRMATION ET DE QUANTIFICATION

2.1. LES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

2.1.1. HISTORIQUE

La chromatographie est une science très ancienne. Ainsi on trouve la première référence d'un processus chromatographique dans l'Ancien Testament qui fait mention de propriétés adsorptives de certaine variété de bois pour adoucir de l'eau

amère. Ce sont les tanins hydrophobes qui constituaient une phase stationnaire apolaire (chromatographie d'adsorption).

Aristote décrit les propriétés que possèdent certaines terres pour purifier l'eau de mer. Les phénomènes mis en jeu relèvent ici de l'échange d'ions.

Au XVIème siècle, le strasbourgeois BRUNSWIG purifiait de l'éthanol en faisant passer la vapeur à travers une éponge imprégnée d'huile d'olive et réalisait une expérience de chromatographie gaz-liquide 400 ans avant la découverte de cette technique.

Toutefois, ce n'est qu'au début du XXème siècle, plus précisément le 21 mars 1903, que naquit la chromatographie. Ce jour-là et au hasard TSWETT, botaniste d'origine russe, présenta à Varsovie (en voulant filtrer des pigments végétaux d'une plante) son premier article sur une nouvelle sorte de phénomène d'adsorption et son application à l'analyse biochimique. Il y décrivait la formation de zone colorée lors de l'élution par l'éther de pétrole de pigments végétaux dans une colonne remplie de carbonate de calcium (craie (CaCO_3)) finement pulvérisée. Il s'aperçut que son tube de verre, rempli de cette substance, séparait différents composants de ses pigments qu'il put alors récupérer séparément ; la chromatographie était née. Depuis, la chromatographie a fait de gigantesques progrès. Elle ne se limite plus à de la séparation liquide sur colonne ; elle se décline de toutes les manières : HPLC, CCM, GC, avec fluides sur critiques, sur capillaire, avec toutes les variations de phases stationnaire et mobile que cela implique et qui sont basés sur des principes physiques différents. Et c'est pourquoi la chromatographie est à l'heure actuelle la meilleure technique de séparation et un des must en chimie analytique.

L'origine du mot chromatographie vient peut-être de cette séparation de composés colorés puisque CHROMA dérivant du mot grec *chrôma*, signifie couleur.

Puis les travaux de TSWETT tombèrent dans l'oubli pendant une vingtaine d'années et il faudra attendre 1931 la publication de KUHN et LEDERER sur la séparation des isomères du carotène et de la xanthophylle pour assister au développement de la chromatographie en tant qu'outil analytique. A partir de cette date, la chromatographie a prit son véritable essor.

Actuellement, certains types de chromatographe permettent la détection de quantités aussi infimes que des parties par billion (ppb) de composés, (Lavallaz et Délétroz, 1994) ; (Anonyme 2 d, 2005) ; (Anonyme 1 c, 2007) ; (Cuq, 2007).

2.1.2. DEFINITION

La chromatographie est avant tout une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une d'entre elles est constituée par un lit de matériau stationnaire ou fixe, au travers duquel s'infiltrer la deuxième phase mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successives sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase, (Lavallaz et al, 1994) ; (Anonyme 6, 1998) ; (Lavallaz et Barrandon, 2007) ; (Anonyme 7 b, 2008).

2.1.3. PRINCIPE DE BASE DE LA CHROMATOGRAPHIE

Le principe de base de la chromatographie repose sur une succession de cycles d'adsorption/désorption (équilibres dynamiques de concentration) des divers solutés présents dans le mélange entre deux phases non miscibles, (Anonyme 1 c, 2007) :

- une phase stationnaire fixe (Φ_{Stat}) : particules solides finement divisées modifiées en surface contenues dans une colonne, ou molécules greffées directement sur la paroi interne de la colonne
- une phase mobile (Φ_{Mob}) : phase liquide ou phase gazeuse, qui entraîne les solutés au travers de la phase stationnaire

Les solutés migrent au travers de la colonne sous des effets antagonistes, (Anonyme 7 b, 2008) :

- effet d'entraînement des solutés par la phase mobile qui s'écoule au travers de la phase stationnaire
- effet de rétention des solutés par la phase stationnaire (adsorption réversible, interactions moléculaires, polaires, ioniques, diffusion)

En fonction de l'affinité de chacun des solutés vis-à-vis des phases mobiles et stationnaires, chaque soluté aura une vitesse de migration différente lors de son passage au travers de la colonne. Les solutés du mélange sont donc progressivement séparés, (Lavallaz et Délétroz, 1994) ; (Anonyme 1 b, 2007).

2.1.4. BUTS DE LA CHROMATOGRAPHIE

On peut distinguer deux objectifs principaux :

2.1.4.1. objectif analytique

Il s'agit d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement, l'opération se faisant par le seul processus chromatographique, auquel peuvent être associées, en passage direct, d'autres techniques analytiques chimiques ou physico-chimiques destinées à faciliter l'analyse qualitative (on qualifie cela de couplage). Les quantités analysées doivent être extrêmement minimales afin de ne pas s'écarter des règles d'idéalité de la thermodynamique (le coefficient de partage n'est autre qu'une constante d'équilibre thermodynamique, où les activités intervenant ne sont égales aux concentrations que si elles sont très faibles). Les systèmes de détection devront donc être très sensibles, (Anonyme 3 b, 2006).

2.1.4.2. objectif préparatif

Les concentrations des solutés sont ici importantes et on travaille hors des règles d'idéalité thermodynamiques. Les quantités produites demeurent cependant faibles (de l'ordre du μg / jour) et le procédé ne sera utilisé que pour préparer des substances rares, sensibles à la chaleur (protéines, etc.), (Anonyme 3 b, 2006).

2.1.5. TRAITEMENT DES TROIS PRINCIPAUX CHROMATOGRAPHIES

2.1.5.1. chromatographie liquide haute performance (HPLC)

2.1.5.1.1. instrumentation

Dans tout appareillage HPLC on retrouvera toujours les éléments de base suivants :

- un ou plusieurs réservoirs : qui contient la phase mobile en quantité suffisante ; qui peut être soit des solvants purs soit des mélanges de solvants dans des concentrations connues. Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'éluant (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse, (Anonyme 3 b, 2006) ; (Lebihan et Lemasson, 2008)
- une colonne remplie : en acier inox, de quelques centimètres de long. C'est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au delà,

les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées, (Anonyme 3 b, 2006)

- vanne d'injection : c'est un système d'injection comportant une boucle d'échantillonnage calibrée (généralement une vanne RHEODYNE), LeBihan et Lemasson (2008). Il existe des boucles de différents volumes. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative, (Anonyme 3 b, 2006)
- la pompe : elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler soit en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse ou bien en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant, (Anonyme 3 b, 2006). Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min
- un détecteur : permettant à la fois, de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne et de donner un signal proportionnel à la quantité de chacun de ces solutés, dans un mélange, (Lebihan et Lemasson, 2008)

2.1.5.1.2. nature des deux phases

La phase stationnaire (fixe)

Il existe deux types de la phase stationnaire :

- la phase normale : la phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations, (Anonyme 3 b, 2006)
- la phase inverse : la phase inverse est majoritairement composée de silices greffées par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en

premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante, (Anonyme 3 b, 2006)

La phase mobile

L'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire normale ou à polarité inversée se répercute sur les temps de rétention des solutés. La polarité de la phase stationnaire permet de distinguer deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur les facteurs de rétention k des composés

La composition de la phase mobile peut être soit :

- maintenue constante (utilisation d'un solvant pur ou d'un mélange de solvants de composition constante dans le temps) durant toute l'analyse, la séparation sera dite en mode isocratique.
- modifiée progressivement (utilisation d'un mélange de solvants dont la composition est variable dans le temps), la séparation sera dite en mode avec gradient d'élution, (Anonyme 3 b, 2006) ; (Anonyme 1 c, 2007).

2.1.5.1.3. principaux solvants utilisés en HPLC

Le tableau (15) nous indique les principaux solvants utilisés en HPLC ainsi que les phénomènes mise en jeu.

Tableau n° 15 : Les principaux solvants utilisés en HPLC, (Anonyme 1 e, 2007).

| Phénomène | Solvants |
|----------------|--|
| Adsorption | Hexane, méthanol, acétonitrile, dichlorométhane, chloroforme |
| Partition | Méthanol-eau, acétonitrile-eau |
| Echange d'ions | Solution tampon (pH contrôlé) |
| Exclusion | Tétrahydrofurane, toluène |

Le tableau (16) résume les différents types de chromatographie liquide.

Tableau n° 16 : Tableau résumé des différents types de chromatographie liquide, (Anonyme 7 a, 2008).

| Phase stationnaire | Principe de séparation | Caractéristiques de la phase stationnaire | Principe de la fixation et de l'élution |
|---------------------------|--------------------------------|--|--|
| Liquide | Partage | Liquide fixé sur un support inerte (papier, silice...) | Distribution des composants du mélange à séparer dans les deux phases liquides selon leur coefficient de partage |
| Solide | Adsorption | Adsorbant solide polaire | Phénomène de surface : formation de liaisons spécifiques entre les composants et la surface adsorbante |
| | Adsorption phase inverse | Molécules hydrophobes greffées sur de la silice | Interactions hydrophobes et élution par diminution de la polarité de la phase mobile |
| | Echange d'ions | Résine (polymères d'oses) porteuse de groupements chargés négativement ou positivement | interactions électrostatiques avec les composants de charge opposée |
| | Exclusion (filtration sur gel) | Solide poreux | Les composants de diamètre supérieur à celui des billes du support sont exclus et ceux de diamètre inférieur y diffusent et sont freinés |
| | Affinité | Support sur lequel est greffée une molécule (le ligand) spécifiquement reconnue par un des | Déplacement de l'équilibre de liaison [molécule - ligand greffé] en faveur de l'équilibre [molécule - tierce molécule] |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | composants de l'échantillon à analyser | |
|--|--|--|--|

2.1.5.1.4. schéma de principe d'une HPLC

La figure (13) résume le schéma de principe de base d'un appareillage HPLC.

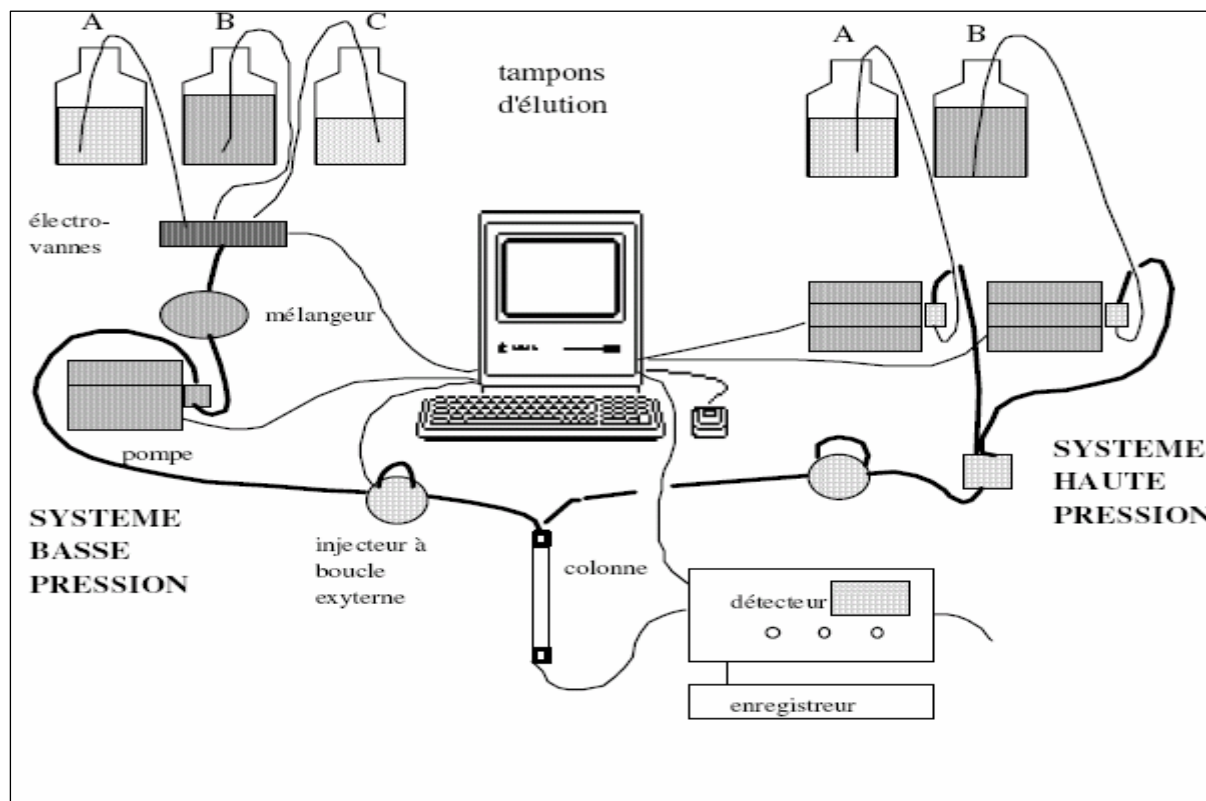


Figure n° 13 : Schéma de principe d'une HPLC, (Anonyme 1 e, 2007) ; (Cuq, 2007).

2.1.5.1.5. champs d'application de l'HPLC

Composées polaires, thermolabiles... (Herbette et al, 2002) :

- service des explosifs : analyse de composés explosifs
- service des stupéfiants : analyse de drogues (cannabis, héroïne...).
- service de toxicologie : analyse de drug (barbituriques, benzodiazépines, anti-inflammatoires, anticonvulsifs, analgésiques...)
- service environnement : analyse de pollutions (déversement...)
- service agro-alimentaire : analyse des résidus des antibiotiques, pesticides ...

2.1.5.2. chromatographie en phase gazeuse (CPG)

2.1.5.2.1. définition et principe

La CPG est un procédé de séparation pour les mélanges gazeux complexes ainsi que pour les liquides et les solides vaporisables sans décomposition. C'est sans doute la principale contrainte qu'il faut savoir apprécier avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. Un grand nombre de molécules organiques peuvent être séparées directement ou après transformation lorsqu'elles sont peu volatiles. Des réactions de dérivation permettent d'améliorer, pour certains composés, ces deux conditions, (Anonyme 5, 2000).

La CPG s'applique donc à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur. La phase mobile est alors un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur, qui balaie en permanence la colonne. Cette dernière, placée dans un four thermostaté, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Un grand choix de détecteurs permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélanges très complexes.

Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine, zéolites ou autres polymères adsorbants), c'est de la chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption, (Anonyme 1 g, 2007).

Il existe cinq mécanismes de chromatographie (utilisés séparément ou en association), qui se distinguent sur une base théorique par la nature des forces agissant entre support et molécules à séparer, (Anonyme 5, 2000).

La figure (14) illustre le schéma de principe d'un appareillage CPG.

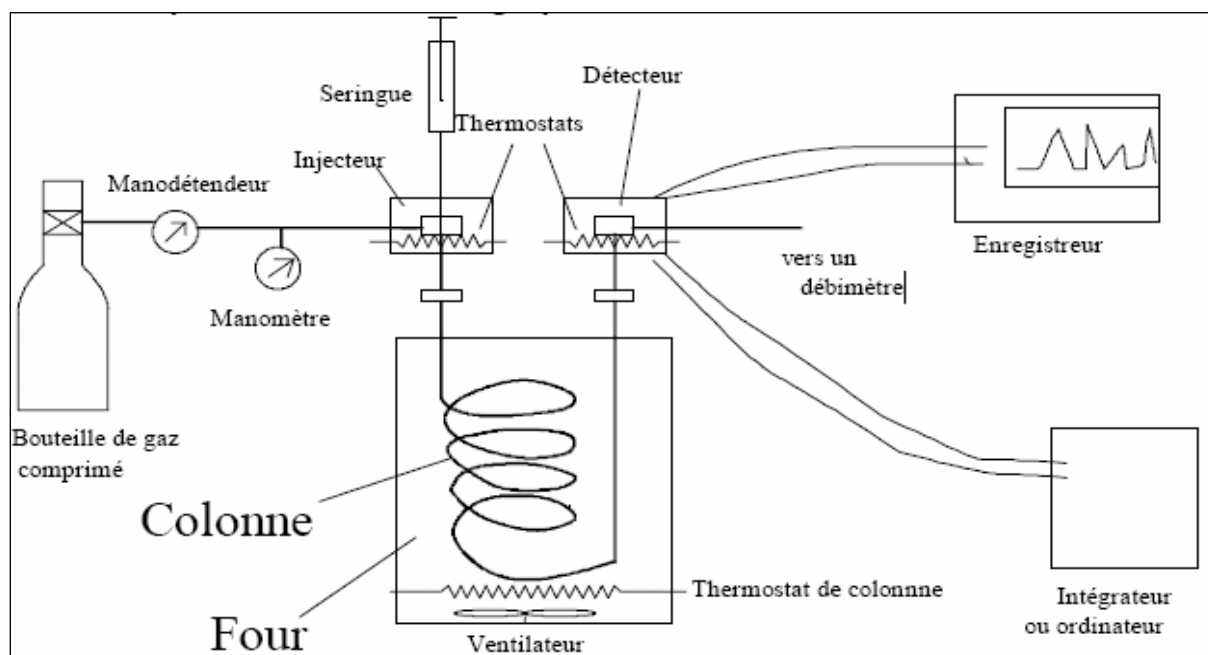


Figure n° 14 : Schéma de principe d'un appareillage CPG, (Anonyme 3 b, 2006)

2.1.5.2.2. organes d'un appareillage CPG

L'appareillage permettant l'analyse chromatographique en phase gazeuse comprend :

- une source de gaz : de nature variable (Hydrogène, hélium, azote sont les gaz vecteurs les plus utilisés). Les gaz sont prélevés dans une bouteille sous pression. Un manodétendeur permet d'obtenir la pression d'entrée cherchée, souvent de l'ordre de quelques bars. Un manomètre, placé en amont de l'injecteur, permet d'avoir une indication, peu précise de la pression d'entrée dans la colonne, (Anonyme 5, 2000) ; (Anonyme 2 b, 2005)
- une chambre d'injection : qui provoque la volatilisation instantanée de l'échantillon introduit et assure le mélange homogène de la vapeur ainsi formée avec le gaz de la phase mobile. Deux systèmes sont essentiellement utilisés : les vannes d'injection (systèmes de robinets à voies multiples qui permettent, par un simple mouvement de rotation, de faire passer un échantillon de gaz, à partir d'un circuit parallèle, dans le circuit gazeux du chromatographe. Le volume de la boucle d'échantillonnage est de quelques centimètres cubes environ. Ce système est très utilisé en HPLC), et le système utilisant une seringue (C'est le système le plus utilisé : servant comme chambre d'injection pour les liquides ou solutions). Cette chambre

d'injection est reliée à une colonne et traversée par le gaz vecteur, (Anonyme 5, 2000).

- une colonne de chromatographie : balayée par la phase mobile gazeuse et placée à l'intérieur d'un four parfaitement thermorégulé (muni d'éléments chauffants pouvant contrôler la température du four avec une très grande précision). Des contrôles permettent également de travailler à température programmée pour la séparation de mélanges de composés ayant des capacités de rétention très différentes sur la phase stationnaire placée entre la chambre d'injection et le détecteur, (Anonyme 1 e, 2007). La colonne est formée d'une spirale creuse en verre ou en métal, dont la longueur varie de 2 à 4 mètres, (Anonyme 2 b, 2005).
- un détecteur : placé à l'extrémité de la colonne qui détecte la présence des substances dans la phase mobile au fur et à mesure de leur élution. Il y a plusieurs types de détection : détection à conductibilité thermique (TCD THERMAL CONDUCTIBILITY DETECTOR), détection à ionisation de flamme (FID Flame Ionisation Detector), détection thermoionique (TSD Thermoionic Specific Detector ou NPD Nitrogen-Phosphorus Detector), détection à capture d'électrons (ECD Electron Capture Detector), détection à photométrie de flamme (FPD Flame Photometry Detector et DFPD Dual Flame Photometry Detector), détection d'ions (ITD Ion Trap Detector), détection à photoionisation (PID Photo-Ionisation Detector), détection par diffusion de lumière, détection olfactive, détections couplées (Les appareillages les plus récents permettent de coupler trois types de détections les unes derrière les autres), (Anonyme 5, 2000), (Anonyme 3 b, 2006)
- un enregistreur : qui reçoit le signal électrique fourni par le détecteur et qui sera amplifié et transcrit sous forme graphique. A chaque substance correspond une courbe assimilée à une courbe de Gauss dont la surface est proportionnelle aux concentrations, (Anonyme 5, 2000) ; (Anonyme 2 b, 2005)

2.1.5.2.3. principaux gaz utilisés en CPG

Le tableau (17) nous montre les principaux gaz utilisés en CPG ainsi que les principaux détecteurs.

Tableau n° 17 : Principaux gaz utilisés en CPG, (Anonyme 5, 2000).

| Détecteur conductivité | Détecteur flamme | Détecteur à capture d'électrons |
|------------------------|------------------|---------------------------------|
| Hydrogène | Hélium | Argon + Méthane |
| Hélium | Azote | Hélium |
| Argon | Argon | Azote |
| Néon | | |

2.1.5.2.4. domaines d'application de la CPG

Celui-ci est très large. On peut envisager le dosage des acides gras libres, dans le sérum, des acides aminés, des composés toxiques (exemple : les organochlorés dans le lait) ou les médicaments (surtout les antibiotiques). En effet, la CPG est très largement utilisée dans les laboratoires de toxicologie et de pharmacologie (notamment les antibiotiques), (Anonyme 2 b, 2005)

2.1.5.3. chromatographie sur couche mince (CCM)

Bien que découverte en 1938, ce n'est qu'en 1958 que fut popularisée la CCM, telle que nous la connaissons actuellement. Cette technique a rapidement supplanté la chromatographie sur papier, car elle est plus rapide et est utilisée autant pour les composés polaires que non polaires, (Anonyme 1 e, 2007).

2.1.5.3.1. principe de la CCM

Dépendant du choix des phases stationnaire et mobile, il est possible de réaliser sur couche mince des chromatographies en exploitant les phénomènes d'adsorption, de partition ou d'échange d'ions, (Anonyme 1 e, 2007).

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques

retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile, l'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en CCM, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires, (Anonyme 6, 1998).

2.1.5.3.2. organes d'un appareillage CCM

L'appareillage utilisé pour la CCM est relativement simple, étant composé d'une plaque et d'une cuve rectangulaire pour l'élution. On peut également utiliser un simple bocal de verre pour les couches minces plus petites. Les plaques peuvent être préparées en répandant à l'aide d'un étaleur une mince couche uniforme de la phase stationnaire sur une plaque de verre, dont les dimensions varient de 2,5 × 7 cm à 20 × 20 cm. On retrouve cependant dans le commerce des plaques prêtes à l'usage avec la phase stationnaire fixée sur une feuille en plastique ou en aluminium. Ces dernières ont l'avantage d'être faciles à entreposer et découpables en bandes selon les besoins de l'expérimentateur. Les phases stationnaires les plus utilisées en CCM sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose en poudre. La plupart des plaques commerciales contiennent un indicateur de fluorescence qui permet la visualisation des taches à la lumière ultraviolette, (Anonyme 1 e, 2007).

Les principaux éléments d'une séparation CCM sont :

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche
- la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique
- l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant
- l'éluant : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon, (Anonyme 6, 1998).

Le principe de base d'une séparation CCM est résumé dans la figure (15).

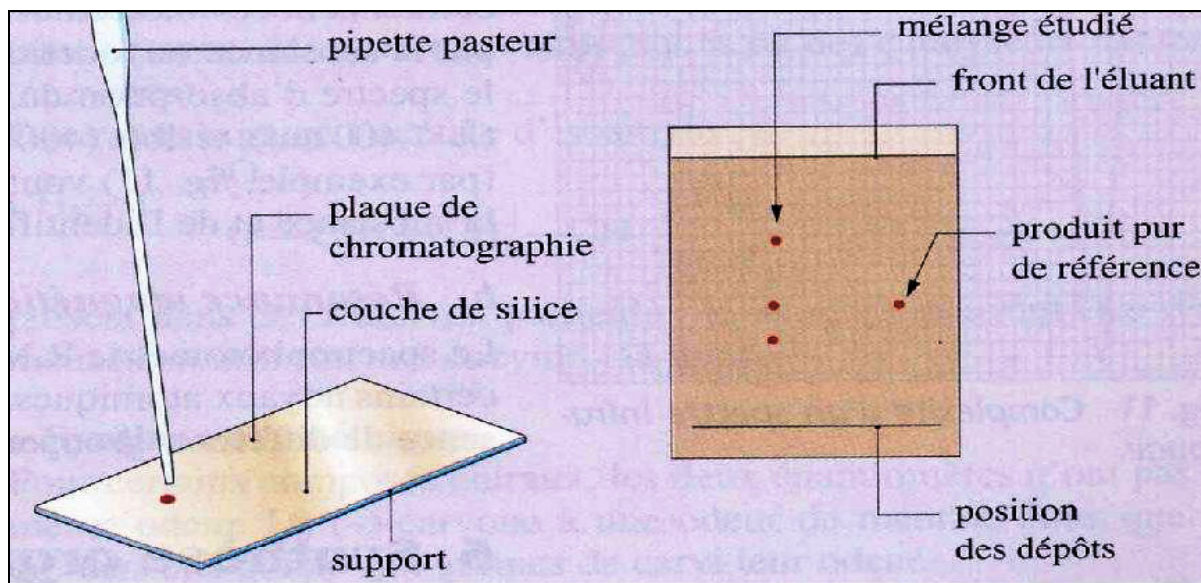


Figure n° 15 : Schéma de principe d'un appareillage CCM, (Gardebien, 2007)

2.1.5.3.3. principaux éluants utilisés en CCM

- hydrocarbures : hexane, éther de pétrole ou benzène
- groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangés en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne
- de composés polaires : éthanoate d'éthyle, propanone ou méthanol, (Anonyme 3 b, 2006)

2.1.5.3.4. domaines d'applications de la CCM

Lorsque les conditions opératoires sont connues, elle permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur. De plus, étant donné que la CCM indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

La CCM est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne, (Anonyme 6, 1998).

2.2. METHODE SPECTROMETRIQUE (SPECTROMETRIE DE MASSE (SM))

2.2.1. HISTORIQUE

Première mesure de spectres de masse en 1912 par Thompson et méthode d'ionisation et passage dans un secteur magnétique par Arnot et Milligan en 1918. Utilisation en 1919 des masses atomiques par Aston. Montage en 1946 d'un appareil à temps de vol (TOF-MS) par Stephens, celui d'un analyseur par filtre quadripolaire en 1953-58 par l'équipe de Paul. Branchement de la CPG en 1956 par Gohlke et McLafferty. Utilisation en 1965 de l'appareil ionique à cyclotron par résonance par l'équipe Ripple et son équipe. Application de l'ionisation chimique par Munson et Field en 1966, de l'ionisation électrospray par Dole et son équipe en 1968 et la thermospray par l'équipe de Blakely. Couplage de la chromatographie en phase liquide en 1973 par McLafferty. Depuis ce temps, la technique du spectromètre de masse s'est constamment améliorée, (Anonyme 7 a, 2008).

2.2.2. DEFINITION

La spectrométrie de masse est une méthode physico-chimique permettant d'identifier un principe toxique. C'est une méthode de mesure des rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations. Pour cela, le spectromètre de masse doit assurer les opérations suivantes:

- volatiliser : Séparer les molécules les unes des autres : on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux
- ioniser : Transformer les molécules en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques
- mesurer les rapports m/z : La masse moléculaire est calculée à partir du rapport masse (m)/nb de charges (z), (Anonyme 2 c, 2005)

2.2.3. PRINCIPE DE LA SM

Le spectrographe de masse consiste à ioniser par des électrons une molécule A. Celle-ci va donc donner une entité A^+ ayant perdu un électron. A^+ va pouvoir se scinder en plusieurs groupements (chargé + ou non) plus petits, ou bien se réarranger. On accélère alors ces particules par un champ électrique, puis elles sont déviées par un champ magnétique.

Un spectrographe de masse dans lequel on ne modifie aucun paramètre ne va pouvoir être étalonné. Il sera étalonné en masses molaires, puisque e est constant. Le nombre de molécules aura une incidence sur la plaque sensible du détecteur : plus nombreux sont les ions d'un type donné, plus intense sera la tache obtenue. Actuellement, les détecteurs informatisés permettent d'obtenir directement un spectre étalé, (Anonyme 8, 2001).

Le principe de la SM est résumé dans la figure (16).

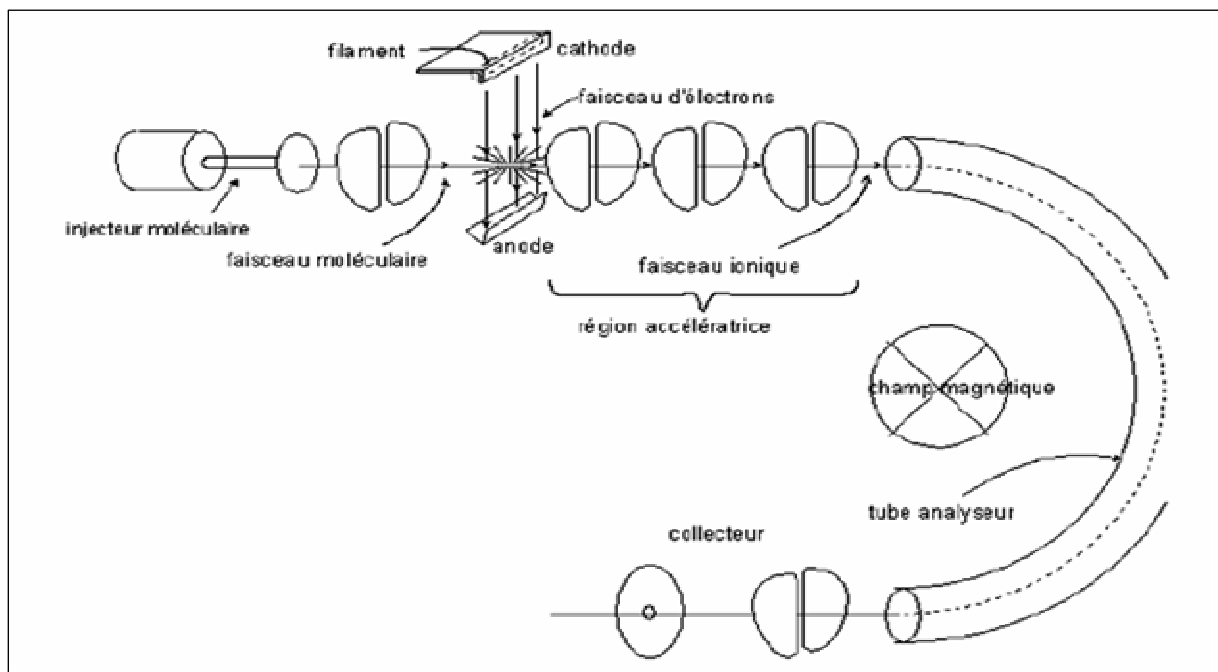


Figure n° 16 : Schéma de principe de base d'une SM (Anonyme 3 b, 2006)

2.2.4. ORGANES D'UN APPAREILLAGE (SM)

De façon très classique, un appareillage SM se compose de trois parties distinctes :

- une source d'ions, enceinte au sein de laquelle les ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé (obtention d'ions en phase gazeuse). Il existe de nombreux types de sources d'ions et chacun de ces types de sources repose sur un principe physique différent. Le principe physique qui permet de volatiliser et l'ioniser un type de composé est choisi par l'opérateur en fonction des caractéristiques de la molécule à analyser. Les étapes de volatilisation et d'ionisation se font successivement ou simultanément selon le type de source
- un analyseur dont l'objet consiste à mesurer, pour chacune des espèces ioniques issues de la source d'ion, le rapport entre sa masse (m) et sa charge

(q). De façon conventionnelle, ce n'est pas la valeur de la charge (q) qui est utilisée mais plutôt la valeur absolue du nombre de charge (z). Les ions se voient donc attribuer une valeur m/z caractéristique qui s'exprime en «Thomson» (Th)

- un détecteur qui mesure, en fonction des différentes valeurs de m/z , l'intensité de signal qui leur correspond.

Les critères de choix principaux d'une source d'ions sont: la volatilité et la stabilité thermique du composé à analyser, sa labilité chimique, les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation, la taille des molécules, les quantités de produit disponibles, et enfin le type d'introduction souhaitée (directe ou en couplage chromatographique), (Anonyme 8, 2001).

2.3. COUPLAGE CPG – SM ET COUPLAGE HPLC – SM

Nombreux sont les laboratoires de chimie analytique aujourd'hui équipés d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse ou chromatographe en phase liquide (HPLC) couplé à un spectromètre de masse. La technique est généralement désignée par ses utilisateurs sous le terme abrégé de "GC-MS" Gas Chromatography – Mass Spectrometry pour la première et LC-MS pour la deuxième. La GC-MS et HPLC-MS sont aujourd'hui à son apogée et trouvent des applications dans des domaines aussi variés tels que l'industrie agroalimentaire, la médecine, la pharmacologie ou l'environnement, (Bouchonnet et Libong, 2007).

Les limites de la GPC-MS et de la HPLC-MS sont celles de CPG et HPLC. Le facteur limitant étant la volatilité et la miscibilité des analytes, (Bouchonnet et Libong, 2007).

PARTIE

EXPERIMENTALE

CHAPITRE I

MATERIELS ET METHODES

Ce travail entre dans le cadre d'un projet de recherche en cours dans notre laboratoire de recherche et intitulé «Surveillance de la chaîne alimentaire – Détection et quantification des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale. Cinétique des principaux antibiotiques utilisés en pratique vétérinaire en Algérie ».

Dans ce sens et afin de pouvoir détecter et quantifier les résidus d'oxytétracycline et de la colistine dans le muscle du poulet de chair, il est impératif d'optimiser les paramètres d'analyse à savoir, la phase stationnaire, la phase mobile, la longueur d'onde d'absorbance, le débit de la phase mobile et enfin le volume injecté.

D'autre part, il a fallu procéder avant d'entamer l'optimisation de ces paramètres d'analyse, au calibrage de l'appareillage.

1. MATERIELS

1.1. APPAREILLAGE HPLC

Nous avons utilisé un chromatographe de type HPLC SHIMADZU LC-10A séries équipé de :

- un dégazeur de type : Modèle DGU-20A5 prominence DEGASSER. (Réf.S/N.L20244301983CR. SHIMADZU Corporation.2006). C'est un dégazeur en ligne qui utilise la membrane de fluoroéthylène, la capacité interne est seulement 1/25 des autres modèles des dégazeurs, et le temps d'attente ou remplacement ou la stabilisation de phase mobile peut être sensiblement réduit. Il sert comme son nom l'indique à enlever les bulles d'air emprisonnés dans la phase mobile

- deux pompes de haute pression Modèle : LC-10ATvp (Réf. S/N : C20974009859J2. SHIMADZU Corporation.2002) pour la première et Modèle: LC-10ATvp (Réf. S/N: C21014009440CD. SHIMADZU Corporation.2002) pour

la seconde. Ils nous permettent de travailler soit en mode isocratique (une seule pompe sera activée pour un solvant ou un mélange constant de solvants), soit en mode gradient binaire (et dans ce cas là les deux pompes seront tout les deux utilisées pour deux éluants différents)

- un détecteur UV-VIS DETECTOR. Modèle : SPD-10Avp/10AVvp (Réf. S/N: C21004001496LP. SHIMADZU Corporation.2002). Ce détecteur est muni de deux lampes : une lampe à deutérium "D2" et une autre lampe tungstène "W". Quand la première lampe est allumée, la longueur d'onde peut être fixée dans un point d'un intervalle allant de 190 à 370 nm. Par contre si la deuxième pompe qui est allumée la longueur d'onde peut être fixée dans un point d'un intervalle allant de 370 à 900 nm. Le choix de la lampe avec laquelle on travaille dépend de la longueur d'onde de la molécule utilisée (c'est à dire la longueur d'onde où la molécule absorbe le maximum), si elle se situe dans le premier intervalle on choisit la première lampe, par contre si elle se situe dans le second intervalle on choisit la deuxième lampe

Entre les organes précédemment cités, il existe un system d'évacuation qui permet d'évacuer tous les liquides issus d'une fuite.

- une colonne analytique en phase inverse nommée C18 de type shimadzu VP-ODS 250 L x 4.600
- précolonne (10LX4.6) remplie de phase lichrospher 100 rp 18-e (merck), 5µm
- une vanne d'injection à boucle échantillonnage d'une capacité de 20 µl
- système de contrôle (intégrateur) : Le contrôleur de système utilisé au niveau de notre appareillage est de type SYSTEM CONTROLLER, Modèle : SCL-10Avp. (Réf. S/N: C21014009440CD. SHIMADZU Corporation.2002). Il commande directement tous les composants de série VP, son menu d'affichage est simplifié. Et il est lié directement à l'ordinateur
- ordinateur, de type Hewlett Packard (hp). Processeur : Intel Pentium (4), System d'exploitation: Windows 2000, supportant un logiciel pilote de

traitement de données des modules HPLC (Chromatography Workstation-CLASS-VP. Release 6.12 SP1. (SHIMADZU CORPORATION. P/N 223-05225C). Il nous permet de manipuler et d'analyser d'une manière très aisée les graphes obtenus. Cet ordinateur nous permettent aussi de gérer certains paramètres de détection et de quantification avec les quels on doit travailler à savoir le débit, la pression des deux pompes, la longueur d'onde, le temps d'analyse, le mode de travail (isocratique ou bien gradient binaire et surtout d'effectuer l'étalonnage par rapport au standard utilisé)

- flacons : Ils sont en verre, et ils sont au nombre de quatre. Deux contiennent la phase mobile (chacun pour une pompe), un recueille les déchets d'analyse et un recueille la phase mobile après purgation de la tuyauterie

- une tuyauterie qui est faite de trois types de tubes :
 1. tuyau en plastique 1cm de calibre
 2. tuyau en plastique 0,5cm de calibre
 3. tuyau en plastique 2mm de calibre

La figure (17) nous montre l'appareillage HPLC utilisé pour l'optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'oxytétracycline et de colistine.



Figure n° 17 : Appareillage HPLC et le PC utilisés.

1.2. LE DISPOSITIF DE FILTRATION

Le dispositif de filtration utilisé est de type SUPELCO. Cat.58061 & 58062U.

Tous les liquides utilisés dans l'HPLC doivent passer par ce dispositif. L'emploi de ce dernier nous permet de prévenir les artefacts et les pics parasites.

La figure (18) nous montre le dispositif de filtration qui a été utilisé pour filtrer les solvants de la phase mobile et les différents milieux liquides utilisés.



Figure n° 18 : Dispositif de filtration.

1.3. LE PETIT MATERIEL

1.3.1. BALANCE ANALYTIQUE

C'est une balance très sensible dont les caractéristiques sont : Marque SALTEC, Modèle. SPB31, Max : 210 g, D : 0,1mg, Tare : 0,00000.

La figure (19) nous montre la balance analytique utilisée durant les différentes pesées réalisées au cours du travail.



Figure n° 19 : Balance analytique.

1.3.2. SERINGUES D'INJECTIONS

Il en existe des seringues de différentes capacités de 20 – 250 μl et ils sont de type Syringe Perfection (SGE. Réf. C 670-12554-03).

La figure (20) illustre une seringue d'une capacité de 25 μl qui a été utilisée pour faire les injections du standard colistine.



Figure n° 20 : Seringue d'une capacité de 25 μl .

1.3.3. AGITATEUR VIBRANT

De type Richard Wolf GmbH. Type : 2033. (Réf.266).

La photo (21) illustre un agitateur vibrant qui a été utilisé pour agiter les solutions standards que nous avons préparées.



Figure n° 21 : Agitateur vibrant.

1.3.4. FLACONS STERILES EN PLASTIQUE

Où nous avons met les solutions mères des standards ainsi que les différents dilutions réalisées. Ils ont une capacité volumique de 100 ml.

1.3.5. MACRO-PIPETTE DIGITALE

Cette macro-pipette est de type SOCOREX CALIBRA® 832. Elle a une capacité volumique de 10 et 20 ml.

La micropipette illustrée par la figure (22) a été utilisée pour prélevés les solutions liquides ainsi que les solvants que nous avons utilisés durant notre travail.



Figure n° 22 : Macro-pipette automatique.

1.3.6. BAIN A ULTRA-SON

Le bain ultrasons que nous avons utilisé est de type BRANSON 200 (ULTRASONIC CLEANER).

La figure (23) nous indique le bain ultrason utilisé pour expulser les bulls d'air emprisonner dans la phase mobile et les solutions standards préparés.



Figure n° 23 : Bain ultrason servant à l'élimination des bulles d'air emprisonnés dans les différentes solutions liquides utilisées durant l'optimisation.

1.3.7. FILTRE MILLIPORE

Le papier filtre utilisé pour filtrer les solutions de la phase mobile est de type SUPELCO (0.45 μm x 4.7mm).

La figure (24) nous montre deux boites de papier filtre qui sont utilisées pour filtrer la phase mobile après chaque usage.



Figure n° 24 : Deux boites de papier filtre.

2. REACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUES

Tous les standards et dissolvants étaient de catégorie de chromatographie liquide sous haute pression et les réactifs étaient de catégorie analytique.

L'acétonitrile et le méthanol sont le plus souvent utilisés. Tous les dissolvants et solutions seront filtrés à l'aide de la membrane filtre et dégazé avant emploi avec un le bain ultrasons à chaque usage.

Les références suivantes sont données à titre indicatif. Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique et l'eau utilisée est ultra pure.

2.1. COMPOSE PHYWEE

Ce produit chimique est spécialement préparé par le fournisseur PHYWEE. Il a été utilisé pour le calibrage de l'appareillage (HPLC). C'est un mélange de quatre molécules à savoir :

- anthracène
- tetracène
- acénaphène
- acénaphylène

2.2. STANDARDS PURS (ETALONS)

Durant le travail que nous avons réalisé, deux types de standards purs ont été utilisés :

- standard oxytétracycline : Oxytetracyclin Hydrochloride VETERANAL. (Réf: 46598. SIGMA-ALDRICH)
- standard colistine : (Colistin sulfate salt, 100mg. (Réf. 095K1048. SIGMA-ALDRICH)

2.2.1. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DU STANDARD OXYTETRACYCLINE

Le premier standard dont les paramètres d'analyse seront optimisés, possède les caractéristiques chimiques suivants :

- nom du produit : oxytétracyclin hydrochloride VETRANAL.
- une formule chimique de : $C_{22}H_{25}CLN_{209}$.
- sa masse molaire : 496.9g / mole.
- nom du laboratoire fabricant : SIGMA-ALDRICH.

- date de fabrication : 25 janvier 2005.
- date de péremption : 25 janvier 2012.

L'oxytétracycline est un antibiotique à large spectre appartenant à la famille des tétracyclines. Cet antibiotique est produit par certaines souches de *Streptomyces* variété *rimosus*. Son introduction en thérapeutique a été fait dans la années 1950, (Jawetz, 1997, cité par Kaale et al, 2008).

L'oxytétracycline qui nous a été fourni est une poudre cristalline jaune (jaune d'or) crémeuse très hygroscopique, sans odeur. Sous sa forme de base (non ionisée), elle est peu soluble dans l'eau, en revanche elle soluble dans les solvants organiques (huiles, propylène glycol). La présence de plusieurs systèmes de double liaisons conjuguées (cycle A aromatique, enchaînement de B- dicétophénolique) explique leur absorption dans l'UV, (Puyt, 2006).

La structure chimique de l'oxytétracycline est indiquée dans la figure (25).

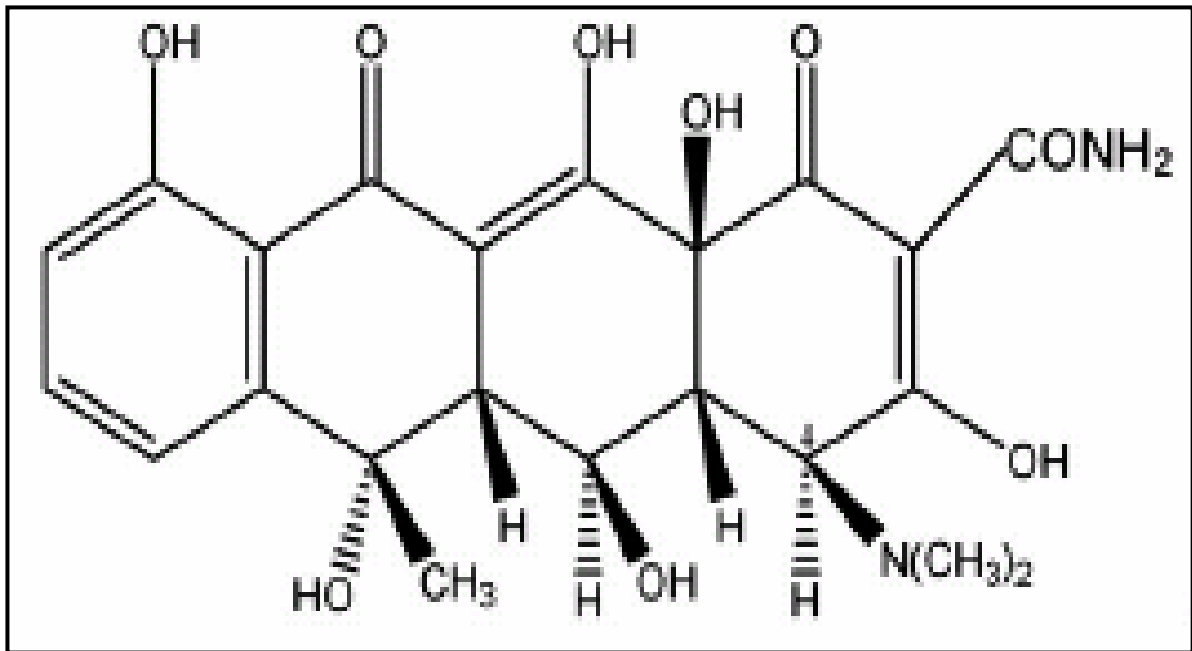


Figure n° 25 : Structure d'oxytétracycline, (Kaale et al, 2008).

2.2.2. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DU STANDARD COLISTINE

Synonymes : polymyxine E1 = Colistine A, Polymyxine E2 = Colistine B, Polymyxine E sulfate = Colistine sulfate, Colistini sulfas, Multimycine, Colymycine, First Guard Sterile Powder.

Le sulfate de colistine est un mélange de sulfates de polypeptides produit par certaines souches de *Bacillus polymyxa* variété *colistinus*. Ces polypeptides sont appelés polymyxines. La colistine est constituée majoritairement des polymyxines E1 (ou colistine A) et E2 (ou colistine B). C'est un décapeptide basique contenant un cycle heptapeptide et une chaîne grasse en position N terminale différente selon la polymyxine, (d'après Koyama et al, 1950, cité par Lynn G et Dieter, 2007).

La colistine qui nous a été fourni est une poudre blanche crémeuse très hygroscopique, sans odeur. Elle est soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol et pratiquement insoluble dans l'acétone et dans l'éther. La colistine est stable en solution aqueuse quand le pH est compris entre 5,5 et 8.

Les groupements aminés des acides aminés constituant la molécule sont fixés par la molécule dérivatisante.

La figure (26) illustre la structure chimique du standard colistine.

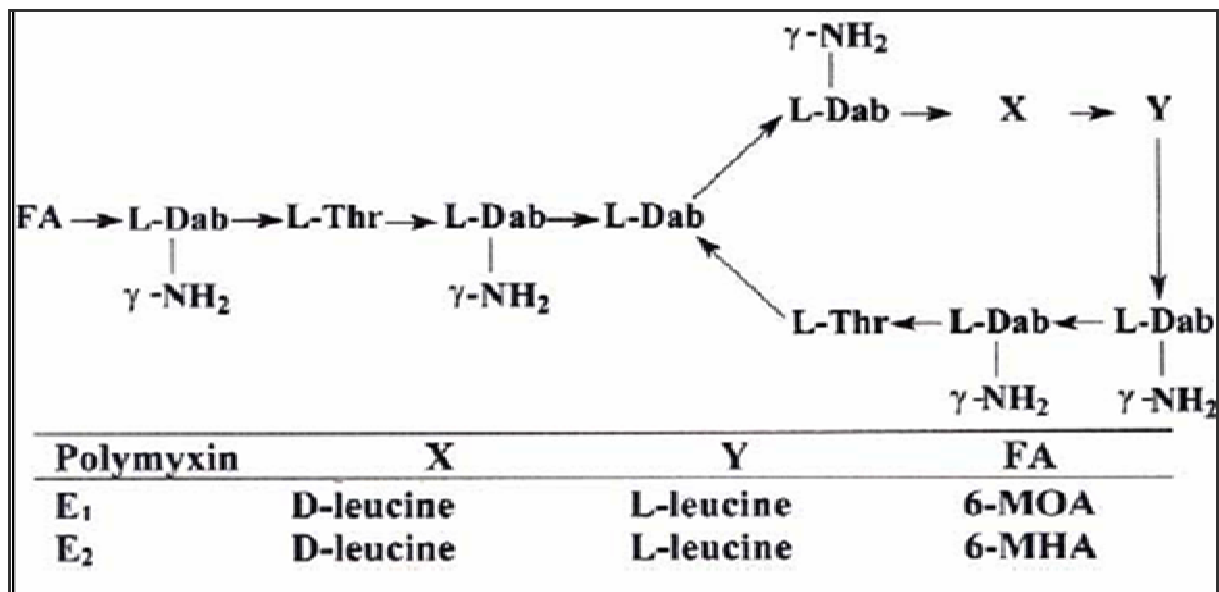


Figure n° 26 : Structure chimique de la colistine, (Cruciani, 2000 cité par Bouchard, 2004).

2.3. ELUANTS ET DILUANTS

- acétonitrile pour HPLC (Réf. Lot 6235A.SIGMA-ALDRICH).
- méthanol pour HPLC (Réf. Lot 5363C.SIGMA-ALDRICH).

3. AUTRES PRODUITS CHIMIQUES

Les autres produits chimiques que nous avons utilisés sont :

- l'eau : il est type eau pur pour la chromatographie (Water, CHROMASOLV plus, for HPLC Réf. Lot 34877.SIGMA-ALDRICH).

4. PROTOCOLE GENERALE D'ANALYSE

4.1. CALIBRAGE DE L'APPAREILLAGE

Etant donné que l'appareillage que nous avons utilisé pour réaliser notre travail expérimental n'a été jamais mis au fonctionnement, il a été nécessaire de procéder au préalable à son calibrage. Ce calibrage a été effectué grâce à un standard composé de quatre molécules différentes dont les paramètres d'analyse sont déterminés et bien connus. Ce standard nous a été fourni par la firme PHYWEE.

4.2. PREPARATION DES SOLUTIONS DE TRAVAIL

Les deux solutions mères des deux standards utilisés ne seront pas injectées tous les deux simultanément.

4.2.1. SOLUTION-MERE D'OXYTETRACYCLINE

Deux solutions mères ont été préparées ; dans la première nous avons mélangé 4mg d'oxytétracycline (standard pur) avec 10 ml de méthanol, et dans la seconde nous avons mélangé 4 mg d'oxytétracycline avec 10 ml d'acétonitrile afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 0.4 mg/ml.

4.2.2. SOLUTION-MERE COLISTINE

Deux solutions mères ont été préparées ; dans la première nous avons mélangé 2 mg de colistine (standard pur) avec 10 ml de méthanol, et dans la seconde nous avons mélangé 2 mg de colistine avec 10 ml d'acétonitrile afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 0.4 mg/ml.

Pour les solutions mères des deux standards purs utilisés ; des dilutions de l'ordre de $1/10^{\text{ème}}$, $1/100^{\text{ème}}$, $1/1000^{\text{ème}}$, $1/10000^{\text{ème}}$ ont été préparés pour étalonner l'appareillage.

Ces solutions doivent être conservées au réfrigérateur dans des flacons ambrés pendant une durée d'un mois pour l'oxytétracycline et peut aller jusqu'à 6 mois pour la colistine.

4.3. OPTIMISATION DES PARAMETRES D'ANALYSE DES RESIDUS DE L'OXYTETRACYCLINE ET DE LA COLISTINE

Afin de pouvoir détecter et quantifier les résidus d'un antibiotique quelconque dans les denrées alimentaires d'origine animale par HPLC, on doit toujours passer par l'optimisation des paramètres de détection et de quantification du standard pur. Ces paramètres sont les suivants :

- la phase stationnaire : celle-ci peut être en phase normale, ou en phase inverse. Le choix de cette phase dépend bien sûr de la phase mobile qui sera utilisée pour l'analyse. Si la phase mobile est polaire, la phase stationnaire doit être non polaire ; ce mode d'analyse est dit chromatographie en phase inverse. Si au contraire la phase mobile est non polaire, la phase stationnaire doit être polaire ; dans ce cas, l'analyse chromatographique est dite en phase normale.
- la phase mobile : sa composition et le mode de travail (mode isocratique ; la phase mobile est maintenue constante durant toute la durée d'analyse ou bien en mode avec gradient d'élution durant lequel la composition de la phase mobile est modifiée progressivement)
- la boucle d'échantillonnage : ou volume injecté, ainsi que la capacité de la boucle
- débit : exprimé en ml/min. Il correspond toujours à une pression donnée et qui est générée par la ou les pompes

- spectre d'absorption : ou bien la longueur d'onde dans la quelle l'antibiotique absorbe le maximum de lumière
- la durée d'analyse : fixée par rapport au temps de rétention de la molécule à analyser dans la colonne analytique

4.4. SYSTEME DE FILTRATION

Après chaque usage, la phase mobile est filtré afin d'éliminer les impuretés. Cette filtration est réalisée grâce au dispositif de filtration.

5. EXPRESSIONS DES RESULTATS ET TEST APPLIQUE

Nos résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$.

Le test que nous avons appliqué pour analyser nos résultats est le test de Student, (Berrah, 1984).

CHAPITRE II

RESULTATS ET DISCUSSION

1. CALIBRAGE DE L'APPAREILLAGE

Les réglages opérés au niveau des différents modules de notre appareillage HPLC, ont été effectués grâce à un mélange de quatre molécules, préparé par la firme PHYWEE dans des conditions d'analyse bien déterminées.

Les conditions d'analyse du mélange PHYWEE utilisé pour régler l'appareillage sont les suivantes :

- une phase mobile composée de 100 % de méthanol
- une phase stationnaire menue d'une colonne analytique en phase inverse
- deux longueurs d'onde (254 nm et 270 nm)
- un débit de la phase mobile maintenu à 1.5 ml/min
- une quantité injectée de 20 μ l
- et une durée d'analyse de 10 minutes

L'analyse chromatographique que nous avons réalisée avec ce composé nous a permis d'obtenir les deux chromatogrammes illustrés par les figures (27 et 28).

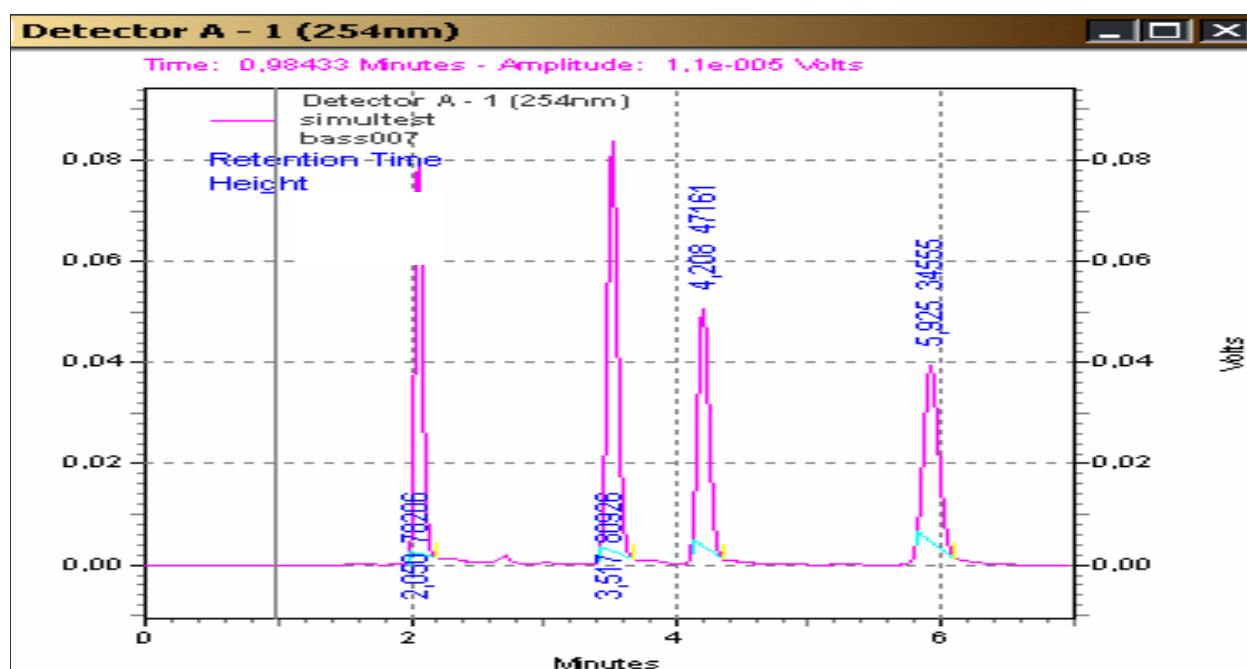


Figure n° 27 : Chromatogramme obtenu avec le standard PHYWEE à une longueur d'onde de 254 nm.

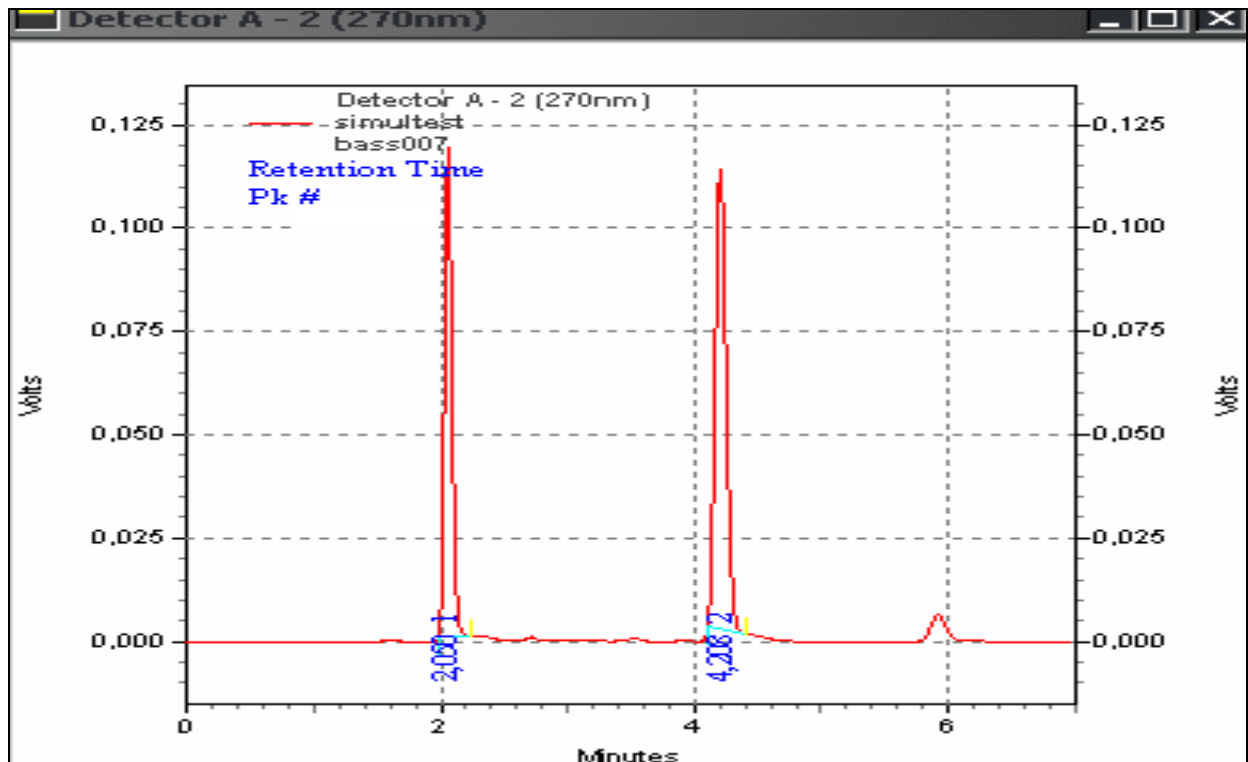


Figure n° 28 : Chromatogramme obtenu avec le standard PHYWEE à une longueur d'onde de 270 nm.

Le premier chromatogramme est obtenu avec une longueur d'onde de 254 nm. Il nous montre qu'avec cette longueur d'onde ; les quatre molécules composantes de ce mélange sont détectées et cela se traduit par l'apparition de quatre pics différents et qui ont aussi des temps de rétention différents (Anthracène 2.05 min, Tétracène 3.51 min, Acénaphène 4.20 min et Acénaphthylène 5.59 min).

Cependant avec une longueur d'onde de 270 nm seulement deux composants du standard peuvent être détectés (Anthracène, Acénaphène), comme il est indiqué sur le second chromatogramme.

Ces résultats s'expliquent par le fait que les quatre composés absorbent la lumière (UV) à 254 nm et cela se présente sous forme de 4 pics différents et qui ont des temps de rétention aussi différents. Alors qu'avec une longueur d'onde de 270 nm, seulement deux composants qui absorbent la lumière.

Le calibrage de l'appareil HPLC ayant été opéré, nous allons procéder à l'optimisation des paramètres de l'analyse.

2. OPTIMISATION DES PARAMETRES D'ANALYSE DES RESIDUS D'OXYTETRACYCLINE ET DE COLISTINE

2.1. APPLICATION DES PARAMETRES D'ANALYSE DU FOURNISSEUR

2.1.1. OXYTETRACYCLINE

Avant d'entamer l'optimisation proprement dite des paramètres de détection et de quantification des résidus d'oxytétracycline, une dizaine d'essais ont été effectués en appliquant les paramètres fournis par le fabricant du standard.

Ces paramètres sont les suivants :

- phase mobile : acétonitrile - Eau + 0,1% de l'acide phosphorique
- phase stationnaire : phase inverse (C18)
- longueur d'onde d'absorbance : 264 nm
- débit : 2 ml/min
- quantité injectée : 10 µl
- durée d'analyse : 15 minutes
- concentration : 0,4 mg/ml

Les résultats que nous avons obtenus en appliquant ces paramètres ne sont pas satisfaisants (figure 29). Ainsi, nous avons entamé l'optimisation de ces paramètres.

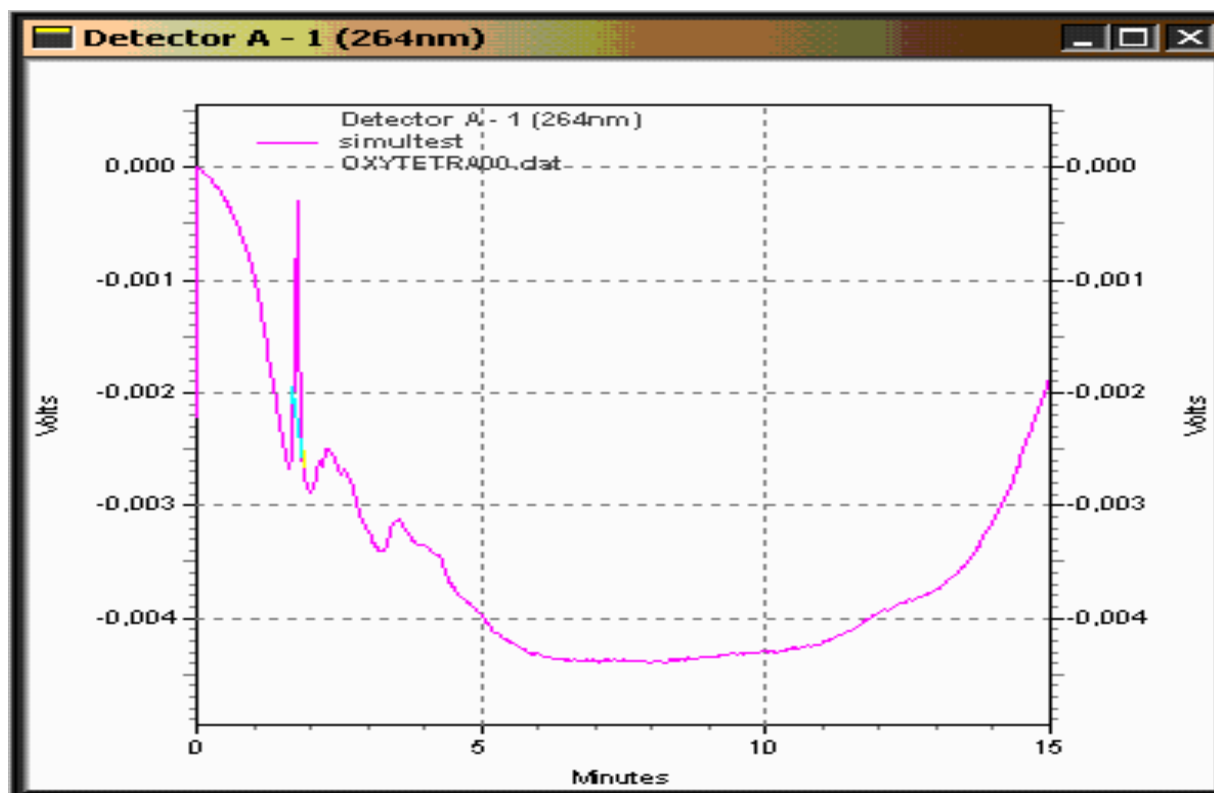


Figure n° 29 : Chromatogramme obtenu en appliquant les paramètres d'analyse recommandés par le fournisseur du standard oxytétracycline.

2.1.2. COLISTINE

Pour cet antibiotique nous avons commencé directement l'optimisation (le fournisseur du standard n'a pas proposé de recommandations).

2.2. INVESTIGATIONS EXPERIMENTALES POUR L'OPTIMISATION DES PARAMETRES D'ANALYSE

2.2.1. OXYTETRACYCLINE

2.2.1.1. optimisation de la phase stationnaire

Nous avons utilisé une seule phase stationnaire en phase inverse, de type ODS.C18. En réalité ce paramètre n'a été pas optimisé mais plutôt choisie par rapport à des données bibliographiques qui indiquent que l'oxytétracycline est détecté dans une colonne analytique en phase inverse.

Nos résultats pour la phase stationnaire, premier paramètre optimisé, sont analogues à de nombreux travaux effectués. Tous les travaux et les recherches nous avons trouvés indiquent qu'elle doit être en phase inverse et cela ne peut être réalisé que par l'utilisation d'une colonne analytique en phase inverse, type ODS C18. Parmi ces travaux nous citons ceux qui ont été réalisées en 2003 par Furusawa, cet auteur utilise une colonne analytique non polaire qui est la C18 comme phase stationnaire. Gómez-Jimenez et al (2008), ont utilisés durant la séparation chromatographique deux spécialités de colonne analytique en phase inverse, ce sont Supelco C18 nucleosil column (5 µm, 150×4.6 mm I.D.), C18 guard column (5 µm, 30×4.6 mm I.D). Schneider et al, ont aussi utilisé en 2007 une colonne analytique en phase inverse spécialité ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl chromatography column (3.0mm×150 mm, 3.5_µm, Agilent, Palo Alto, CA, USA).

2.2.1.2. optimisation de la phase mobile

Le mode d'élution isocratique a été adopté.

Deux phases mobiles ont été testées :

- A- acétonitrile (100% durant toute la durée d'analyse).
- B- méthanol (100% durant toute la durée d'analyse).

Ces deux phases mobiles polaires que nous avons utilisées ont été choisies par rapport à une phase stationnaire en phase inverse et qui est non polaire.

Les conditions d'analyse utilisées arbitrairement pour optimiser ce paramètre sont :

- phase stationnaire : colonne analytique en phase inverse (C18)
- longueur d'onde : 320 nm
- diluant : méthanol
- débit : 1.5 ml/min
- quantité injectée : 8 µl
- durée d'analyse : 4 minutes

Plusieurs séries d'essais ont été effectuées avec les deux phases mobiles. Les résultats obtenus montrent des différences considérables d'un essai à un autre en fonction de la nature de la phase mobile utilisée, mais aussi en fonction des autres

paramètres déjà cités. Les deux chromatogrammes enregistrés ci-dessous sont obtenus avec des paramètres identiques mais avec une phase mobile différente.

Le chromatogramme (30) a été obtenu avec une phase mobile composée de 100% d'acétonitrile.

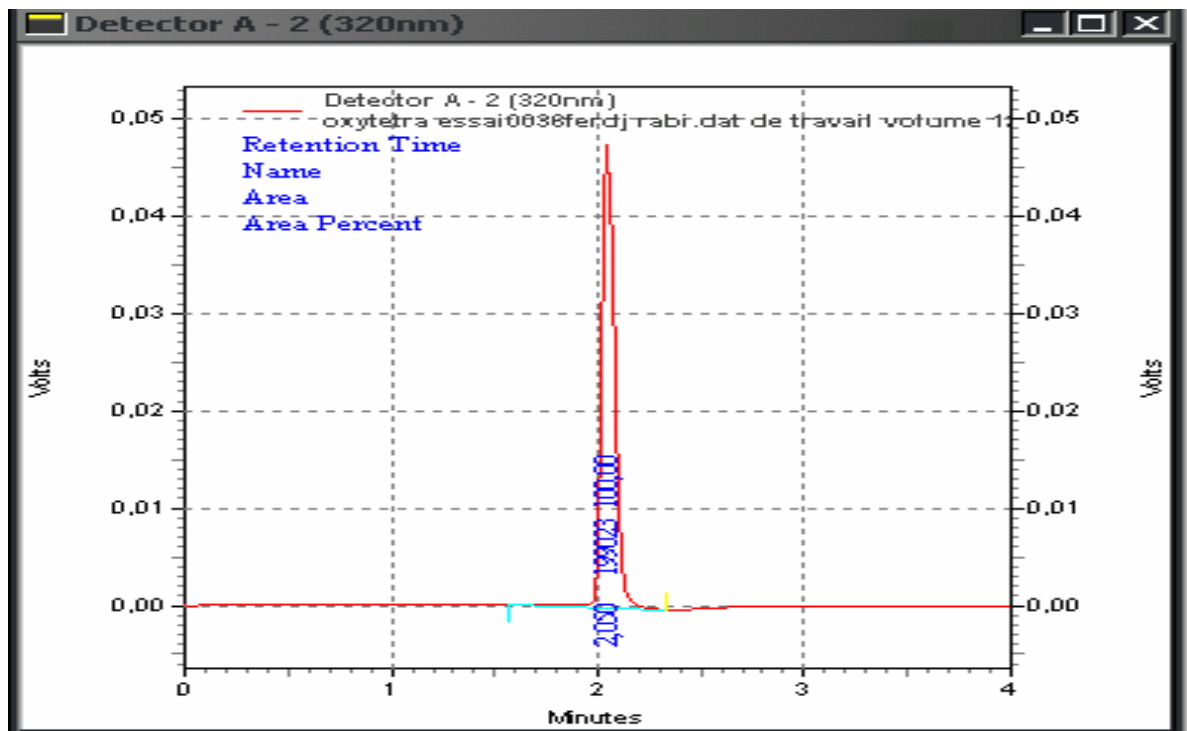


Figure n° 30 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée d'acétonitrile.

Cependant le chromatogramme illustré par la figure (31) a été enregistré avec une phase mobile composée de 100% de méthanol.

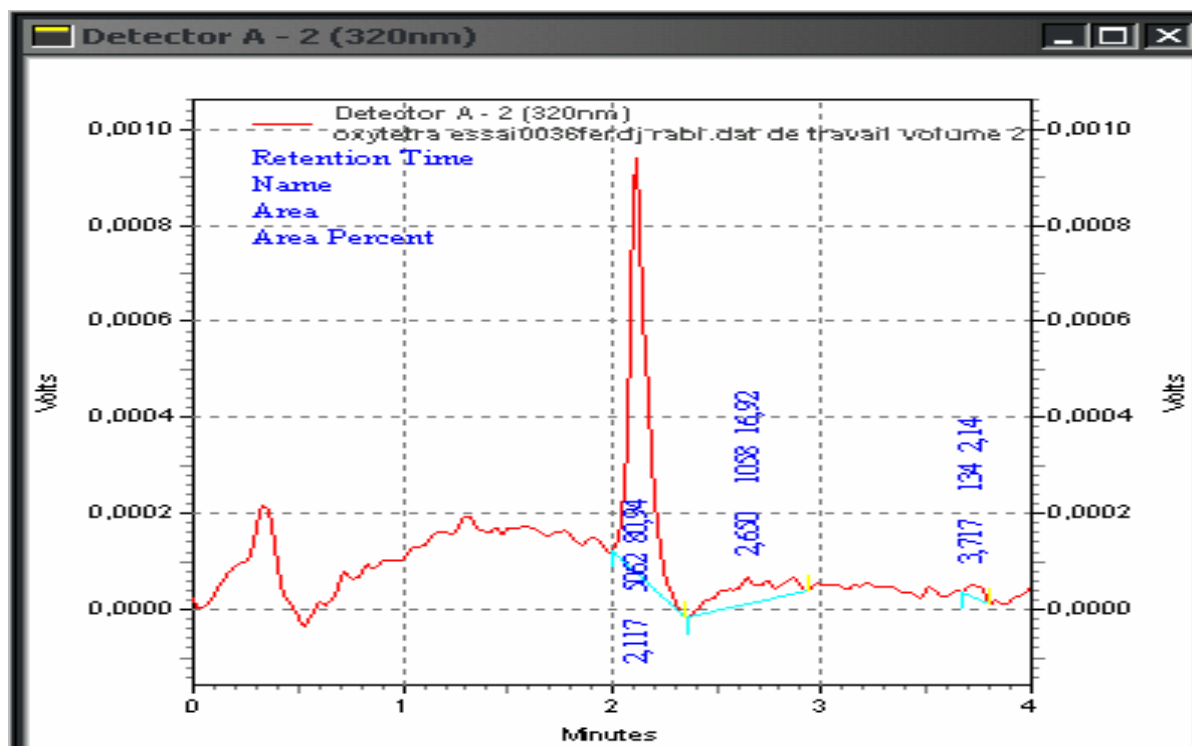


Figure n° 31 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée de méthanol.

Parmi ces deux phases mobiles que nous avons testés, une seule a été retenue. Il s'agit de la phase mobile acétonitrile. Cette phase a été utilisée avec une composition de 100 % durant toute la durée d'analyse. Cela nous a permis donc de travailler en mode isocratique et éviter la mode gradient binaire qui présent plus de difficultés.

Le résultat que nous avons retenu pour ce paramètre est plus ou moins proche de celui qui a été utilisé par Wang et al en 2004. Ce groupe d'auteurs préconise une phase mobile composée d'acétonitrile bien sûr mais aussi la présence du méthanol. La même phase mobile a été utilisée en 2003 par Cinquina et al, et en 2004 par Reed et al. En 2008, Hu et al ont utilisé une phase mobile très différente de celle que nous avons utilisés, il s'agit du méthanol.

2.2.1.3. optimisation de la longueur d'onde

Une plage de différentes longueurs d'ondes de 200 nm à 370 nm ont été testées. Les conditions d'analyse utilisées arbitrairement pour optimiser ce paramètre sont :

- une phase stationnaire en Phase inverse (C18)
- un diluant composé de 100 % d'acétonitrile

- une phase mobile constituée de 100% de méthanol
- deux longueurs d'onde différentes : 325 et 370 nm
- un débit de la phase mobile de 1.5 ml/min
- quantité injectée de 20 μ l
- durée d'analyse de 15 minutes

Plusieurs séries d'essais ont été effectuées avec cette plage de longueurs d'onde pour les deux phases mobiles et avec les deux solutions mères, méthalonique et celle préparée avec l'acétonitrile. Les résultats obtenus diffèrent d'une longueur d'onde à une autre. Les deux chromatogrammes que nous utilisons comme exemple ont été enregistrés avec deux longueurs d'onde différentes mais pour les mêmes autres paramètres qu'on a déjà cités précédemment.

Le chromatogramme illustré par la figure (37) est obtenu à une longueur d'onde de 325 nm.

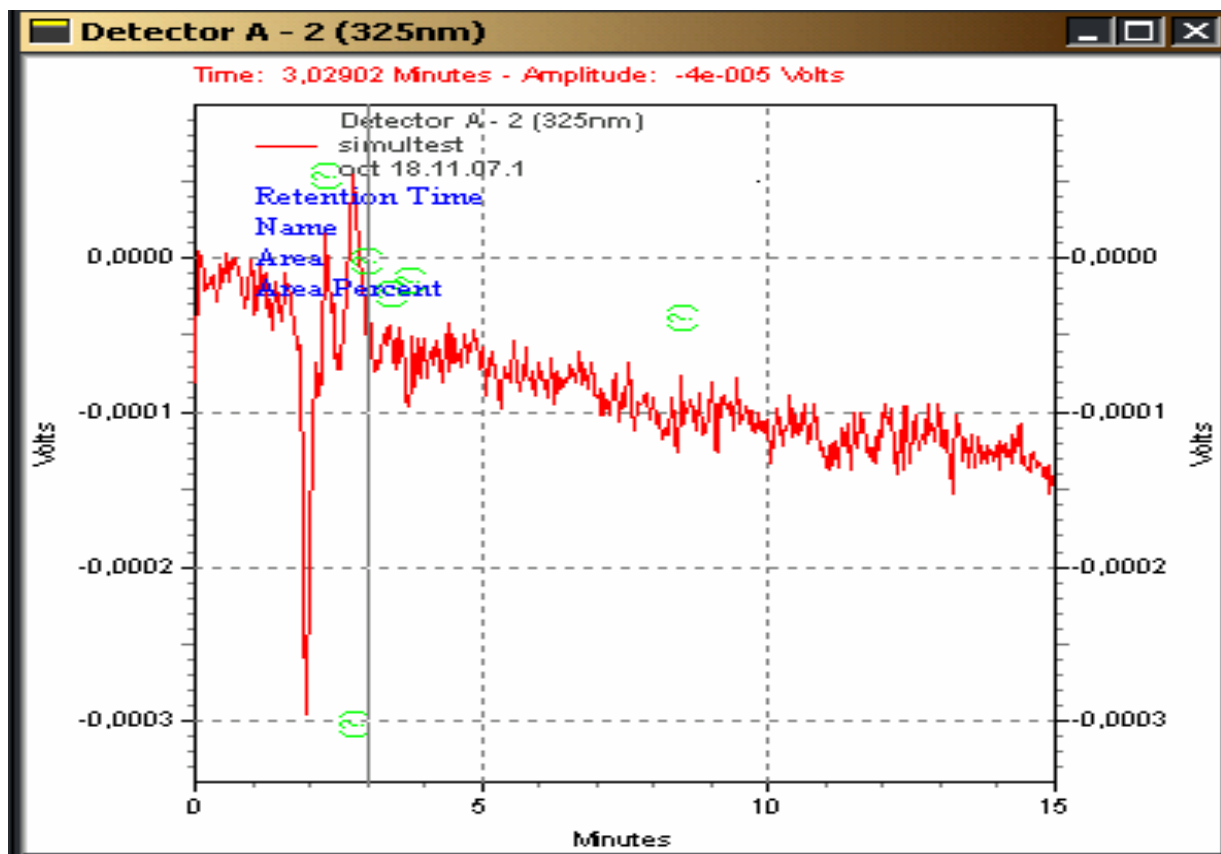


Figure n° 32 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 325 nm.

La figure (33) nous montre un chromatogramme qui a été enregistré avec une longueur d'onde de 370 nm.

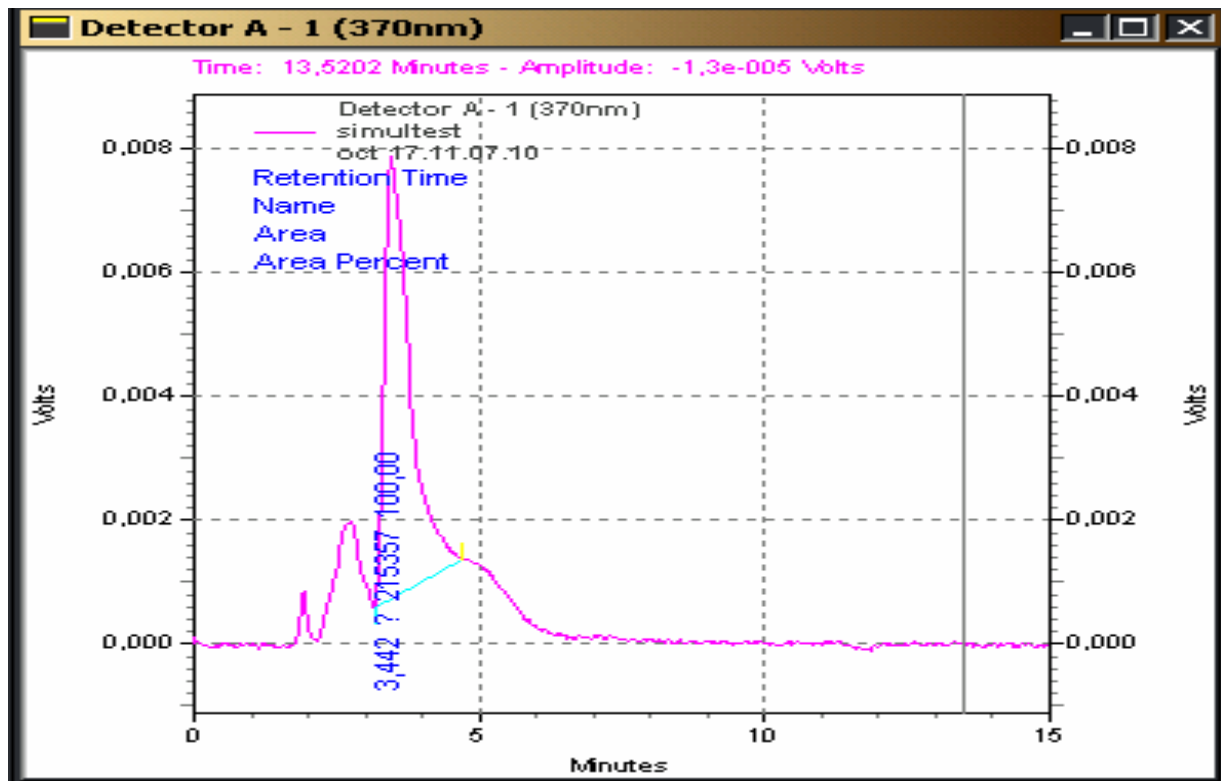


Figure n° 33 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 370 nm.

Deux longueurs d'ondes ont été retenues pour détecter et quantifier l'oxytétracycline. Elles se situent dans deux valeurs absolues qui sont 325 nm et 344 nm. Ces longueurs d'ondes ont été choisies parmi plusieurs qui ont été testées car elles permettent l'apparition d'un bon pic. Nos résultats pour ce paramètre sont proches de ceux qui ont été utilisés dans les travaux réalisés en 2003 par Furusawa, il a utilisé deux longueurs d'onde différentes, dont une est plus proche de nos longueurs d'ondes, il s'agit de 357 nm, l'autre est plus loin (268 nm). Coyne et al utilisent en 2004 une longueur d'onde encore plus proche de la deuxième longueur que nous avons retenue (344 nm), il s'agit de 353 nm. La longueur d'onde que Reed et al ont préconisé en 2004 est de 350 nm.

2.2.1.4. optimisation du débit de la phase mobile

Les débits testés oscillent dans une gamme de 0.5 et 2 ml/minute. Ces débits génèrent des pressions différentes.

Ce paramètre a été optimisé avec les conditions d'analyse (choisies arbitrairement) suivantes :

- une phase stationnaire en phase inverse (C18)
- une phase mobile à base d'acétonitrile
- un diluant composé de méthanol
- longueur d'onde de 370 nm
- débit 1.5 et 1.7 ml/min
- quantité injectée 10 μ l
- durée d'analyse 15 minutes

Plusieurs séries d'essais ont été effectuées avec des débits différents pour les deux phases. Les résultats obtenus sont différents d'un essai à un autre. Nous prenons comme exemples les chromatogrammes illustrés par les figures (34 et 35).

Ces deux chromatogrammes ont été enregistrés avec deux débits différents mais pour les mêmes autres paramètres déjà cités.

Le chromatogramme (34) a été obtenu avec un débit la phase mobile maintenu à une valeur de 1 ml/min.

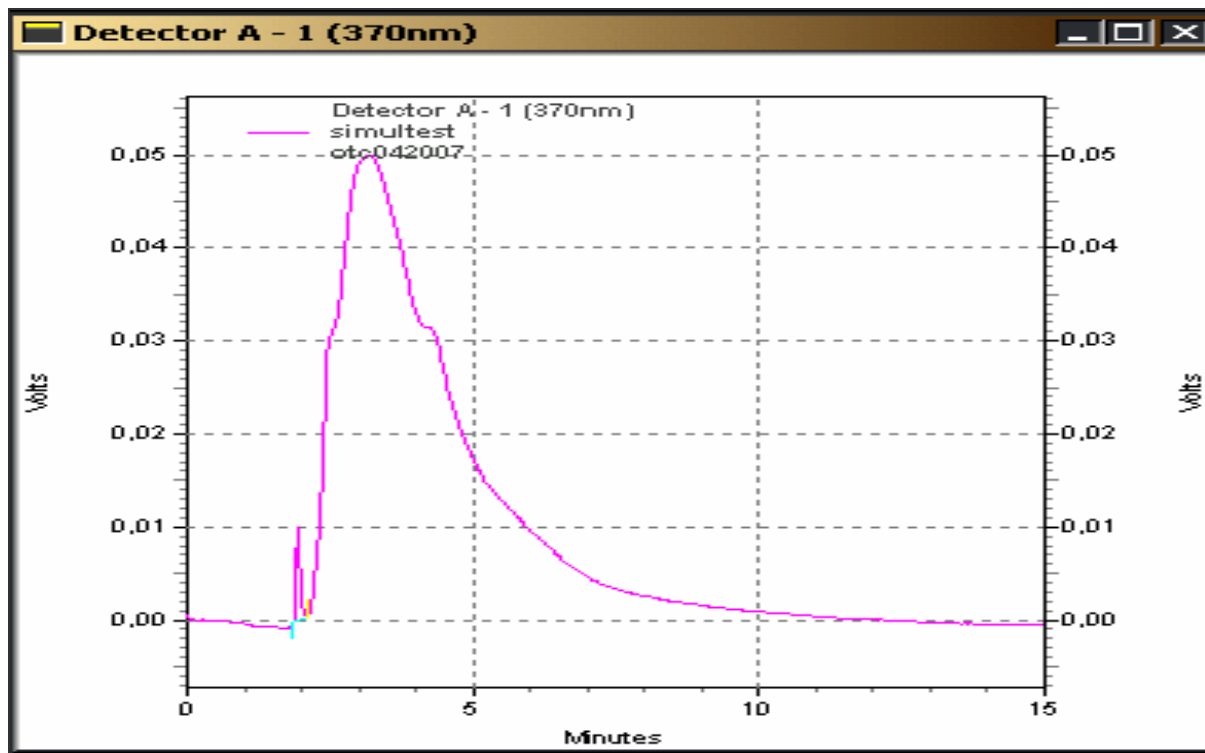


Figure n° 34 : Chromatogramme obtenu avec débit de 1 ml/mn.

Pour le débit 2 ml/mn, le résultat obtenu est représenté par la figure (35).

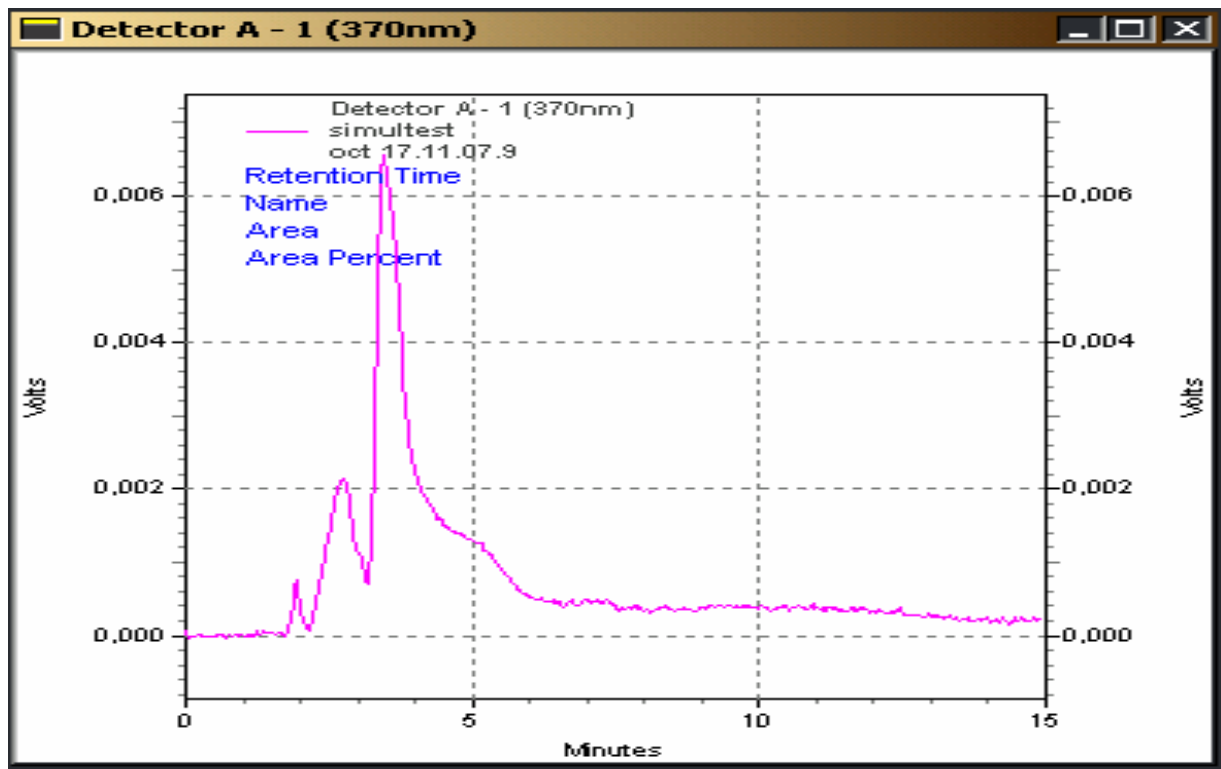


Figure n° 35 : Chromatogramme obtenu avec débit de 2 ml/mn.

La phase mobile a été maintenue à un débit 1.5 ml/mn. D'après les essais que nous avons effectués nous avons remarqué que le débit n'a pas une grande influence, il agit surtout sur le temps de rétention, temps pendant lequel la molécule à dosée est retenue dans la colonne analytique et par conséquent sur le temps d'apparition du pic, mais aussi sur la largeur de ce pic. Plus on augmente le débit, plus la pression exercée par les pompes augmente, plus la molécule sort vite, plus le temps de rétention et largeur du pic diminues. Ce débit est différent de celui qui a été utilisé dans d'autres travaux. Ainsi, Wang et al, 2004 ; Cinquina et al, 2004, ont utilisé un débit de l'ordre de 1ml/mn.

Cependant. Reed et al, 2004 ont utilisé un débit de 1.2 ml/mn, proche du débit que nous avons retenu.

2.2.1.5. optimisation du volume injecté

Les volumes injectés (quantité du standard qui sera injectée) que nous avons testés varient dans un intervalle allant de 1 jusqu'au 20 μl .

Cet intervalle de volume injecté a été choisi par rapport à une boucle d'échantillonnage d'une capacité de 20 μl seulement.

Les conditions d'analyses choisies arbitrairement pour optimiser ce paramètre sont :

- une colonne analytique en phase inverse (ODS, C18)
- une phase mobile composée de 100 % d'acétonitrile
- un diluant constitué de méthanol
- une longueur d'onde d'absorption à l'UV de 325 nm
- un débit de la phase mobile de 1.5 ml/min
- un volume injecté de 2 et 6 μl
- et une durée d'analyse de 4 minutes

Différents tests d'analyse ont été réalisés avec cet intervalle de volume pour les deux phases mobiles, et avec les deux solutions mères préparées. Les résultats obtenus diffèrent d'un test à un autre en fonction du volume injecté mais aussi en fonction des autres paramètres. Nous prenons comme exemples les chromatogrammes illustrés par les figures (36 et 37).

La figure (36) illustre un chromatogramme qui a été enregistré avec un volume injecté de 2 μl .

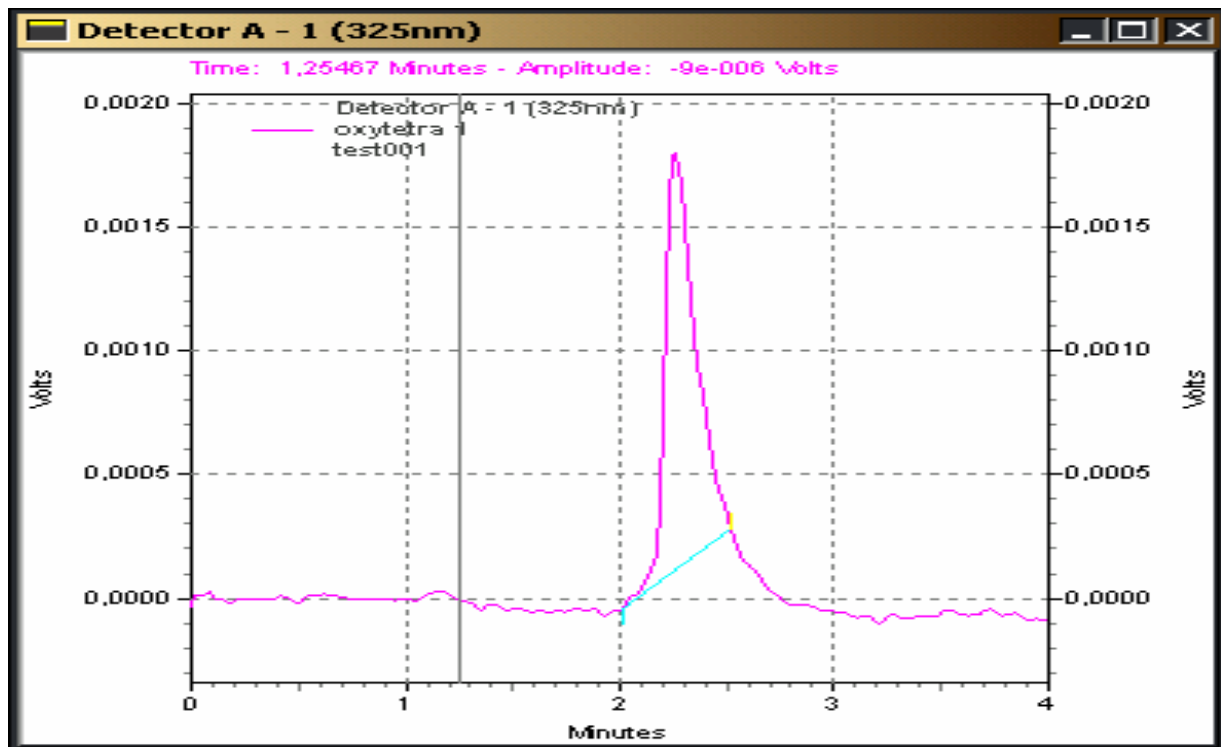


Figure n °36 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 2 µl.

Alors que la figure (37) nous montre un chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 6 µl.

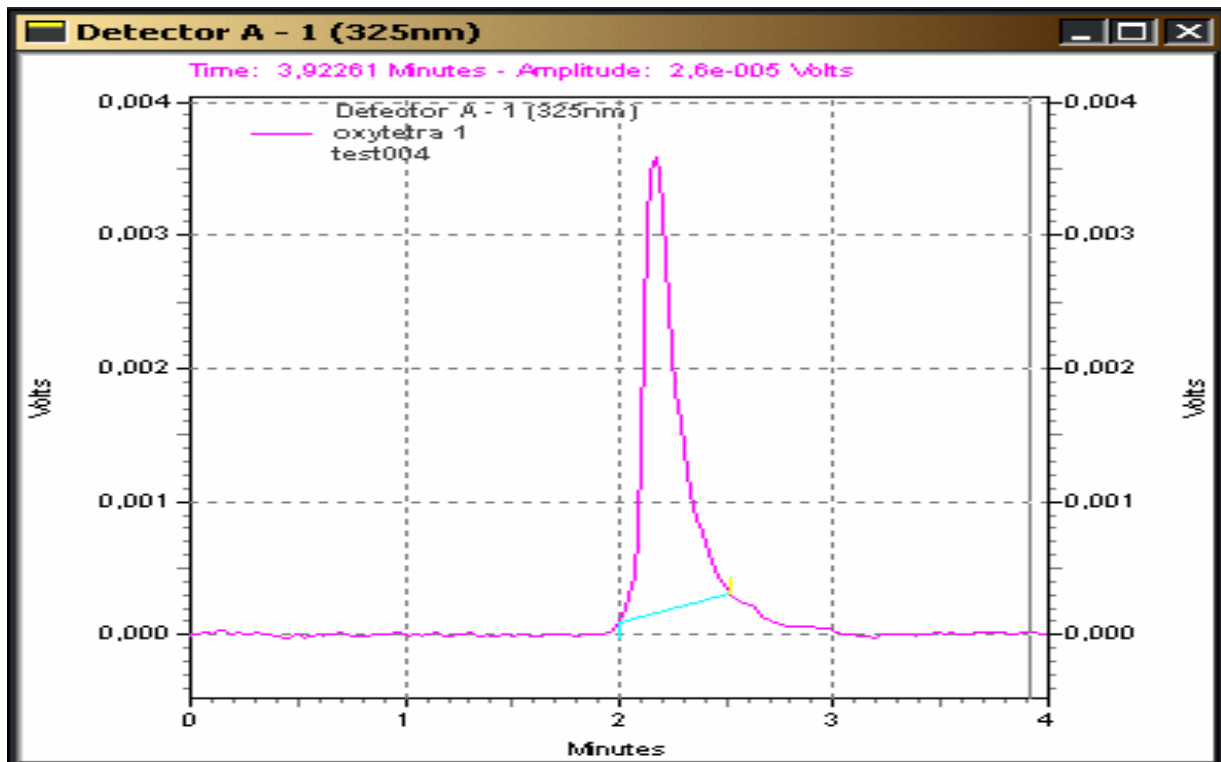


Figure n °37 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 6 µl.

Enfin pour le volume injecté ; dernier paramètre optimisé, la valeur retenue est de 11 μl . Ce résultat est le fruit de plusieurs essais avec des volumes différents. L'effet de ce paramètre se résume en une diminution ou en une augmentation de l'aire du pic selon bien sûr la quantité qu'on injecte. Plus on augmente la quantité injectée plus la surface de l'aire du pic augmente et vis versa. Le volume injecté que Hu et al, ont utilisé en 2008 est très proche du volume que nous avons retenu, ils ont choisi un volume injecté de 10 μl . Babić et al utilisent en 2006 un volume injecté de 20 μl .

Entre chaque deux à trois tests, un ou deux nettoyages successifs avec les deux éluants utilisés seront réalisés. Durant chaque nettoyage nous utiliserons les mêmes paramètres utilisés pour le test encours.

Ces nettoyages ont comme principal but dans un premier lieu de vérifier s'il y a avait ou non une absorbance qui sera lié obligatoirement dans le cas positif a cet éluant et se traduira dans ce cas la par l'apparition d'un pic et dans un second lieu de nettoyer la colonne analytique. Les figures (38 et 39) illustrent deux chromatogrammes enregistrés au cours deux essais de nettoyage.

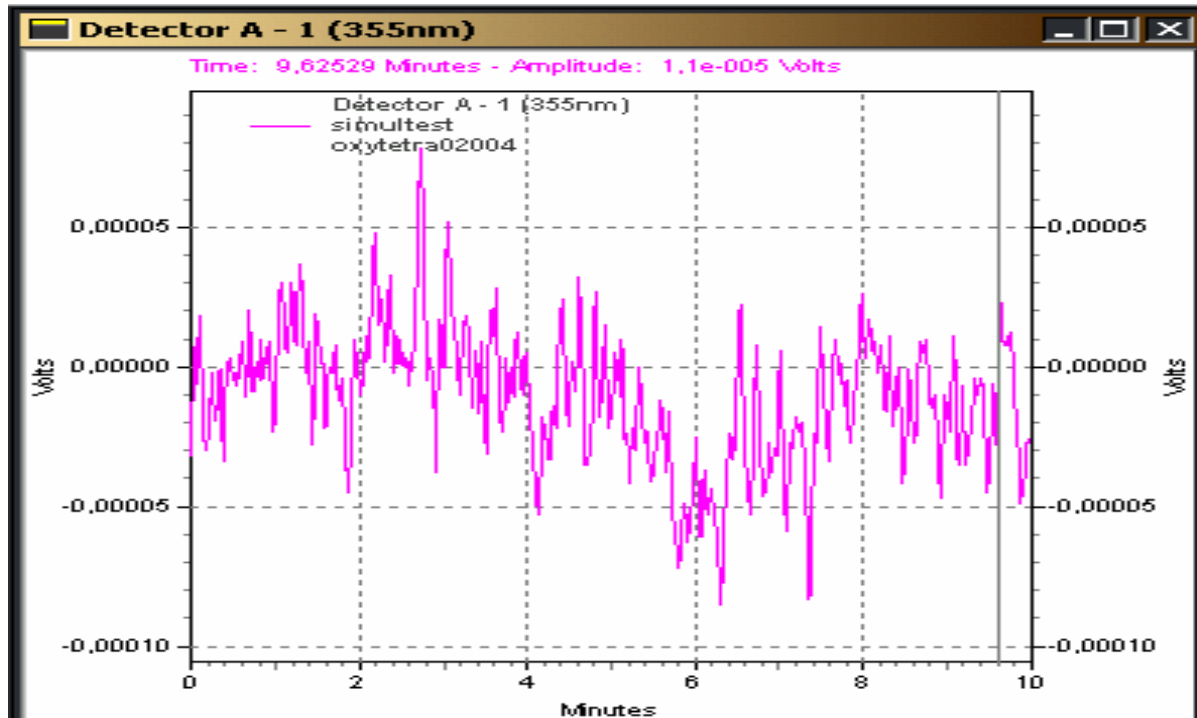


Figure n° 38 : Premier exemple d'un chromatogramme enregistré durant un essai de nettoyage.

Le premier chromatogramme de nettoyage, illustré par la figure (38) est obtenu avec un éluant méthanol (100%) et avec les conditions d'analyses suivants :

- une colonne analytique phase inverse (C18)
- une phase mobile à base d'acétonitrile
- un diluant composé de méthanol (100%)
- longueur d'onde d'absorption de 325 nm
- un débit de la phase mobile maintenu à 1.5 ml/min
- une quantité injectée de 10 μ l.

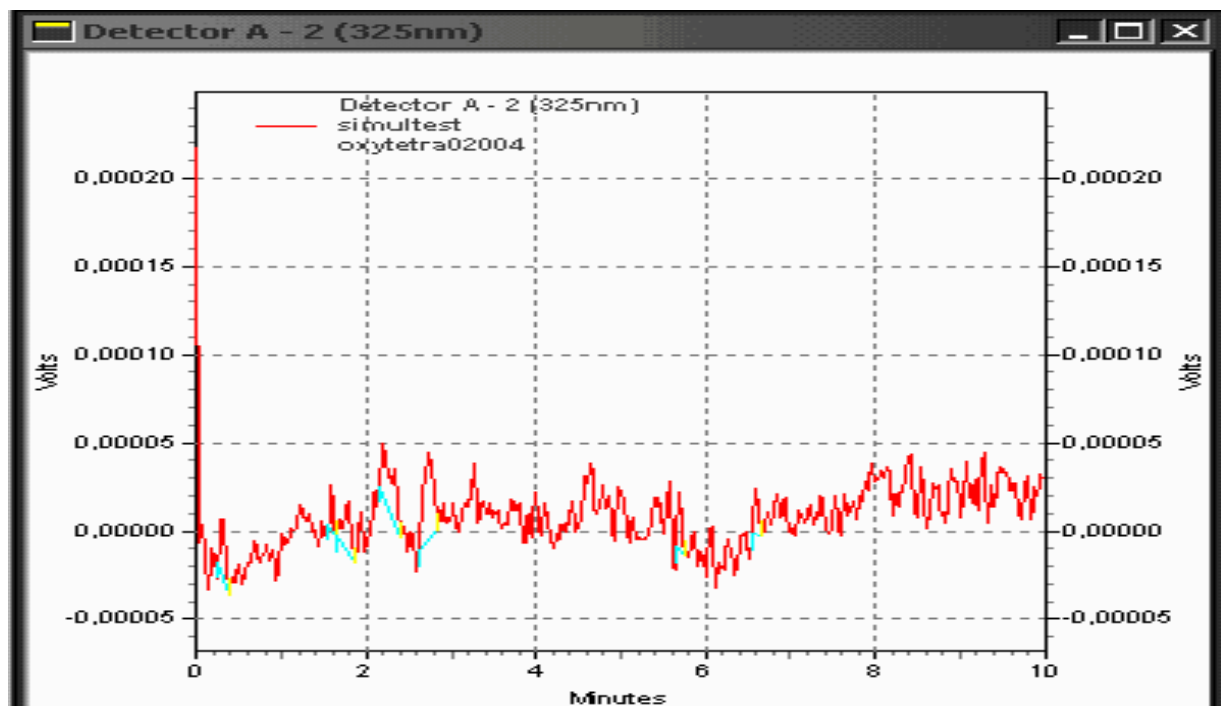


Figure n° 39 : Second exemple d'un chromatogramme enregistré durant un autre essai de nettoyage.

Par contre ce second exemple de nettoyage (figure 39) est obtenu avec un éluant acétonitrile (100%) et avec les paramètres chromatographiques suivants :

- une phase stationnaire en phase inverse (C18)
- une phase mobile constituée d'acétonitrile
- un diluant à base d'acétonitrile (100%)
- une longueur d'onde de 325 nm
- un débit 1.5 ml/min
- une quantité injectée de 8 μ l
- et une durée d'analyse de 8 minutes.

2.2.1.6. tableau récapitulatif des paramètres retenus pour détecter et quantifier les résidus d'oxytétracycline

Les conditions chromatographiques que nous avons retenus (tableau 18) pour continuer notre travail sont l'aboutissement d'une optimisation basée sur le choix de la phase stationnaire, de la variation du solvant organique composant la phase mobile, de la longueur d'onde d'absorbance, du débit, de l'éluant dans le quel le standard sera dissout et enfin de la quantité injectée ou plus spécialement le volume injecté.

Tableau n° 18 : les paramètres retenus pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline.

| | Paramètre retenu |
|-----------------------------|-------------------------|
| - phase mobile | Acétonitrile. |
| - diluant | Méthanol |
| - phase stationnaire | phase inverse (C18). |
| - longueur d'onde | 325 nm |
| - débit | 1.5 ml/min |
| - quantité injectée | 11 µl |
| - durée d'analyse | 8 minutes |

Les résultats obtenus en appliquant ces paramètres retenus sont illustrés par les figures (40 et 41).

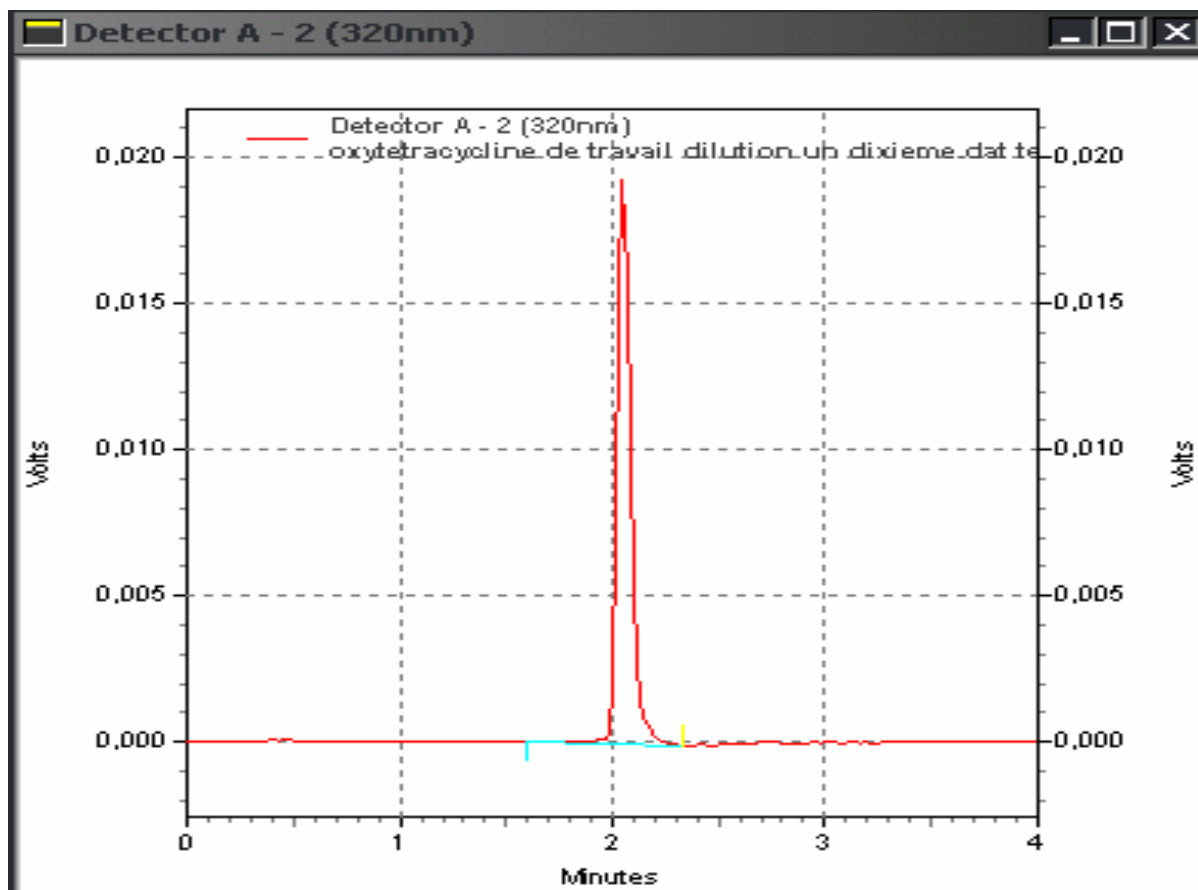


Figure n° 40 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus (325 nm).

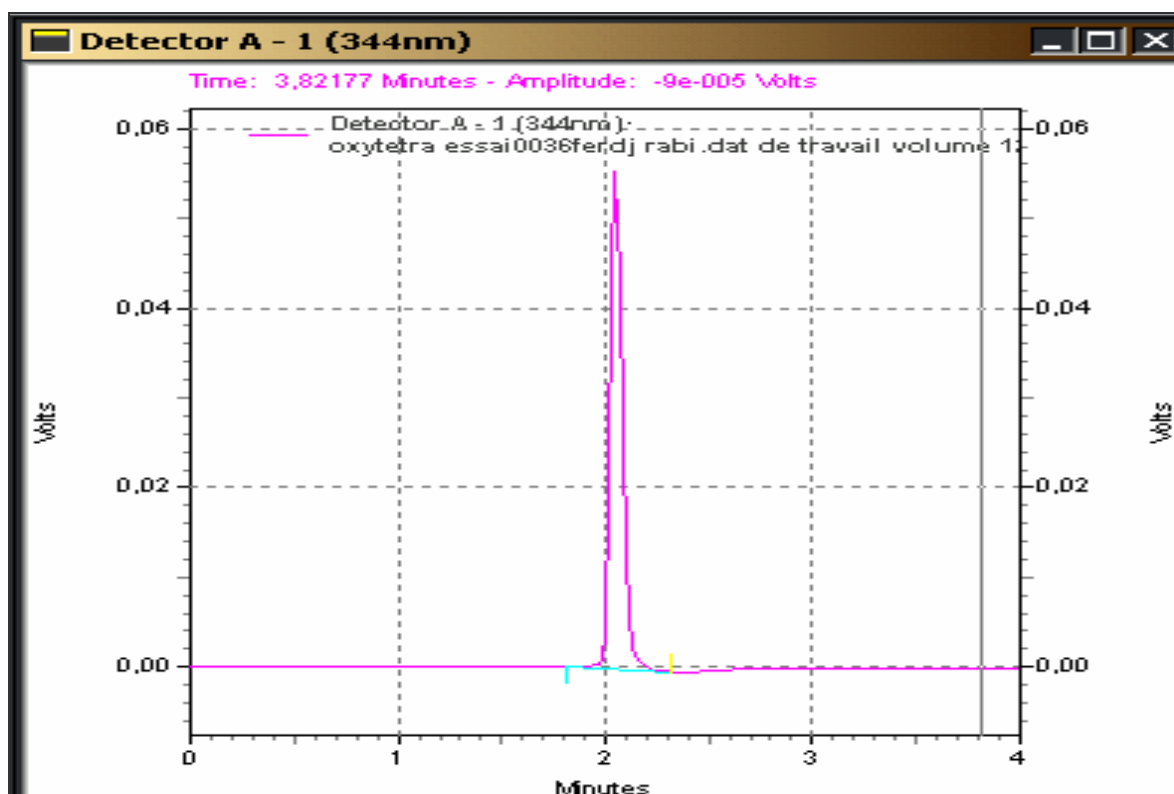


Figure n° 41 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus (344 nm).

2.2.2. COLISTINE

2.2.2.1. optimisation de la phase stationnaire

Le premier paramètre qui a été optimisé est la phase stationnaire. En réalité ce paramètre n'a été pas optimisé mais plutôt choisi par rapport à des données bibliographiques qui indiquent que tous les antibiotiques sont détectés dans une colonne analytique en phase inverse. Donc une seule phase stationnaire en phase inverse sera utilisée, type C18. Cette colonne analytique est constituée de molécules hydrophobes greffées sur de la silice.

Tous les travaux et les recherches qui ont été trouvés indiquent qu'elle doit être en phase inverse et cela ne peut être réalisé que par l'utilisation d'une colonne analytique en phase inverse type ODS C18. Parmi ces travaux nous avons ceux qui ont été réalisés par Cancho Grande et al en 200, Della wai-mei et al en 2005.

2.2.2.2. optimisation de la phase mobile

Le mode d'élution isocratique a été adopté.

Deux phases mobiles ont été testées :

- A- acétonitrile (100% durant toute la durée d'analyse).
- B- méthanol (100% durant toute la durée d'analyse).

Ces deux phases mobiles polaires que nous avons utilisées ont été choisies par rapport à une phase stationnaire en phase inverse et qui est non polaire.

Les conditions d'analyse utilisées arbitrairement pour optimiser ce paramètre sont :

- une phase stationnaire en phase inverse (C18)
- un diluant constitué de méthanol
- une longueur d'onde d'absorption de 240 nm
- un débit maintenu à 1.5 ml/min
- une quantité injectée de 8 µl
- et une durée d'analyse de 8 minutes

Différentes séries d'essais ont été effectuées avec les deux phases mobiles. Les résultats obtenus diffèrent d'un essai à un autre en fonction des autres paramètres

déjà cités et bien sûr de la composition de cette phase mobile. Nous prenons comme exemple les deux chromatogrammes illustrés par les figures (42 et 43). Ces chromatogrammes ont été enregistrés avec des paramètres identiques mais à une phase mobile différente.

La figure (42) illustre le chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée de 100 % d'acétonitrile.

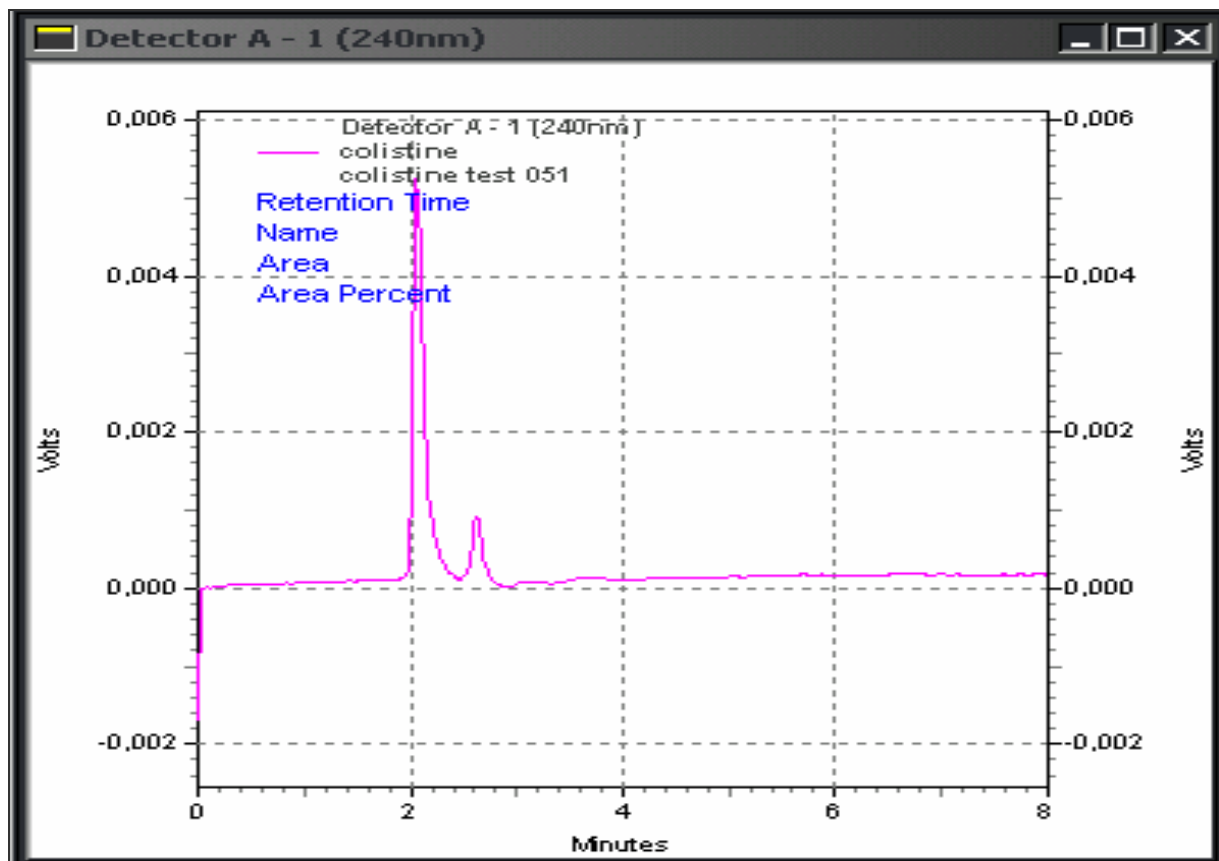


Figure n° 42 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée 100 % d'acétonitrile.

Cependant la figure (43) illustre un chromatogramme qui a été enregistré avec une phase mobile composée de 100% de méthanol.

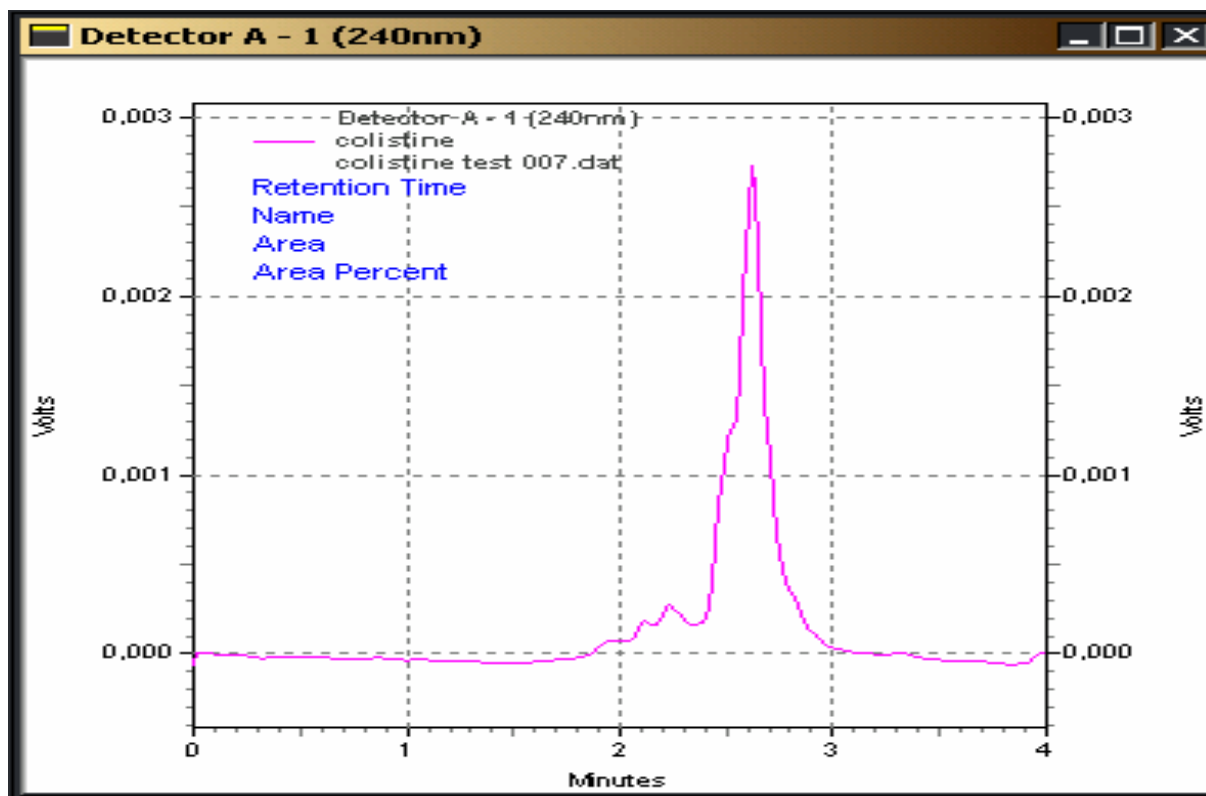


Figure n° 43 : Chromatogramme obtenu avec une phase mobile composée de 100% de méthanol.

Le méthanol a été retenu comme phase mobile avec une composition de 100 % durant toute la durée d'analyse, et le mode isocratique a été adopté. Nos résultats pour ce paramètre diffèrent de ceux qui ont été réalisés par Orwa et al en 2007, et ceux qui ont été effectués par Morales-Múnoz et Luque de Castro en 2005. Ce groupe d'auteurs a préconisé l'acétonitrile comme phase mobile avec souvent un mélange de tampon phosphate.

2.2.2.3. optimisation de la longueur d'onde

Différentes longueurs d'ondes ont été testées dans une gamme allant de 200 nm jusqu'au 370 nm.

Les conditions d'analyse choisies arbitrairement pour optimiser la longueur d'onde sont les suivantes :

- une phase stationnaire en phase inverse (C18)
- une phase mobile à base d'acétonitrile
- un diluant à base de méthanol

- deux longueurs d'onde (prises comme exemple) sont : 220 et 240 nm
- un débit de phase mobile maintenu à 1.5 ml/min
- quantité injectée de 20 μ l
- et en fin une durée d'analyse de 15 minutes.

Plusieurs séries d'essais ont été effectuées avec les deux phases mobiles et avec les deux solutions mères préparées. Les résultats obtenus diffèrent d'un essai à un autre en fonction de la longueur d'onde appliquée. Les deux chromatogrammes ci-dessous pris comme exemple ont été enregistrés avec deux longueurs d'onde différentes mais pour les mêmes autres paramètres déjà cités.

La figure (44) indique un chromatogramme qui a été obtenu à une longueur d'onde de 240 nm.

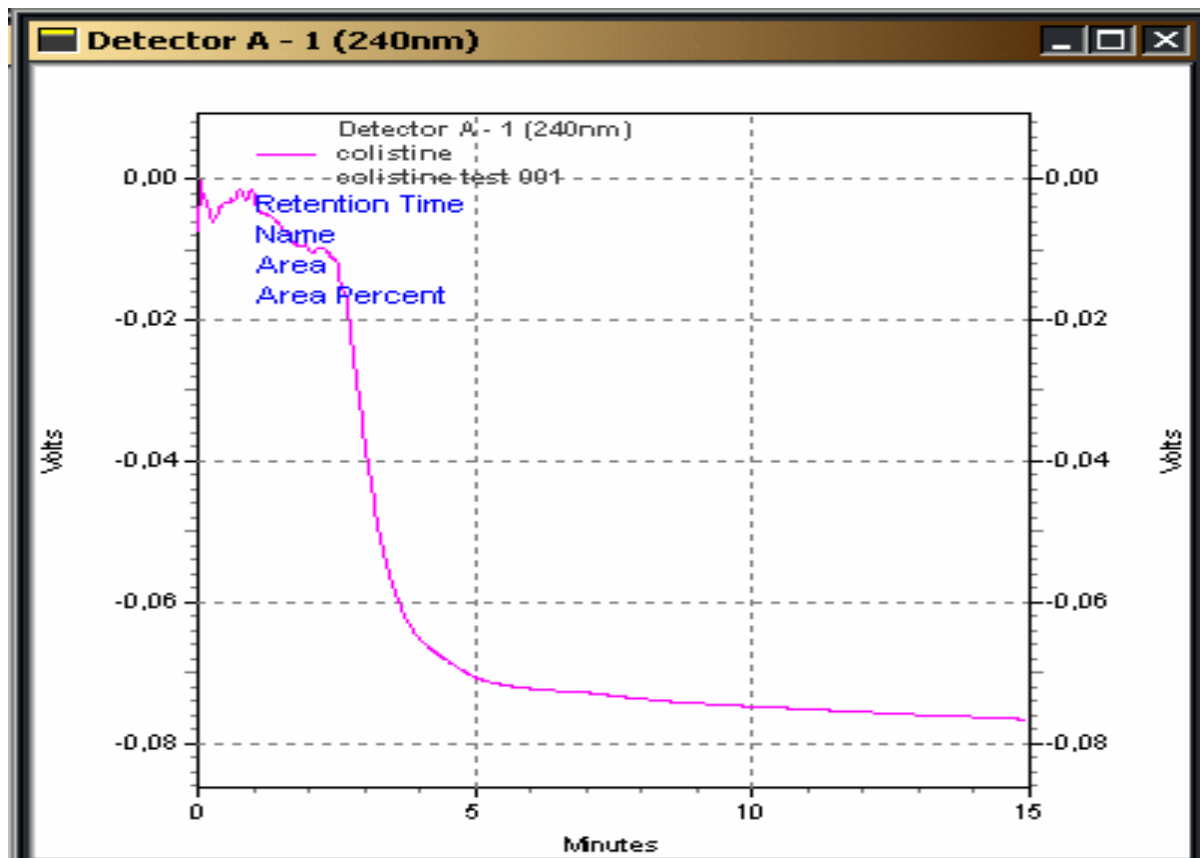


Figure n° 44 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 240nm.

La figure (45) nous montre un chromatogramme de colistine qui a été enregistré avec une longueur d'onde de 220 nm.

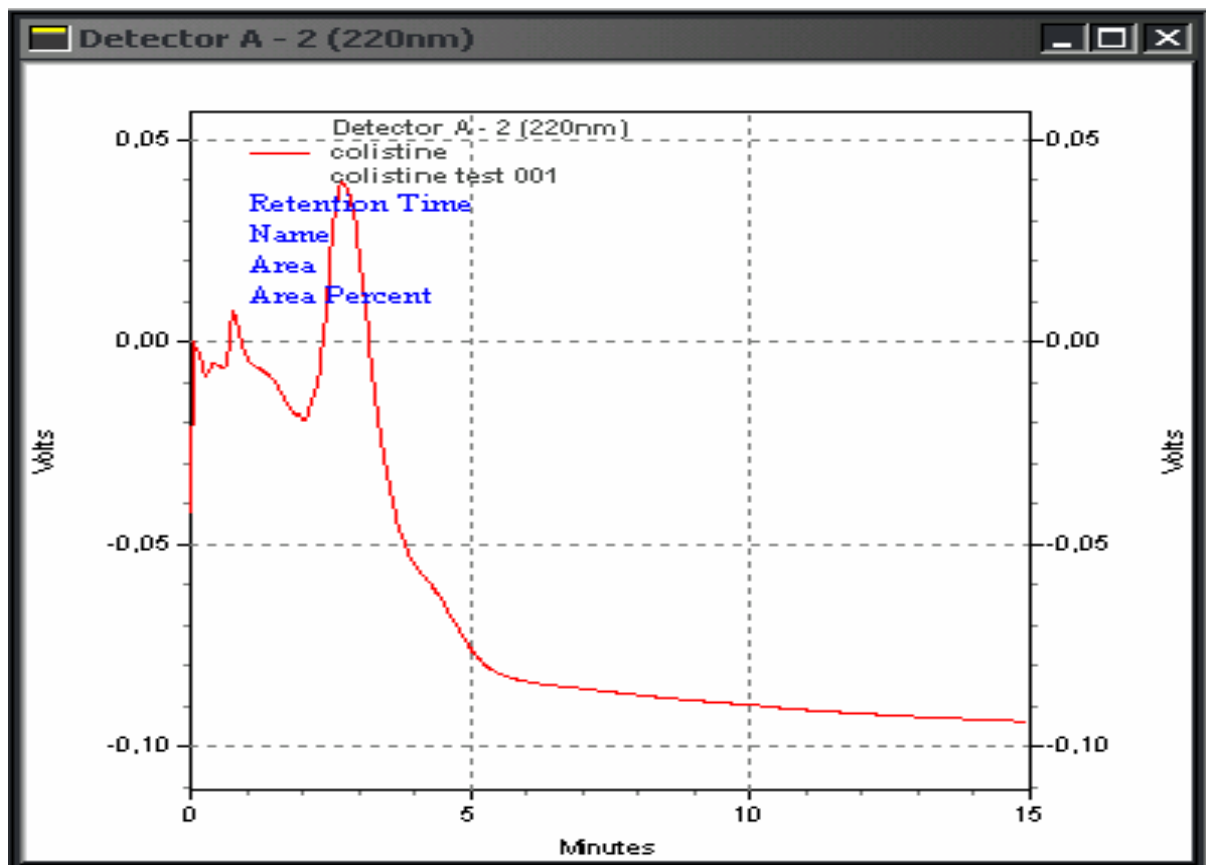


Figure n° 45 : Chromatogramme obtenu avec une longueur d'onde de 220 nm.

La longueur d'onde d'absorbance retenue pour détecter et quantifier la colistine sulfate se situe dans deux valeurs qui sont 245 nm et 260 nm. Cette longueur d'onde a été choisie parmi plusieurs qui ont été testées car elle est la mieux adaptée pour l'apparition du pic. Nos résultats pour ce paramètre sont proches de ceux qui ont été réalisés en 2007 par Lynn G et Dieter. Ce groupe de chercheurs a retenu dans la méthode qu'ils ont utilisés pour détecter et quantifier les résidus de la colistine une longueur d'onde de l'ordre de 220 nm. Cette différence entre nos résultats et les résultats de ce groupe de chercheurs réside dans le fait que l'éluant utilisé est l'acétonitrile et comme celui-ci présente une émission au niveau de trois longueurs d'onde différentes, 220 nm entre autre nous étions obligés à différer ces trois longueurs afin d'éviter l'apparition d'un pic qui sera automatiquement lié à l'utilisation de cet éluant, et risque ainsi de fausser nos résultats, Orwa et al en 2007 ont utilisés une longueur d'onde de 215 nm, Bouchard a utilisée en 2004 une longueur d'onde de 210 nm. Un autre groupe de chercheurs, Li et al utilisent en 2002 une longueur d'onde idem que celle qu'on a utilisée (260nm), Morales-Múnoz et Luque de Castro en 2005 préconisent une valeur de 340 nm et 440 nm.

2.2.2.4. optimisation du débit de la phase mobile

Les débits que nous avons testés oscillent entre 0.5 et 2 ml/minute. Ces débits génèrent des pressions différentes.

Plusieurs séries d'essais ont été effectuées avec des débits différents pour les deux phases. Les résultats obtenus diffèrent d'un essai à un autre.

Les deux chromatogrammes que nous avons pris comme exemple ont été enregistrés avec deux débits différents mais pour les mêmes autres paramètres restants et qui sont :

- une phase stationnaire en phase inverse (C18)
- une phase mobile constituée d'acétonitrile
- un diluant à base de méthanol
- une longueur d'onde de 240 nm
- un débit 1.5 et 1.7 ml/min
- une quantité injectée de 10 μ l
- et en fin une durée d'analyse 8 et 10 minutes

Le chromatogramme illustré par la figure (46) a été obtenu avec un débit la phase mobile maintenu à une valeur de 1.5 ml/min.

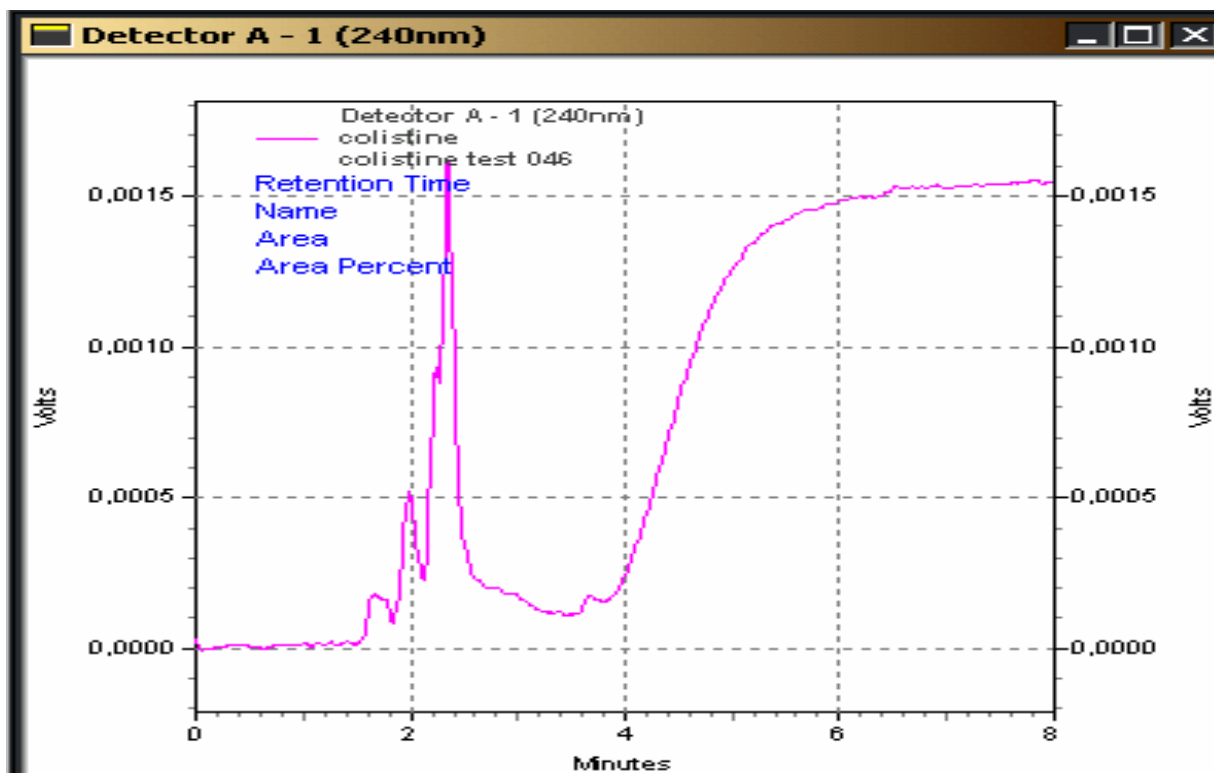


Figure n° 46 : Chromatogramme obtenu avec débit de 1.5ml/mn.

Pour le débit 1.7 ml/mn, le résultat obtenu est représenté par le chromatogramme illustré par la figure (47).

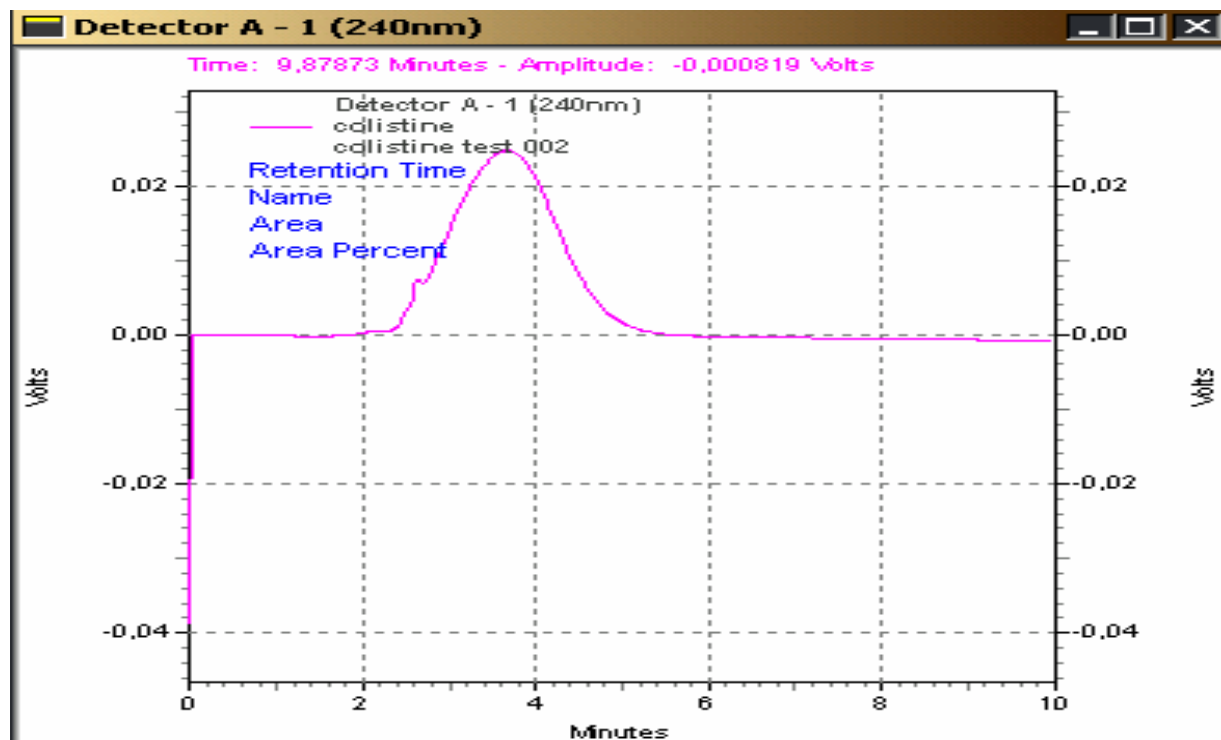


Figure n° 47 : Chromatogramme obtenu avec débit de 1.7 ml/mn.

Le débit de la phase mobile que nous avons retenu a été maintenu à 2 ml/mn. D'après les plusieurs essais que nous avons effectués et répétés nous avons remarqué que le débit n'a pas une grande influence, il agit surtout sur le temps de rétention, temps pendant lequel la molécule à dosée est retenue dans la colonne analytique et par conséquent sur le temps d'apparition du pic, mais aussi sur la largeur de ce pic. Plus on augmente le débit, plus la pression exercée par les pompes augmente, plus la molécule sort vite, plus le temps de rétention et largeur du pic diminues. Ce débit est différent de celui qui a été utilisé dans les travaux réalisés par Morovján, Csokán et al en 1998, le débit de la phase mobile qu'ils ont utilisé est de l'ordre de 1.5 ml/mn. Alors que le débit utiliser par Li et al en 2002 n'est que de 1 ml/min.

2.2.2.5. optimisation du volume injecté

Les volumes testés varient dans un intervalle allant de 1 jusqu'au 20 μ l. Cet intervalle de volume a été choisi par rapport à une boucle d'échantillonnage d'une capacité de 20 μ l seulement.

Différentes essais ont été effectuées avec les deux phases mobiles, et les deux diluants. Les résultats obtenus diffèrent d'un test à un autre. Nous prenons comme exemples les chromatogrammes illustrés par les figures (53 et 54).

Ces deux chromatogrammes ont été enregistrés avec deux volumes injectés différents mais pour les mêmes autres paramètres restants et qui sont :

- une colonne analytique en phase inverse (C18)
- une phase mobile composée de 100% d'acétonitrile
- un diluant à base de méthanol
- une longueur d'onde d'absorbance de 240 nm
- un débit de 1.5 ml/min
- une quantité injectée (prises comme exemples) de 10 et 12 μ l
- une durée d'analyse de 7 et 4 minutes.

La figure (48) illustre un chromatogramme qui a été enregistré avec un volume injecté de 10 μ l.

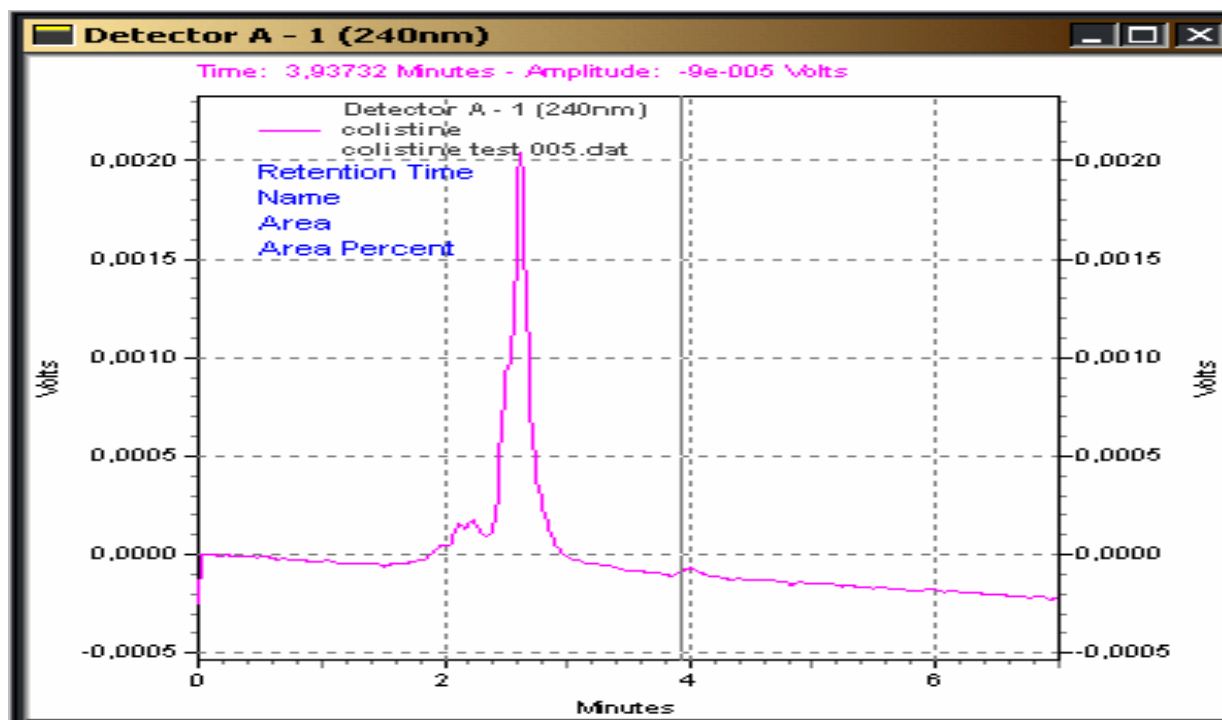


Figure n ° 48 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 10 µl.

Le résultat qui été obtenu avec un volume injecté de 12 µl est représenté par le chromatogramme illustré par la figure (49).

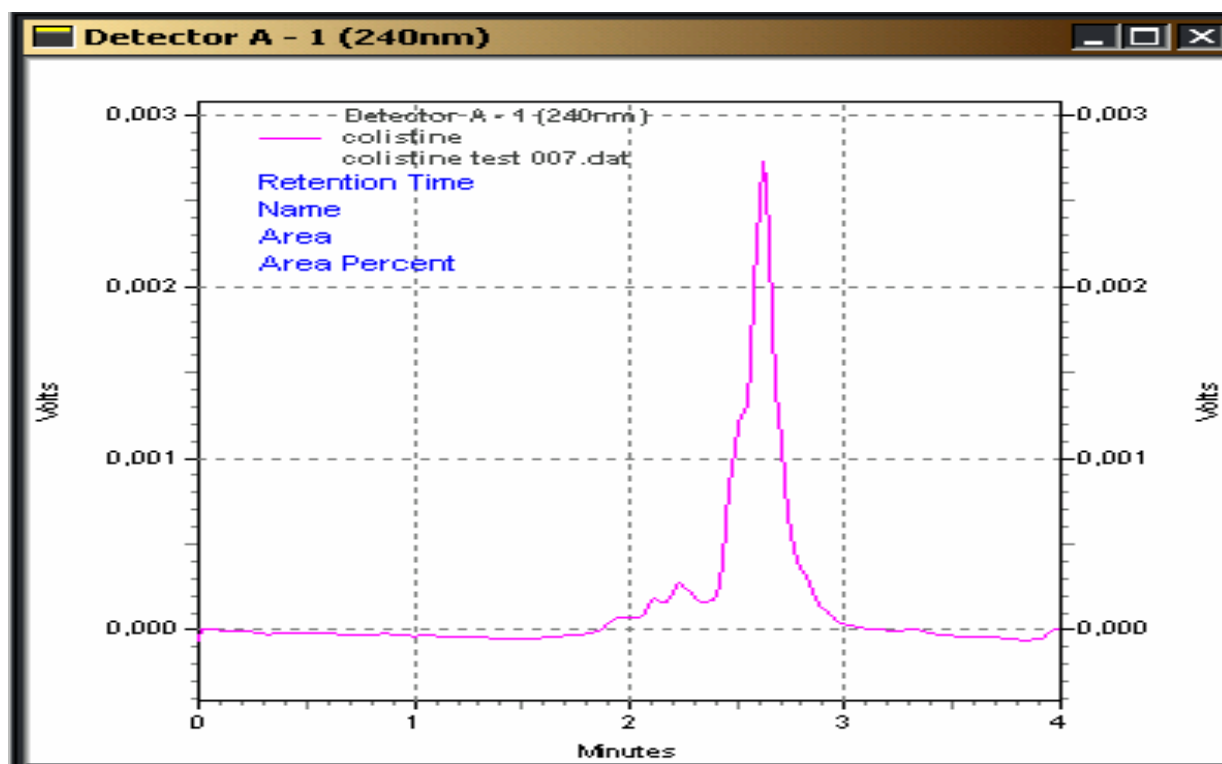


Figure n ° 49 : Chromatogramme obtenu avec un volume injecté de 12 µl.

Pour le volume injecté ; dernier paramètre optimisé, la valeur retenue est de 10 µl. Ce résultat est le fruit de plusieurs essais avec des volumes différents. L'effet de ce paramètre se résume en une diminution ou en une augmentation de l'aire du pic selon bien sûr le la quantité qu'on injecte. Plus on augmente la quantité injectée plus la surface de l'aire du pic augmente et vis-versa. Eric Chun-hong et al (2006) utilisent un volume injecté de 30 µl. Ce volume qui est préconisé par ce groupe de chercheurs on n'a pas pu l'atteindre en raison que la capacité de la boucle d'échantillonnage que nous avons est limitée à 20 µl.

Comme pour l'oxytétracycline et entre chaque deux à trois tests réalisés pour l'optimisation des paramètres d'analyse de la colistine, un ou deux nettoyages successifs avec l'éluant utilisé seront réalisés. Durant chaque nettoyage nous utiliserons les mêmes paramètres utilisés pour le test encours.

Ces nettoyages ont comme principal but dans un premier lieu de vérifier s'il y avait ou non une absorbance qui sera lié obligatoirement dans le cas positif a cet éluant et se traduira dans ce cas la par l'apparition d'un pic et dans un second lieu de nettoyer la colonne analytique. Les figures (50) et (51) indiquent des chromatogrammes qui ont été enregistrés au cours de deux essais de nettoyage.

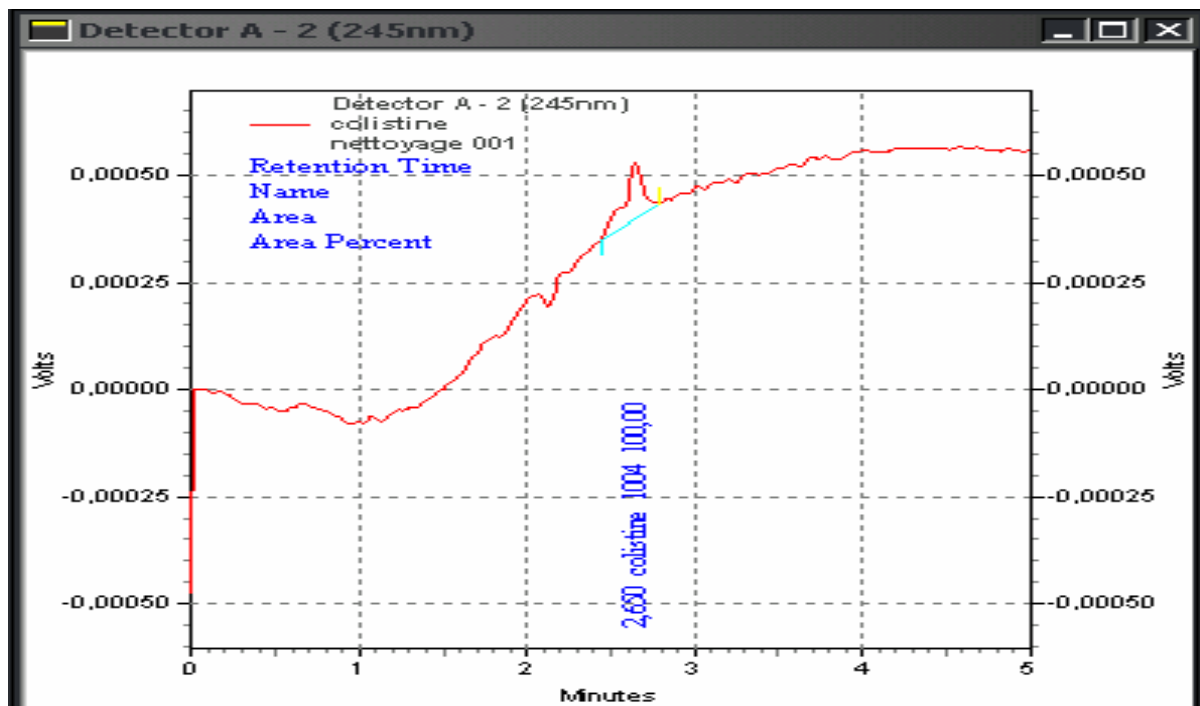


Figure n° 50 : Premier exemple d'un chromatogramme enregistré durant un essai de nettoyage (optimisation des paramètres d'analyse de la colistine).

Ce premier chromatogramme de nettoyage (figure 50) est obtenu avec un éluant méthanol (100%) et avec les conditions d'analyses suivants :

- une phase stationnaire en phase inverse (C18)
- une phase mobile à base d'acétonitrile
- un diluant composé de méthanol (100%)
- une longueur d'onde de 245 nm
- un débit de 1.5 ml/min
- une quantité injectée de 10 μ l
- et durée d'analyse de 5 minutes.

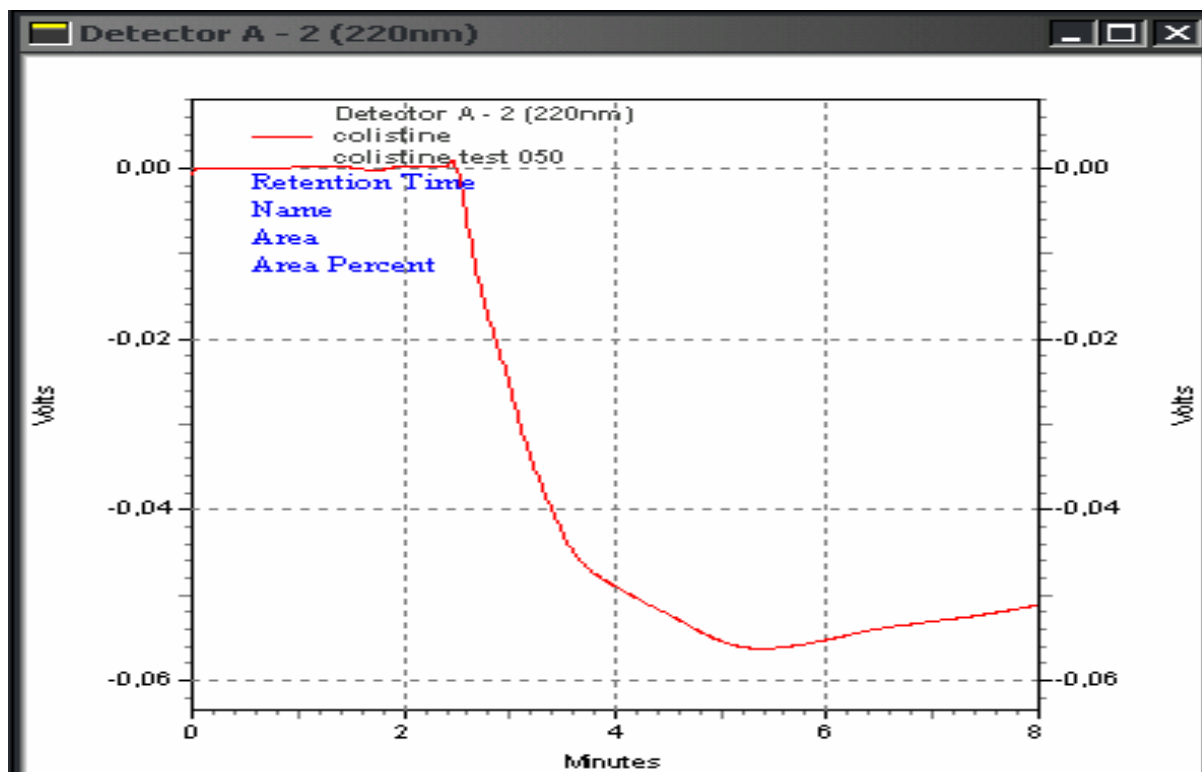


Figure n° 51 : Second exemple d'un chromatogramme enregistré durant un autre essai de nettoyage durant (optimisation des paramètres d'analyse de la colistine).

Par contre le second exemple de nettoyage illustré par la figure (51) est obtenu avec un éluant d'acétonitrile (100%) et avec les paramètres d'analyse suivants :

- une phase stationnaire en phase inverse (C18)
- phase mobile à base d'acétonitrile
- diluant constitué d'acétonitrile (100%)
- une longueur d'onde de 220 nm

- un débit de 1 ml/min
- une quantité injectée de 8 μ l
- et une durée d'analyse de 8 minutes

2.2.2.6. tableau récapitulatif des paramètres retenus pour détecter et quantifier les résidus de la colistine

Le tableau (19) nous indique les paramètres retenus à la fin de l'optimisation. Ces paramètres que nous avons retenus seront utilisés pour la vérification de la fidélité de la méthode servant à détecter et quantifier les résidus de la colistine dans la viande blanche.

Tableau n° 19 : Les paramètres retenus pour la détection et la quantification des résidus de colistine.

| | Paramètre retenu |
|-----------------------------|-------------------------|
| - phase mobile | Méthanol |
| - diluant | Acétonitrile |
| - phase stationnaire | Phase inverse (C18) |
| - longueur d'onde | 245 et 260 nm |
| - débit | 2 ml/min |
| - quantité injectée | 10 μ l |
| - durée d'analyse | 6 minutes |

Les résultats (figure 52 et 53) obtenus avec ces paramètres sont satisfaisants et nous permet une suite du travail. Le pic est clair, la ligne de base est bonne.

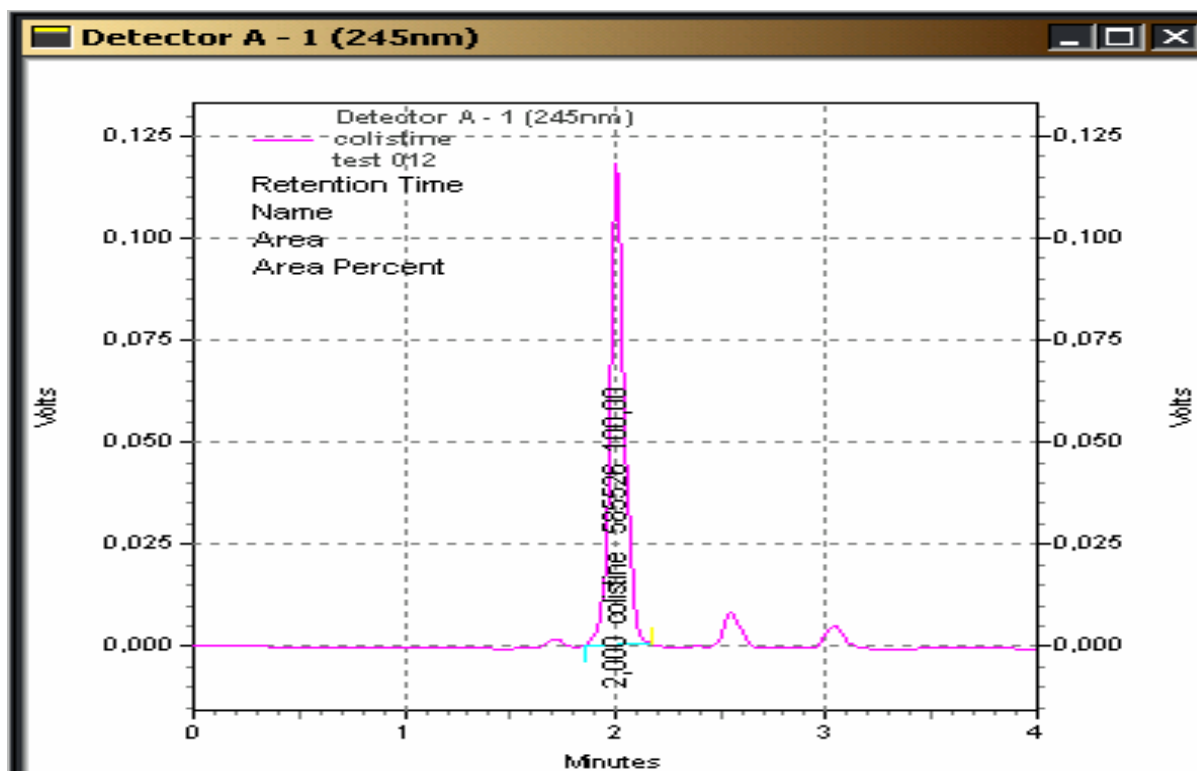


Figure n° 52 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus mais avec une longueur d'onde de 245 nm.

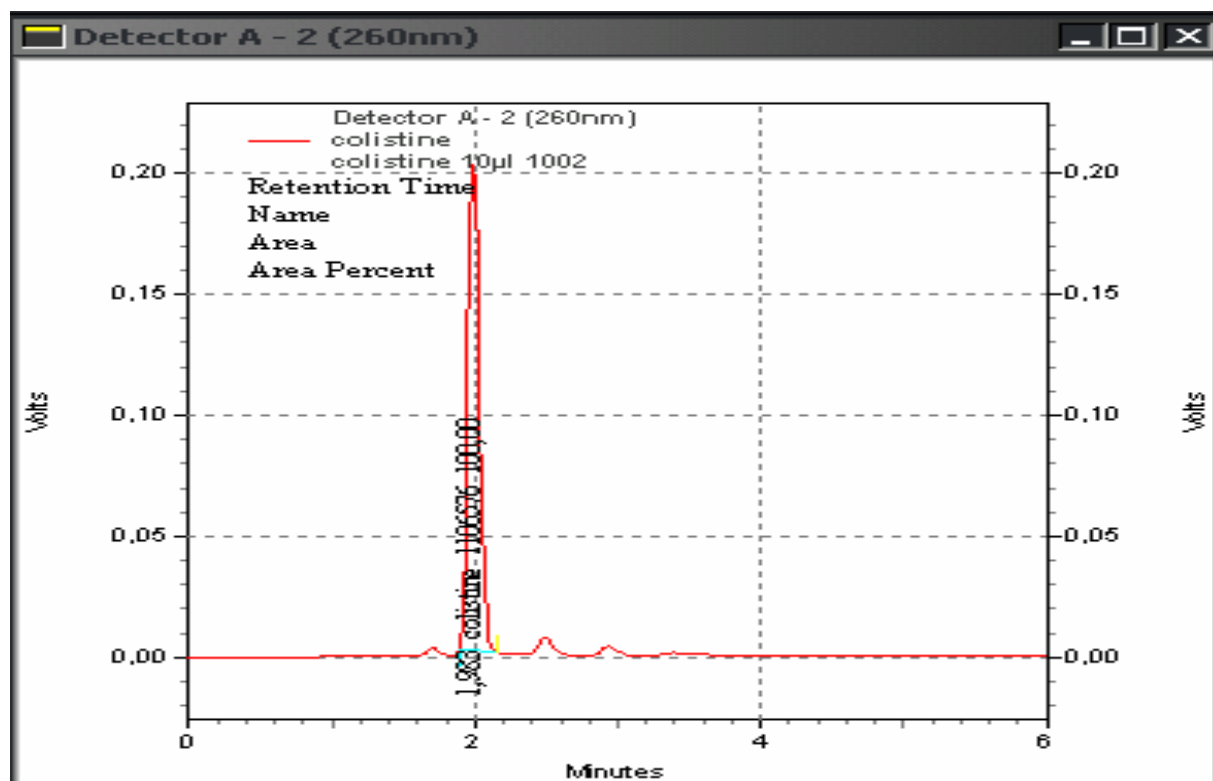


Figure n° 53 : Chromatogramme obtenu avec les paramètres retenus mais avec une longueur d'onde de 245 nm.

3. ETUDE STATISTIQUE DE LA FIDELITE DE LA METHODE

La fidélité est l'aptitude de la méthode à donner des résultats les plus proches possibles lors d'analyses répétées d'un même échantillon. On distingue :

- Répétabilité : variabilité aléatoire des résultats d'une série de déterminations d'un même échantillon effectuée dans des conditions très proches (et donc généralement dans un temps court)
- Reproductibilité : variabilité aléatoire des résultats de plusieurs déterminations d'un même échantillon, effectuées de manière espacée dans le temps, donc dans des conditions qui peuvent être expérimentalement légèrement différentes

Afin de valider les paramètres optimisés avec le standard pur pour détecter et quantifier les résidus d'oxytétracycline et de la colistine dans les denrées alimentaires d'origine animale (muscle du poulet de chair), il a été nécessaire de procéder au préalable à une analyse statistique pour vérifier la répétabilité et la reproductibilité de la méthode utilisée, ainsi que l'établissement d'une courbe d'étalonnage qui sera un repère servant au dosage des résidus de ces deux antibiotiques.

Les surfaces obtenues durant la vérification de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode utilisant les paramètres retenus pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline sont mentionnées dans les annexes (1) et (3).

Alors que les surfaces obtenues durant la vérification de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode utilisée pour la détection et la quantification des résidus de la colistine sont mentionnées dans les annexes (2) et (4).

3.1. OXYTETRACYCLINE

3.1.1. VERIFICATION DE LA REPETABILITE

Par définition la répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans

le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent : l'analyste, l'appareil, le jour.

La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante, (Anonyme 1 i, 2007) :

$$\frac{t_{(0,975; n-1)} \times S_2}{\sqrt{n}}$$

Or S_2 : écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité.

L'étude de la fiabilité de la méthode exprimée par la répétabilité des mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline a conduit aux résultats résumés dans le tableau (20).

Tableau n° 20 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la répétabilité des mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline.

| N° de série | Nombre de mesure (n) | Moyenne | Ecart-type | Coefficient de variation | Répétabilité |
|-------------|----------------------|---------|------------|--------------------------|--------------|
| 1 | 6 | 46134,2 | 2557,08 | 5,54271% | 2683.93 |
| 2 | 6 | 45051,3 | 2748,77 | 6,10141% | 2885.13 |
| 3 | 6 | 45982,0 | 2810,47 | 6,1121% | 2949.89 |

3.1.2. VERIFICATION DE LA REPRODUCTIBILITE

Par définition la reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour. La valeur sera déterminée à partir de l'équation suivante, (Anonyme 1 i, 2007) :

$$\frac{t_{(0,975; n-1)} \times S_3}{\sqrt{n}}$$

Or S_3 : écart type d'une série de mesures se référant à la reproductibilité.

Les résultats que nous avons obtenus durant l'étude de la fiabilité de la méthode exprimée par la reproductibilité des mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline sont résumés dans le tableau (21).

Tableau n° 21 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la reproductibilité des mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline.

| | Série n° 1 | Série n° 2 | Série n° 3 |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Nombre de mesure (n) | 20 | 20 | 20 |
| Moyenne | 41873,8 | 41468,9 | 42206,7 |
| Ecart-type | 1204,7 | 1216,19 | 1243,49 |
| Coefficient de variation | 2,87697% | 2,93276% | 2,94618% |
| Reproductibilité | 563.8 | 569.2 | 582.0 |

À partir des résultats obtenus dans le tableau (20) et (21), nous avons comparé les trois séries en calculant le t entre chaque deux séries, ce dernier est comparé avec t (table).

NB : nous avons travaillé avec un risque de 5% et selon la table de Student au risque de 5% $t = 1.96$.

Il n'y a pas de différence significative entre les surfaces des trois séries d'analyse selon les tests statistiques donc nous pouvons dire que notre méthode est répétable et qu'elle est reproductible.

L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures (séries de reproductibilité) à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante, (Anonyme 1 i, 2007) :

$$\bar{x} \pm \frac{t_{(0,975; n-1)} \times S}{\sqrt{n}}$$

Tableau n° 22 : L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique des séries de mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline.

| | Série 1 | Série 2 | Série 3 |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Intervalle de confiance | 41873,8 ± 563.8 | 41468,9 ± 569.2 | 42206,7 ± 582.0 |

3.1.3. VERIFICATION DE LA LINEARITE

3.1.3.1. préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage

Des solutions de concentrations croissantes ont été préparées à partir de la poudre du standard oxytétracycline qui nous a été fourni. Ces solutions sont indépendantes et réalisées à partir de pesées différentes de poudre.

3.1.3.2. courbe d'étalonnage

La linéarité de la méthode est vérifiée sur 5 points de gamme d'étalonnage dans le domaine de concentrations de 10 à 40 µg/ml en oxytétracycline. Le coefficient de corrélation (r^2) est égal à 0,9795. La droite de régression est établie sur 5 points de gamme.

L'équation du modèle linéaire postulé est $y = 4560,9x - 7385,1$.

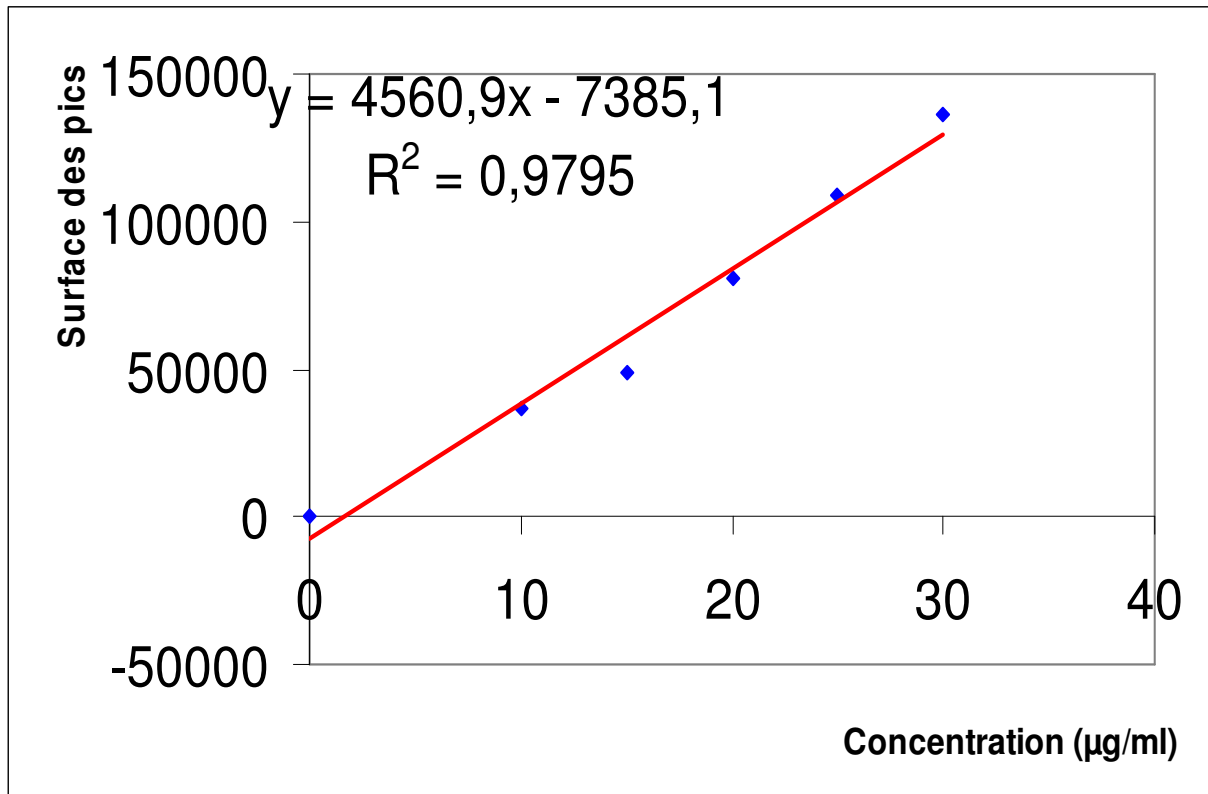


Figure n° 54 : Droite de calibration de l'oxytétracycline.

3.2. COLISTINE

3.2.1. VERIFICATION DE LA REPETABILITE

Pour la vérification de la répétabilité de la méthode, 3 séries de 6 tests ont été effectuées. Les surfaces enregistrées dans les chromatogrammes ont été utilisées pour les calculs.

La formule utilisée pour calculer la répétabilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline a été utilisée pour calculer celle de la colistine.

$$\frac{t_{(0,975;n-1)} \times S_2}{\sqrt{n}}$$

Les résultats obtenus au cours de la vérification de la répétabilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard colistine sont résumés dans le tableau (23).

Tableau n° 23 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la répétabilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard colistine.

| N° de série | Nombre de mesure (n) | Moyenne | Ecart-type | Coefficient de variation | Répétabilité |
|-------------|----------------------|---------|------------|--------------------------|--------------|
| 1 | 6 | 611589 | 66151,0 | 10,8163% | 69432.51 |
| 2 | 6 | 619385 | 54776,8 | 8,84375% | 57494.08 |
| 3 | 6 | 593371, | 57316,2 | 9,65943% | 60159.45 |

3.2.2. VERIFICATION DE LA REPRODUCTIBILITE

La formule utilisée pour calculer la reproductibilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard oxytétracycline a été aussi utilisée pour calculer celle de la colistine.

$$\frac{t_{(0,975; n-1)} \times S_3}{\sqrt{n}}$$

L'étude de la fiabilité de la méthode exprimée par la reproductibilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard colistine a conduit aux résultats résumés dans le tableau (24).

Tableau n° 24 : Etude de la fiabilité de la méthode exprimée par la reproductibilité des mesures réalisées sur une de différentes concentrations préparées du standard colistine.

| | Série n° 1 | Série n° 2 | Série n° 3 |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Nombre de mesure (n) | 20 | 20 | 20 |
| Moyenne | 541643 | 550289 | 546839 |
| Ecart-type | 75556,3 | 77480,4 | 77304,1 |
| Coefficient de variation | 13,9495% | 14,08% | 14,1365% |
| Reproductibilité | 35361.03 | 36261.53 | 36179.02 |

À partir des résultats obtenus dans le tableau (23) et (24), nous avons comparé les trois séries en calculant le t entre chaque deux séries, ce dernier est comparé avec t (table).

NB : nous avons travaillé avec un risque de 5% et selon la table de Student au risque de 5% $t = 1.96$.

Il n'y a pas de différence significative entre les surfaces des trois séries d'analyse selon les tests statistiques donc nous pouvons dire que notre méthode est répétable et reproductible.

L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante :

$$\bar{x} \pm \frac{t_{(0,975; n-1)} \times s}{\sqrt{n}}$$

Tableau n° 25 : L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures réalisées sur l'une de différentes concentrations préparées du standard colistine.

| | Série 1 | Série 2 | Série 3 |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Intervalle de confiance | 541643 ± 35361.03 | 550289 ± 36261.53 | 546839 ± 36179.02 |

3.2.3. VERIFICATION DE LA LINEARITE

3.2.3.1. préparations des solutions pour la gamme d'étalonnage

Nous réalisons des solutions de concentrations croissantes de la colistine à partir de la poudre. Ces solutions sont indépendantes et réalisées à partir de pesées différentes de poudre.

3.2.3.2. courbe d'étalonnage

La linéarité de la méthode est vérifiée sur 4 points de gamme d'étalonnage dans le domaine de concentrations de 10 à 40 µg/ml en colistine sulfate. Le coefficient de corrélation (r^2) est égal à 0,9989. La droite de régression est établie sur 4 points de gamme.

L'équation du modèle linéaire postulé est : $y = 122128 x - 41621$.

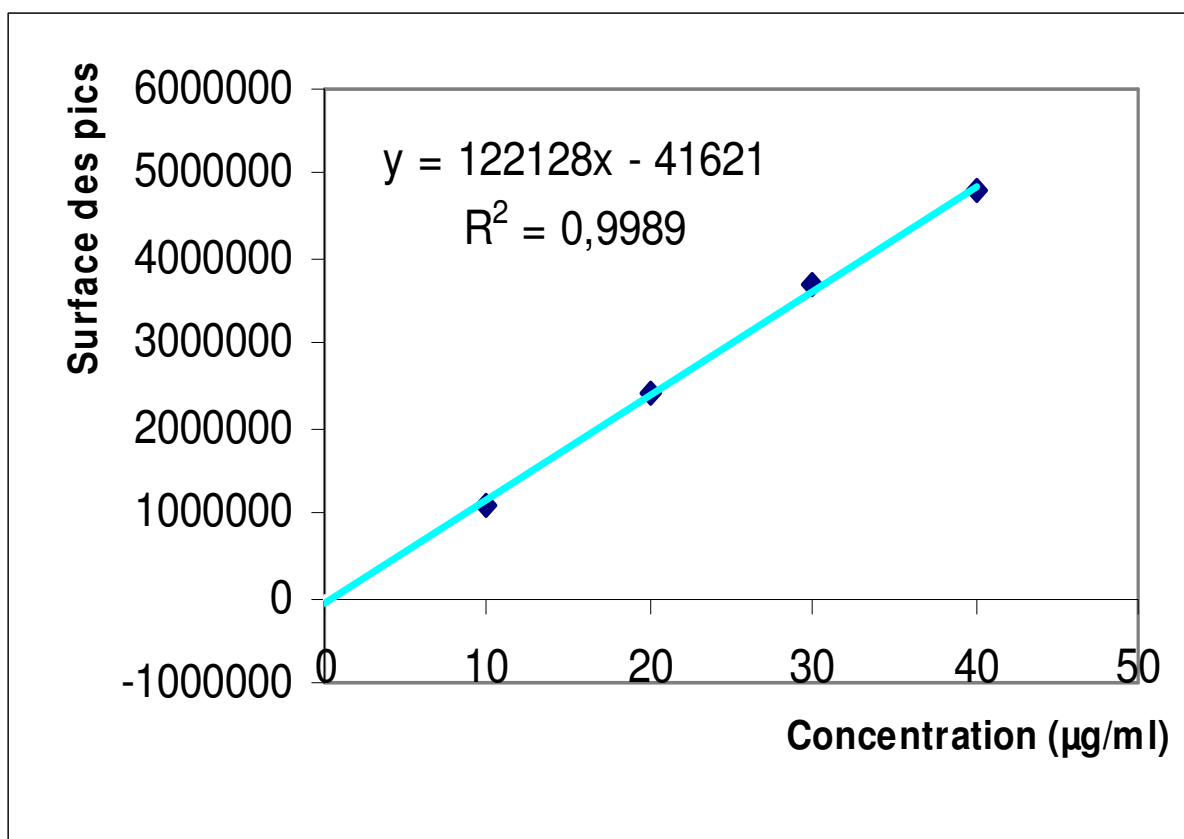


Figure n° 55 : Droite de régression de la colistine.

Après que les différents paramètres d'analyse de chaque antibiotique sont optimisés et les courbes d'étalonnage sont établies, nous sommes actuellement entraîné de tester quelques méthodes d'extraction. Cette étape très importante par laquelle s'effectue le dosage des antibiotiques sera l'objet de notre travail suivant et qui est le doctorat.

Parmi ces méthodes testées, nous citons celle décrite par Terasaki (1964). Au sein d'un bain réfrigérant, 5 g de muscle de bréchet sont homogénéisés à l'aide d'un broyeur ultra Turax dans 20 ml d'acide perchlorique à 10 %, puis centrifugés à 3000 G pendant 15 minutes.

Le culot de centrifugation est lavé avec 20 ml d'acide perchlorique à 5 %. Les deux surnageants sont ensuite réunis et 10 ml du mélange sont neutralisés par l'hydroxyde de potassium (KOH) 5 N. Après centrifugation, le perchlorate de potassium formé est éliminé et le volume final est ajusté à 10 ml d'eau pur (pour HPLC).

CONCLUSION

Nous avons procédé à des investigations expérimentales afin d'optimiser les paramètres de détection et de quantification des résidus d'oxytétracycline et de la colistine dans le muscle du poulet de chair.

Pour cela, plus de 800 essais expérimentaux ont été effectués afin de fixer les paramètres d'analyse de l'oxytétracycline et de la colistine :

- Pour l'oxytétracycline nous avons retenus :
 - une phase stationnaire en phase inverse de type ODS, C18
 - une phase mobile composée de 100% d'acétonitrile
 - une longueur d'onde de 325 nm et 344 nm
 - un débit de 1.5 ml/mn
 - un volume injecté de 11 μ l
 - une durée d'analyse de 8 mn
- pour la colistine nous avons retenus :
 - une phase stationnaire en phase inverse type ODS, C18
 - une phase mobile composée de 100% de méthanol
 - une longueur d'onde de 245 nm et 260 nm
 - un débit de 2 ml/mn
 - un volume injecté de 10 μ l
 - une durée d'analyse de 8 mn

D'autre part, la fiabilité de la méthode a été étudiée par la vérification de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode ainsi que par l'établissement de la droite de régression.

Ces paramètres retenus serviront à un travail ultérieur (Doctorat) pour la détection et la quantification des résidus de ces deux antibiotiques dans la viande de poulet de chair et pour réaliser une étude cinétique de ces mêmes antibiotiques qui nous servira de base pour la proposition de la limite Maximale de résidus (LMR) dans la ville de Constantine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1. Anonyme 1 a (2007)**
Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, page 1-3.
<http://www.bacteriologie.net/index.html> (Consulter le 06-01-2008).
- 2. Anonyme 2 a (2005)**
Antibiothérapie 1 & 2, page 2-39.

<http://ifsi.ch-hyeres.fr/IMG/pdf/Antibiotherapie.pdf> (Consulter le 11-12-2007).
- 3. Anonyme 3 a (2006)**
Antibiotiques. Cours de Bactériologie Générale. Faculté de Médecine COCHIN-PORT-ROYAL, Université PARIS.
<http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio1.html> (Consulter le 11-02-2008).
- 4. Anonyme 4 (2003)**
Antibiotiques. Les antibiotiques sont de précieux alliés à préserver, page 24-32.
<http://www.simv.org/Publications/Guide-Medicament/P24-32.pdf> (Consulter le 10-03-2008).
- 5. Anonyme 5 (2000)**
Aspects théoriques de la chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.), page 7-58. Document technique - association CIBAC - document technique.
<https://iutcv.univ-paris12.fr/cibac/Annexes/CPG.pdf>. (Consulter le 22-01-2008).
- 6. Anonyme 1 b (2007)**
CHAPITRE II : CHROMATOGRAPHIES (TP02), page 1. Lycée La Merci.
http://laroche.lycee.free.fr/barrandon/Spec_TS_physique/Fiche2_chroma.pdf.
(Consulter le 17-12-2007).
- 7. Anonyme 1 c (2007)**
Chromatographie - Aspects Généraux, page 1-4.
http://www.unige.ch/cabe/chimie_anal/chromato_notes.pdf (Consulter le 23-02-2008).
- 8. Anonyme 6 (1998)**

Chromatographie. Lycée Louis Vincent – METZ, page 1-52.
<http://www.ac-nancy-metz.fr/enseigner/Physique/CHIM/Chromato01/chromato.pdf>.
(Consulter le 20-01-2008)
- 9. Anonyme 1 d (2007)**
Consommation de viande : un lourd tribut environnemental, page 4,13. Un dossier de l'Observatoire Bruxellois de la Consommation Durable – OBCD.
www.observ.be/v2/fr/pdf/2399fr.pdf (Consulter le 12-04-2008).

10. Anonyme 1 e (2007)

Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II, GPEE, 1ère année. ENSA Agadir, page 1-26.

<http://www.ensa-agadir.ac.ma/gpee/download/chromatographie.pdf>. (Consulter le 20-01-2008).

11. Anonyme 2 b (2005)

Cours de biochimie médicale en médecine vétérinaire (Année 2004/2005), page 14-21, département des sciences vétérinaires El Khroub (DSVK), Université de Mentouri, Constantine (UMC).

12. Anonyme 3 b (2006)

Cours de chimie organique, minérale et structurale. Chapitres chromatographies.

<http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Chromato01/chromato01.htm> (Consulter le 06-02-2008)

13. Anonyme 1 f (2007)

Cours de nutrition humaine. Chapitre viandes, poissons et oeufs, page 2-4. Magistère surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande. Laboratoire de recherche de pathologie animale, développement des élevages et surveillance de la chaîne alimentaire. Département des sciences vétérinaires El Khroub (UMC) (Année 2006/2007).

14. Anonyme 3 c (2006)

Cours de pharmacologie 2005-2006, Chimiothérapie anti-infectieuse. Institut de Pharmacologie et Toxicologie, page 3-46.

www.unil.ch/webdav/site/dpt/shared/BachelorMaster/8semestre/LS_antibiotiques_1_06.pdf. (Consulter le 04-02-2008).

15. Anonyme 3 d (2006)

Cours Pharmacologie DCEM1, page 307-320. Université Paris-VI. Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.

<http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/Pharmaco.pdf> (Consulter le 20-02-2008).

16. Anonyme 2 c (2005)

Cours spectrométrie de masse 2005, page 4-33. Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique UMR 7512 (Dir : Alain Van Dorsselaer) CNRS - Université Louis Pasteur Strasbourg.

http://www-esbs.u-strasbg.fr/notesdecours/3eme-annee/gap/MmeSanglier05-10-05/Intro_SS.pdf. (Consulter le 20-04-2008).

17. Anonyme 7 a (2008)

Introduction à la chromatographie, page 1.

<http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/generalite/chroma1.html>. (Consulter le 22-05-2008).

18. Anonyme 1 g (2007)

La chromatographie, page 1-10. Centre de recherche et de restauration des musées de France C2RMF, 6 rue des Pyramides 75041 Paris cedex 01.

<http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chromato.htm>.
(Consulter le 10-01-2008).

19. Anonyme 7 b (2008)

La chromatographie, page 1. CE4 : Chimie Physique Expérimentale.
UNIVERSITE PARIS 7 DIDEROT.
http://134.157.73.76/spip/article.php3?id_article=338. (Consulter le 19-02-2008).

20. Anonyme 1 h (2007)

Les viandes de boucherie, page 26.
http://www.restena.lu/ltb/downloads/memoire_sauber/viandes.pdf (Consulter le 13-05-2008)

21. Anonyme 7 c (2008)

Menace sur la filière avicole : A qui profite la crise ? ; page 2.
<http://www.eepad.dz/information/actualite/lire.phpref=3240> (Consulter le 10-04-2008).

22. Anonyme 2 d (2005)

Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. Techniques chromatographiques.
<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A1.html> (Consulter le 06 -02-2008).

23. Anonyme 3 e (2006)

Pharmacocinétique et modalités d'administration des antibiotiques, page 2-4.
Laboratoire de Pharmacocinétique et de Pharmacie Clinique EA 525 Université V. Segalen Bordeaux 2 et Pharmacie centrale hôpital Haut-Lévêque CHU de Bordeaux.
<http://www.infectiologie.com/site/medias/JNI/JNI06/IDE/ati1-Saux.pdf>. (Consulter le 10-02-2008).

24. Anonyme 2 e (2005)

Pharmacologie des antibiotiques (DCEM I), page 2-187.
[www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio_oct2005.ppt](http://www.sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/pharma/site.fac/diaporama/antibio_oct2005.ppt). (Consulter le 15-12-2007).

25. Anonyme 7 d (2008)

Pharmacologie des Antibiotiques, page 2-60. Cours de Pharmacologie DCEM3. Centre d'Investigations Cliniques.
http://www.medecine.univ-paris7.fr/DCEM3/documents/pharmacologie_module17/Pharmacologie%20des%20Antibiotiques.pdf (Consulter le 12-02-2008).

26. Anonyme 1 i (2007)

Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie. Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.

www.ceaeq.gouv.qc.ca (Consulter le 18-05-2008).

27. Anonyme 8 (2001)

Spectrométrie de masse organique et bio-organique, page 2-8.
<http://www.icsn.cnrs-gif.fr/IMG/pdf/chapitre1.pdf> (Consulter le 17-05-2008).

28. Anonyme 3 f (2006)

Test à large spectre pour la détection de substances antimicrobiennes dans la viande, page 1-2. Fiche de produit. DSM Nutritional Products.
www.premitest.com
http://www.dsm.com/en_US/downloads/premitest/PremiTest_ScreeningtestmeatFrams_DNP.pdf. (Consulter le 17-02-2008).

29. Babić . S, Ašperger . D, Mutavdžić . D, Horvat . A-J-M, Kaštelan-Macan . M (2006)

Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater, page 733-737. Talanta 70 (2006) 732–738.

30. Belhadj . M-T (2008)

Contribution a l'étude de la qualité bactériologique des viandes blanches commercialisées dans la Wilaya de Bordj Bou Areridj, page 7. Mémoire de magistère, école nationale vétérinaire El Harrach, Alger.

31. Berrah . A (1984)

Cours de statistique appliquée. Collection mathématique de l'USTHB, 1^{ère} édition.

32. Berthe . T, Moisan . A, Carrie . J (2007)

Résidus d'antibiotiques dans les aliments, page 2-33. 1^{ères} rencontres des Laboratoires Publics de l'Ouest.
http://www.cg56.fr/pdf/LPO_residus_antibiotiques.pdf (Consulter le 14-11-2007).

33. Bezoen . A, Van Haren . W, Hanekamp . J-C (1999).

Human Health and Antibiotic Growth Promoters (AGPs): Reassessing the Risk. Heidelberg Appeal Nederland studies.
<http://www.stichting-han.nl/english/studies.html> (Consulter le 11-03-2008)

34. Bouchard . E (2004)

Préparations pharmaceutiques pour la décontamination digestive : dosage et étude de stabilité des principes actifs des gélules administrées chez les adultes neutropéniques, page 48-50. Mémoire du diplôme d'études spécialisées de pharmacie industrielle et biomédicale. Mémoire N°26-2004. Université Claude Bernard – Lyon I faculté de pharmacie institut des sciences pharmaceutiques et biologiques.

35. Bouchonnet . S, Libong . D (2007)

Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse, page 2-24. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Ecole Polytechnique 91128 PALAISEAU Cedex.
<http://www.dcmr.polytechnique.fr/moyens/couplage.pdf> (Consulter le 26-01-2008).

36. Boukhalfa . L (2006)

L'aviculture en Algérie. Journées sur la grippe aviaire (Batna les 15-16/03/2006).

37. Bourin . M, Lievre . M, Allain . H (1993)

Cours de pharmacologie, 3^{ème} édition, chapitre médicaments anti-infectieux, page 291-307.

38. Broes . A, Boutin . R, Delorme . M (1999)

Utilisation des médicaments. Guide porc, comité production porcine, page 4-6.
http://www.cdpqinc.qc.ca/Champs_dactivite/04Sante/references/Medicaments%20CPAQ%20final.pdf (Consulter le 25-02-2008)

39. Cancho Grande . B, García Falcón M-S, Pérez-Lamela . C, Rodriguez Cornesaña . M, Simal Gándara . J (2001)

Quantitative Analysis of Colistin and Tiamulin in Liquid and Solid Medicated Premixes by HPLC with Diode-Array Detection, page 462-463. CHROMATOGRAPHIA 2001, 53, Suppl., S-460 S-463.

40. Châtaigner . B et Stevens . A (2003)

Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées a Dakar (Institut Pasteur de Dakar), page 3–7, 51.
http://www.redev.info/Doc/Polagri/III-Pol-Agri-securite-alimentaire/III-3-Dev-local/Enquete_residus_AB_Senegal.pdf (Consulter le 20-11-2007).

41. Chatellet . M-C (2007)

Modalités d'utilisation des antibiotiques en élevage bovin : enquête en Anjou, page 9-90. Thèse de docteur vétérinaire, École nationale vétérinaire d'ALFORT.

42. Cinquina . A-L, Longo . F, Anastasi . G, Giannetti . L, Cozzani . R (2003)

Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle, page 228-232. Journal of Chromatography A, 987 (2003) 227–233.

43. Clinquart . A, Fabry. J, Casteels . M (1999)

La viande. Chapitre la viande et les produits de viande dans notre alimentation, page 141-161.

44. Colatrella . M-O (2000)

Maladies des bovins, 3^{ème} édition. Chapitre VIII les médicaments, page 46.

45. Corpet . D-E (1999)

Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques, page 99-103. *Revue Méd. Vét.* ,2000,151,99-104.

46. Coyne . R, Bergh . Ø, Samuelsen . O-B (2004)

One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytétracycline in fish muscle, Short communication, page 325-327. Journal of Chromatography B, 810 (2004) 325–328.

47. Cuq . J-L (2007)

Chromatographie Liquide, page 4-48.

<http://diffusiondessavoirs.uomlr.fr/balado/wp-content/uploads/2008/01/chromatoliquide-2007.pdf> (Consulter le 05-02-2008).

48. Cuq . J-L (2008)

Microbiologie alimentaire. Chapitre les agents antimicrobiens, page 125-130.

<http://diffusiondessavoirs.uomlr.fr/balado/wp-content/uploads/2007/10/poly-cours-bio-stia2-007.pdf> (Consulter le 05-02-2008).

49. Danhaive . P (1986)

Détection d'antibiotiques de type B-lactames dans les viandes par la méthode Penzym[®], page 61-63. Annales de médecine vétérinaire (périodique mensuel), ISSN 0003 – 4118, 1986 – T.130 – N° 1 (JANVIER).

50. Della Wai-Mei . S, Clare . H, Yiu-Chung . W, Siu-Kei . H , Alec Chun-Bong . I (2005)

Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry, page 24-30. Analytica Chimica Acta 535 (2005) 23–31.

51. Devie . P, Divol . A, Gilbert . G, Laurent . S, Le Goaziou . A, Olivon . M, Petit . J (2006).

Les antibiotiques dans l'alimentation animale, page 1-30.

<http://www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Prod-Anim/antibio.pdf> (Consulter le 12-12-2007).

52. Dufey . P-A (2005)

Refroidissement de la carcasse et qualité de la viande. Fiche technique pour la pratique, page 2. *ALP actuel* 2005, no 19.

www.db-alp.admin.ch/fr/aktuell/medien_detail.php?id=151. (Consulter le 15-03-2008).

53. Dusser . P (2005)

La réorganisation des échanges internationaux de produits agricoles, page 2-7. Quelles perspectives pour l'agriculture européenne ?

http://www.jle.com/en/revues/agro_biotech/ocl/e-ocs/00/04/12/16/article.md?type=text.html. (Consulter le 29-04-2008).

54. Duval . J, Soussy. C-J (1990)

Antibiothérapie (4^{ème} édition), page 3-58.

55. Eloit . M (2004)

Plan de contrôle des résidus d'antibiotiques dans les viandes d'animaux de boucherie, de volailles, de gibiers, de lapins et de poissons d'élevage, page 2.

[IMG/pdf/dgaln20068240z-3.pdf](http://img/pdf/dgaln20068240z-3.pdf) (Consulter le 20-04-2008).

- 56. Eric Chun-hong . W, Clare . H, Della Wai-mei . S, Yiu-chung . W (2006)**
Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry, page 182-187. Anal Bioanal Chem (2006) 385: 181–188.
- 57. Errecalde . J-O (2007)**
Usos de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, page 1-67.
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf>. (Consultar le 19-01-2008).
- 58. Fabre . J-M, Petit . C, Bosquet . G (2006)**
Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, édition 2006, page 4.
www.deltotest.com (Consultar le 13-02-2008).
- 59. Feliachi . K (2003)**
Rapport National sur les Ressources Génétiques Animales: Algérie. Commission nationale AnGR, page 18-19.
<http://www.fao.org/Ag/AGAInfo/programmes/en/genetics/documents/Interlaken/countryreports/Algeria.pdf>. (Consultar le 02-02-2008).
- 60. Ferrah . A (2005)**
Aides publiques et développement de l'élevage en Algérie contribution à une analyse d'impact (2000-2005), page 7-8.
<http://www.gredaal.com/ddurable/agricelevage/obselevages/publications/autres/Elevage-Algerie-2005.pdf>. (Consultar le 02-03-2008).
- 61. Ferrah . A, Kaci . A, Kabli . L, Nouri . M, Azzouz . H (2001)**
Observatoires des filières avicoles, page 52, institut technique des élevages. Rapport annuel.
http://www.gredaal.com/ddurable/agricelevage/obselevages/publications/aviculture/conduite_equipement.htm. (Consultar le 11-03-2008).
- 62. Fontaine . M (1992)**
Vade-mecum du vétérinaire, formulaire vétérinaire de pharmacologie, de thérapeutique et d'hygiène, 15^{ème} édition, page 106-119. Volume 1.
- 63. Fosse . J-A-S (2003)**
Les dangers pour l'homme liés à la consommation des viandes. Evaluation de l'utilisation des moyens de maîtrise en abattoir. Thèse de l'Ecole nationale vétérinaire de NANTES, page 24-46.
http://www.bibli.vet-nantes.fr/theses/2003/fosse3_148/frame.htm. (Consultar le 22-04-2008).
- 64. Fraysse. J. L et Darré. A (1990)**
Produire des viandes sur quelles bases économiques et biochimiques, volume 1, page 5-49, 264-269.

65. Furusawa . N (2003)

Isolation of tetracyclines in milk using a solid-phase extracting column and water eluent, page 155-159. Talanta 59 (2003) 155_/159

66. Gariépy. C (2005)

Les fibres musculaires et la qualité de la viande de bœuf, page 4-6.

<http://www.agrireseau.qc.ca/bovinsboucherie/documents/Qualit%C3%A9%20de%20la%20viande%20de%20boeuf.pdf>. (Consulter le 15-04-2008).

67. Gaudin . V (2005)

Test rapide de détection de résidus actifs d'antibiotiques de la famille des beta-Lactames (pénicillines, céphalosporines) dans le lait, page 1-16.

[http://www.afnor-validation.org/rapports-synthese/CHR%20HANSEN/Synt%20CHR%2020-3%2003-01%20\(2005\).pdf](http://www.afnor-validation.org/rapports-synthese/CHR%20HANSEN/Synt%20CHR%2020-3%2003-01%20(2005).pdf). (Consulter le 04-02-2008).

68. Gaudin . V, Fabre. J-M, Rault . A (2006)

Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse – Application à la détection des résidus d'antibiotiques et autres molécules à effet antibactérien dans les produits agroalimentaires, page 5-9. Rapport d'étude préliminaire pour la validation AFNOR du Premi Test®.

<http://www.afnor-validation.org/rapports-synthese/DSM/Synt%20DSM%2028-1%2006-06.pdf> (Consulter le 26-01-2008).

69. Gauthier . E (2006)

Les antibiotiques : l'envers du miracle, page 1-3.

<http://agora.qc.ca/mot.nsf/Dossiers/Antibiotique>. (Consulter le 03-02-2008).

70. Gogny . M, Puyt . J-D (2001)

Classification des principes actifs, page 2-6. Editions le point vétérinaire 2001.

71. Gogny . M, Puyt . J-D, Pellerin . J-L (2001)

Classification des principes actifs. L'arsenal thérapeutique vétérinaire, page 165-168. Editions le point vétérinaire 2001.

72. Gómez-Jimenez . S, Espinosa-Plascencia . A, Valenzuela-Villa . F, Bermúdez-Almada . M (2008).

Oxytetracycline (OTC) accumulation and elimination in hemolymph, muscle and hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following an OTC-feed therapeutic treatment, page 23-28. Aquaculture 274 (2008) 24–29

73. Gouyon . P-H, Hetru . C (2005).

Revue Vivant N°1 - Nouveaux antibiotiques : qui maîtrise leur usage? page 2-4.

http://www.vivantinfo.com/uploads/media/Antibiotiques_01.pdf. (Consulter le 03-05-2008).

74. Guillemot . D (2006)

Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine, page 10-214. (AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).

http://www.cndwebzine.hcp.ma/cnd_si/MG/pdf/35821/35822pdf. (Consulter le 20-01-2008).

75. Gurérin-Faublée . V (2001)

Principes de l'utilisation des antibiotiques en pratique vétérinaire, page 2-6.
<http://www.medspe.com/site/articles/20020320/article3/guerin.pdf> (Consulter le 08-03-2008).

76. Herbette . G, Rosas . R, Faure . R (2002)

Présentation de la CLHP, du couplage CLHP-RMN et de la cryosonde, page 2-13. Application au laboratoire de la police scientifique de Marseille. Centre régional de résonance magnétique nucléaire de Marseille. Facultés des sciences techniques de Saint Jérôme-AIX -Marseille III.
http://www.spectropole.u-3mrs.fr/pdf/Spectropole-presentation_HPLC_HPLC-RMN_Cryosonde-500MHz_HPLC-Cryosonde.pdf. (Consulter le 27-01-2008).

77. Jacquemin . F (2006)

Viandes : Après les hormones, les antibiotiques.
<http://pagesperso-orange.fr/alps08-carignan/viandes.htm#haut> (Consulter le 20-02-2008).

78. Kaale . E , Chambuso . M, Kitwala . J (2008)

Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column, page 1290-1293. Food Chemistry 107 (2008) 1289–1293.

79. Kirkpatrick . D (2002)

L'utilisation au Canada d'antimicrobiens chez les animaux destinés à l'alimentation : les conséquences pour la résistance et la santé humaine, page-17-229.
http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/pubs/amr-ram_final_report-rapport_06-27_f.pdf
(Consulter le 07-01-2008).

80. Klotins . K (2006)

Utilisation des antibiotiques comme stimulateurs de croissance: controverse et solutions.

<http://www.omafr.gov.on.ca/french/livestock/animalcare/amr/facts/05-042.htm>
(Consulter le 12-11-2007).

81. Kölbener . P et al (2005)

Résidus de médicaments vétérinaires, page 1-2. Manuel suisse des denrées alimentaires. Chapitre 55.
www.bag-anw.admin.ch/SLMB_Online_PDF/Data%20SLMB_MSDA/Version%20F/55_Residus%20de%20medi.%20veter..pdf. (Consulter le 15-01-2008).

82. Lavallaz . P, Délétroz . R (1994)

CHROMATOGRAPHIE, page 1-14.

<http://www.etudiants.ch/upload/documents/superuser/chromatographie.pdf>.
(Consulter le 0-2-2008).

83. Le Bihan . J.Y, Lemasson . J.P (2008)

Chromatographie liquide haute performance ou H.P.L.C
<http://www.iut-lannion.fr/LEMEN/Mpdoc/CHIMIE/Chimie1/CHROMATO.HTM>.
(Consulter le 08-02-2008).

84. Li . J, Milne . R-W, Nation . R-L, Turnidge . J-D., Coulthard . K, Valentine . J (2002)

Simple Method for Assaying Colistin Methanesulfonate in Plasma and Urine Using High-Performance Liquid Chromatography, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Oct. 2002, p. 3304–3307, Vol. 46, No. 10.

85. Lynn G. F et Dieter . A (2007)

GENERAL CONSIDERATIONS. Chapitre COLISTIN, page 7-24
<http://www.chromatographia.com/pic/london.pdf>

86. Maghuin-Rogister . G (2006)

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse, page 183-186. Evolution de la stratégie de contrôle page 183-187. *Ann. Méd. Vét.*, 2005, 149, 183-187.

87. Maghuin-Rogister . G, Janosi . A, Helbo . V, Van Peteghem . C, Sanders. E, Van Eeckhout . N, Cornelis . M, Jouret . M (2001)

Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires 27 -59. Rapport Final SSTC 1998-2001.

www.belspo.be/belspo/home/publ/pub_ostc/NP2/Rnp035s_fr.pdf. (Consulter le 15-02-2008).

88. Maghuin-Rogister . G, Janosi . A, Helbo . V, Van Peteghem . C, Sanders. E, Van Eeckhout . N, Cornelis . M, Jouret . M (2001)

Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires 63 -112. Rapport Final SSTC 1998-2001.

www.belspo.be/belspo/home/publ/pub_ostc/NP2/Rnp035a1_fr.pdf. (Consulter le 13-02-2008).

89. Maur . N (1979)

Vade-mecum des antibiotiques et agents chimio-thérapeutiques anti-infectieux, 4^{ème} édition, page 7 - 397.

90. Maur . N (1990)

Vade-mecum des antibiotiques, 5^{ème} édition, page 13-73.

91. Messai . A (2006)

Analyse critique des pratiques de l'antibiothérapie en élevages avicoles, page 5, 26-27. Thèse de magistère département des sciences vétérinaires d'El Khroub, Université de Mentouri Constantine (UMC).

92. Mevius . D-J, Rutter . J-M, Hart . C-A, Imberechts . H, Kempf . G, Lafont . J-P, Luthman . J, Moreno . M-A, Pantosti . A, Pohl . P, Willadsen . C-M (1999)
Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products, page 1-57. Editions Le point vétérinaire 2001.

93. Mialot . M-M (2008)

Une nouvelle filière aidée via le 'CAP' -Contrat d'Appui aux Projets- « filière viande blanche » : Marie-Madeleine MIALOT signe la convention d'application, page 2.

<http://www.regionsmagazine.com/site/articles/centre/2008/02/2008-02-12-2/centre-capviandeblanche.pdf>. (Consulter le 02-01-2008).

94. Milhaud . G (1978)

L'utilisation rationnelle des médicaments vétérinaires et le temps d'attente, page 177-185. *Rec.Méd.Vét.*, 1978, 154 (2) ,177-185. École vétérinaire d'ALFORT (France).

95. Milhaud .G, Pinault . L (1999)

Législation de la pharmacie vétérinaire. Editions le point vétérinaire.

Chapitre III : évaluation des médicaments vétérinaires : Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), limites maximales de résidus (LMR), page 25-40. Editions Le point vétérinaire 2001.

96. Molette . C (2004)

Analyse protéomique d'altérations de propriétés sensorielles et technologiques de la viande de dinde, page 31. Thèse de docteur de l'institut national polytechnique de TOULOUSE. Ecole doctorale Sciences des Procédés. Spécialité Sciences Agronomiques.

97. Morin . R, Uhland . C, Lévesque . G (2005)

L'utilisation des antibiotiques en pisciculture au Québec, page 6. *L'AQUICOLE* Vol. 9 no3.

98. Morales-Múnoz . S, Luque de Castro . M-D (2005)

Dynamic ultrasound-assisted extraction of colistin from feeds with on-line pre-column derivatization and liquid chromatography-fluorimetric detection, page 1-7. *Journal of Chromatography A*, 1066 (2005) 1-7.

99. Morovján . G, Csokán . P-P, Németh-Konda . L (1998)

HPLC Determination of Colistin and Aminoglycoside Antibiotics in Feeds by Post-Column Derivatization and Fluorescence Detection, page 32-36. *Chromatographia* Vol.48, No. 1/2, July 1998, 0009-5893/98/07 32-05.

100. Ndiaye . M-L (2002)

Contribution a l'étude de la contamination microbiologique de la viande de volailles, page 2-4. Mémoire de DEUA, Faculté des sciences et techniques institut de technologie nucléaire appliquée I.T.N.A. Université CHEIKH Anta Diop de Dakar.

101. Orwa . J-A, Van Gerven . A, Roets . E, Hoogmartens . J (2007)

Development and validation of a liquid chromatography method for analysis of Colistin sulphate. *Chromatographia* 2000, vol. 51, n°7-8, pp. 433-436 (17 ref.)

102. Ouali . A (1991)

Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande, page 196, 197. *INRA prod. Anim.* 1991, 4 (3), 195 – 208.

103. Oxoby . M (2002)

Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones, page 3-12. Thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimiques.

104. Pinault . L (1998)

Limites maximales de résidus (LMR), page 1-8. Editions Le Point Vétérinaire 2001.

105. Pouliquen . H et Le Bris . H (2001)

Residues of antibacterial drugs in foodstuff of fish origin: risk assessment, page 676-677. *Revue Méd. Vét.*, 2002, 153, 10, 675-678.

106. Pujol-Dupuy . C (2004)

Accidents alimentaires d'origine bactérienne liés à la consommation de laits et produits laitiers, page 38-39. Thèse de docteur vétérinaire de l'école nationale vétérinaire de Lyon.

107. Puyt . J-D, Guérin-Faublée . V (2006)

Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie. Edition 2006, page 1-27.

108. Reed . L-A, Siewicki . T-C, Shah . J-C (2004)

Pharmacokinetics of oxytétracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, page 12-27. *Aquaculture* 232 (2004) 11 –28.

109. Rod D-C, Bu . L, Bédéchian . F (2001)

La politique de santé de l'union européenne. Lettre d'information n° 2 décembre 2001, page 3-5.

<http://www.europe-ecologie.com/IMG/pdf/doc-34.pdf>. (Consulter le 29-04-2008).

110. Romnee . J-M (2007)

Le contrôle des antibiotiques dans le lait de ferme : hier et aujourd'hui, page 3-63. Journée d'étude –11 mai 2007, Belgique.

http://www.afsca.be/labos/vorming/doc07/2007-05-11_controle_antibiotiques_lait_de_ferme_fr.pdf (Consulter le 20-03-2008).

111. Sachot . E, Puyt . J-D (2001)

Résidus médicamenteux. Les différents calculs du temps d'attente, page 2-5. Point Vétérinaire / N°212 2 2 / Janvier-Février 2001 /. Editions le point vétérinaire 2001.

112. Santé . V, Fernandez . X, Monin . G, Renou . J-P (2001)

Nouvelles méthodes de mesure de la qualité des viandes de volaille, page 248. INRA Unité de Recherches sur la viande, Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle. Comité Interprofessionnel de la Dinde Française, 11 rue Plaisance, 35310 Mordelles.
<http://www.inra.fr/internet/Produits/PA/an2001/tap2001/vs214.pdf>. (Consulter le 21-04-2008).

113. Schneider . M-J, Braden . S-E, Reyes-Herrera . I, Donoghue . D-J (2007)

Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection, page 9-12. Journal of Chromatography B, 846 (2007) 8–13.

114. Scippo . M-L (2008)

Technologie, sécurité et qualité des aliments introduction a la qualité et la sécurité des aliments : aspects chimiques. Contrôle des résidus et des médicaments vétérinaires, page 2-36. Université de Liège, faculté de médecine vétérinaire.
<http://www.adaoa.ulg.ac.be/> (Consulter le 19-01-2001).

115. Scippo . M-L, Maghuin-Rogister . G (2006)

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse. Méthodes biologiques de dépistage, page 125-129. *Ann. Méd. Vét.*, 2006, 150, 125-130

116. Suhren . G, Knappstein . K (2007)

Detection of colistin in spiked and incurred milk samples by LC- and ELISA-technique. *Analytica chimica acta* ISSN 0003-2670 CODEN ACACAM.

117. Wang . Q Liu . Q, Li .J (2004)

Tissue distribution and elimination of oxytétracycline in perch *Lateolabrus janicus* and black seabream (*Sparus macrocephalus*) following oral administration page 32-39. *Aquaculture* 237 (2004) 31–40.

118. Xiaogang . H, Jialiang . P, Yuling . H, Yin . H, Gongke . L (2008)

Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fiber based on molecularly imprinted polymers for trace analysis of tetracyclines in complicated samples, page 98-106. *Journal of Chromatography A*, 1188 (2008) 97–107.

119. Ziane . R (2007)

Physiologie. Chapitre Le muscle et son fonctionnement, page, 4. 1^{ère} édition.
caratome.free.fr/Formations/FCun/Physio5.pdf (Consulter le 02-08-2008).

ANNEXES

Annexe n° 1: surfaces obtenues durant la vérification de la répétabilité de la méthode utilisée pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline.

| Test n° | Série 1 | Série 2 | Série 3 |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 47952 | 48646 | 45997 |
| 2 | 47963 | 43200 | 46329 |
| 3 | 43797 | 41727 | 48879 |
| 4 | 48932 | 44080 | 41555 |
| 5 | 45550 | 48085 | 44253 |
| 6 | 42611 | 44570 | 48879 |

Annexe n° 2 : surfaces obtenues durant la vérification de la répétabilité de la méthode utilisée pour la détection et la quantification des résidus de colistine.

| Test n° | Série 1 | Série 2 | Série 3 |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 541289 | 664093 | 665877 |
| 2 | 533818 | 535572 | 518738 |
| 3 | 667991 | 568143 | 649192 |
| 4 | 686437 | 609237 | 544274 |
| 5 | 588657 | 630820 | 596618 |
| 6 | 464323 | 688445 | 585528 |

Annexe n° 3 : surfaces obtenues durant la vérification de la reproductibilité de la méthode utilisée pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline.

| Test n° | Série 1 | Série 2 | Série 3 |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 40010 | 41829 | 40012 |
| 2 | 41230 | 41030 | 41254 |
| 3 | 41555 | 41447 | 40521 |
| 4 | 42216 | 41241 | 42658 |
| 5 | 42827 | 42151 | 40987 |
| 6 | 42253 | 40245 | 43657 |
| 7 | 43879 | 42141 | 42611 |
| 8 | 41458 | 40141 | 43200 |
| 9 | 40145 | 40154 | 43797 |
| 10 | 43147 | 41412 | 40587 |
| 11 | 42184 | 41441 | 42518 |
| 12 | 41214 | 40555 | 43986 |
| 13 | 41121 | 41417 | 42658 |
| 14 | 43154 | 45142 | 43265 |
| 15 | 42154 | 42554 | 41254 |
| 16 | 41547 | 40218 | 42845 |
| 17 | 44544 | 42754 | 43652 |
| 18 | 40147 | 40741 | 40657 |
| 19 | 41447 | 40254 | 41658 |
| 20 | 41245 | 42512 | 42357 |

Annexe n° 4 : surfaces obtenues durant la vérification de la reproductibilité de la méthode utilisée pour la détection et la quantification des résidus de colistine.

| Test n° | Série n° 1 | Série n° 2 | Série n° 3 |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 415465 | 425927 | 388290 |
| 2 | 621339 | 405621 | 435030 |
| 3 | 449605 | 432348 | 451424 |
| 4 | 431227 | 667991 | 466854 |
| 5 | 499901 | 541269 | 454606 |
| 6 | 462558 | 533818 | 498887 |
| 7 | 455856 | 538657 | 578978 |
| 8 | 509318 | 502250 | 591835 |
| 9 | 487103 | 585528 | 616813 |
| 10 | 500775 | 480004 | 620979 |
| 11 | 553544 | 596613 | 589298 |
| 12 | 594692 | 514274 | 610184 |
| 13 | 531128 | 649192 | 628445 |
| 14 | 629602 | 518738 | 605490 |
| 15 | 629384 | 665677 | 646761 |
| 16 | 630551 | 630820 | 519096 |
| 17 | 605762 | 609237 | 514197 |
| 18 | 623658 | 568143 | 608076 |
| 19 | 589142 | 535572 | 508333 |
| 20 | 612249 | 604093 | 603210 |

Annexe n° 5 : valeur du **t** de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance a 95 %, (Anonyme 1 i, 2007).

| Degré de liberté ($n-1$) | $t_{(0,975)}$ |
|----------------------------|---------------|
| 1 | 12,706 |
| 2 | 4,303 |
| 3 | 3,182 |
| 4 | 2,776 |
| 5 | 2,571 |
| 6 | 2,447 |
| 7 | 2,365 |
| 8 | 2,306 |
| 9 | 2,262 |
| 10 | 2,228 |
| 11 | 2,201 |
| 12 | 2,179 |
| 13 | 2,160 |
| 14 | 2,145 |
| 15 | 2,131 |
| 16 | 2,120 |
| 17 | 2,110 |
| 18 | 2,101 |
| 19 | 2,093 |
| 20 | 2,086 |
| 25 | 2,060 |
| 30 | 2,042 |
| 40 | 2,021 |
| 60 | 2,000 |


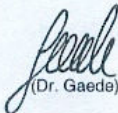


Annexe n° 6 : Flacon contenant 250 mg de standard oxytétracycline.



Annexe n° 7 : Flacon contenant 100 mg de standard colistine.

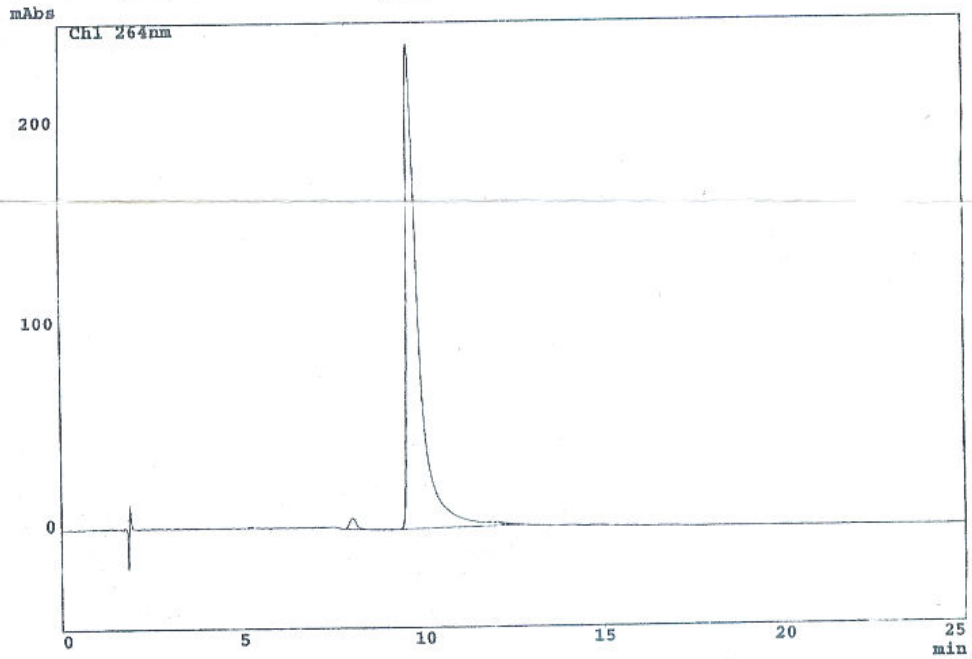
Annexe n° 8 : Prospectus du standard oxytétracycline.

| | |
|--|---|
|  SIGMA-ALDRICH |  |
| Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze Telefon: +49 5137 8238-150 | CERTIFICATE OF ANALYSIS / INSPECTION CERTIFICATE 3.1 acc. to DIN EN 10204 |
| | Seelze, 17.03.2006/746848 Order-no.: Customer-No.: Order-Code: Quantity: Production date: 25.Jan.2005 rec. Retest Date: 25.Jan.2012 |
| Article/Product: 46598 Oxytetracyclin hydrochloride VETANAL | Batch : 5025X |
| Reference Material (RM) | |
| 1. General Information | |
| Formula: C ₂₂ H ₂₅ CLN ₂ O ₉ CAS-No.: [2058-46-0] Usage : Antibiotic | Molar mass: 496.9 g/Mole Recomm. storage temp.: roomtemp. |
| The estimated relative error of a single measurement of the assay can be expected to be ± 0.5 % (confidence level 95 %, n=6). | |
| 2. Batch Analysis | |
| Identity (NMR) | complying |
| Assay (HPLC) | 98.1 area % |
| Melting range (decomp.) | 201.0-204.0 °C |
| Date of Analysis | 22.Feb.2005 |
| 3. Advice and Remarks | |
| <ul style="list-style-type: none">• The minimum shelf life is based on the current knowledge and holds only for proper storage conditions in the originally closed flasks/ packages.• Whenever the container is opened for removal of aliquot portions of the substance, the person handling the substance must assure, that the integrity of the substance is maintained and proper records of all its handlings are kept. Special care has to be taken to avoid any contamination or adulteration of the substance.• We herewith confirm that the delivery is effected according to the technical delivery conditions agreed.• The batch from which we delivered, showed the above-mentioned values.• Particular properties of the products or the suitability for a particular area of application are not assured.• We guarantee a proper quality within our General Conditions of Sales. | |
| Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH Quality Assurance |  (Dr. Gaede) Works Inspector |

Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH
Analytical Department

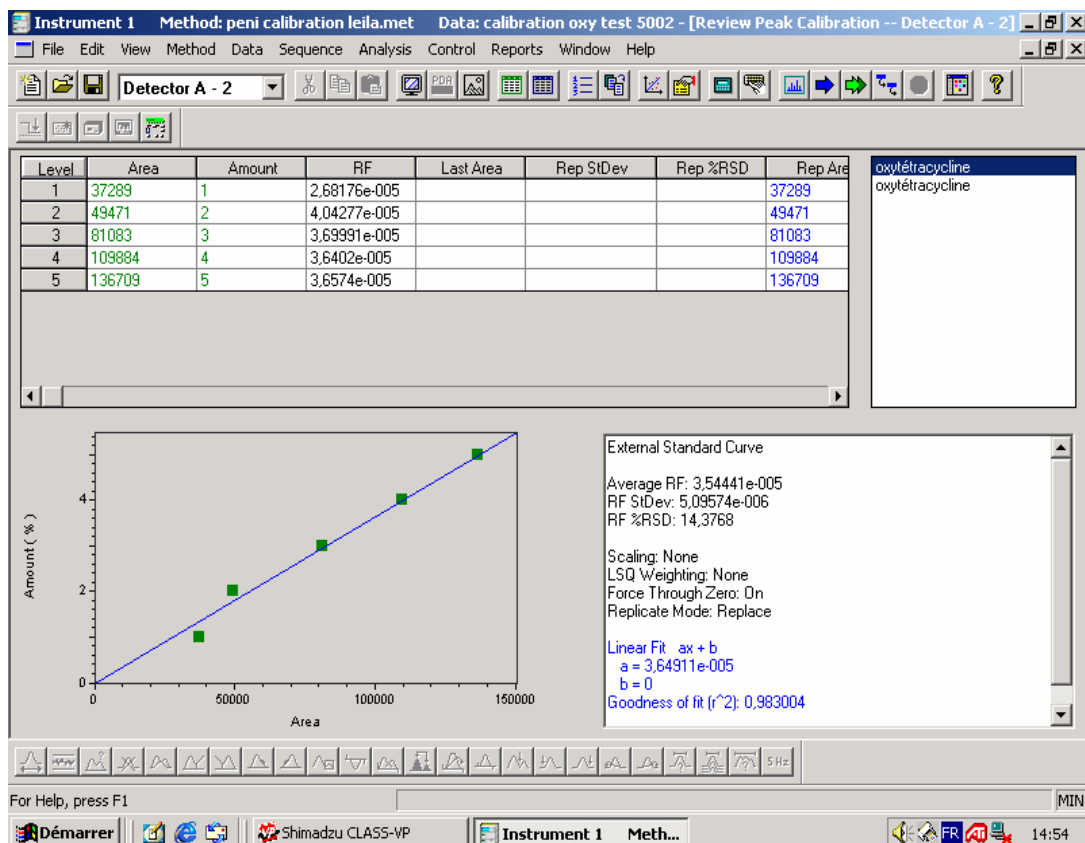
HPLC-method

Article : Oxytetracyclin
 Article-No : 46598
 Batch : 5025X
 Column : L=250mm, ID=4,6mm; Supelcosil LC-DP 5um
 Eluent A : Acetonitrile
 Eluent B : Water + 0,1% Phosphoric acid
 Gradient :
 time %A %B
 5min 10 80
 15min 60 40
 25min 60 40
 Flow : 2,0ml/min
 Detector : UV-264nm
 Injection-Volume : 10ul
 Sample-preparation : 0,4mg/ml
 Linearity : checked
 Evaluation : Normalisation (uncorrected)
 Operator : Schowe

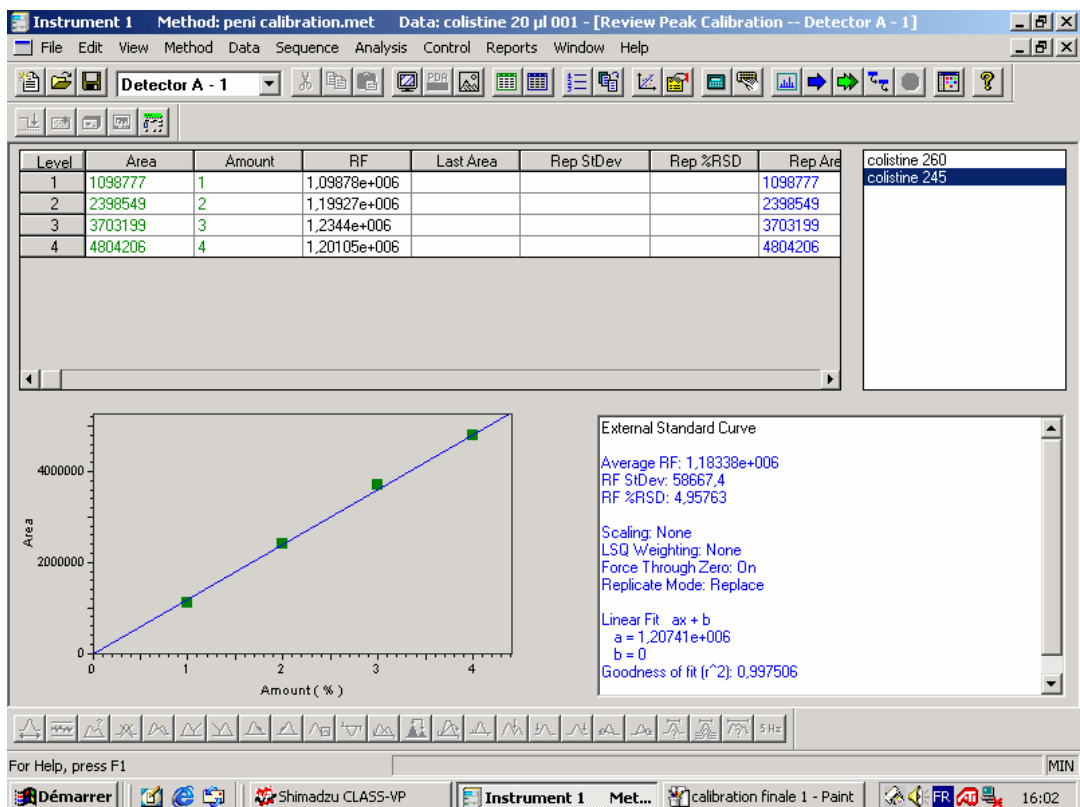


*** Peak Report ***

| TIME | AREA | HEIGHT | IDNO | CONC | NAME |
|--------|---------|--------|------|----------|------|
| 5.192 | 4365 | 571 | | 0.0766 | |
| 7.995 | 67025 | 5255 | | 1.1769 | |
| 9.616 | 5588520 | 240827 | | 98.1302 | |
| 11.961 | 18180 | 837 | | 0.3192 | |
| 14.191 | 7884 | 311 | | 0.1384 | |
| 14.833 | 9030 | 846 | | 0.1586 | |
| ----- | | | | | |
| | 5695004 | 248147 | | 100.0000 | |

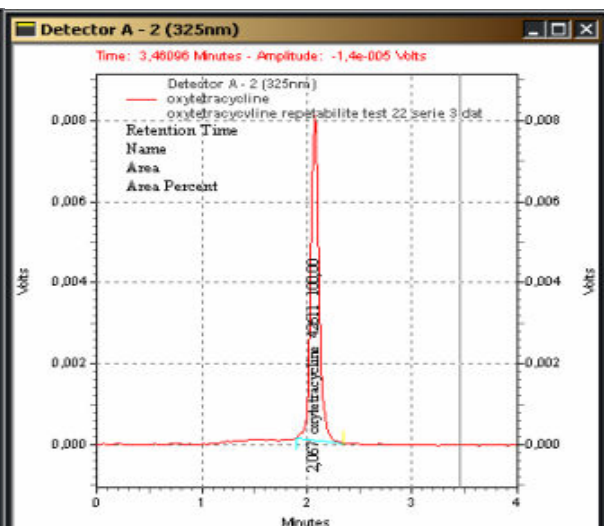
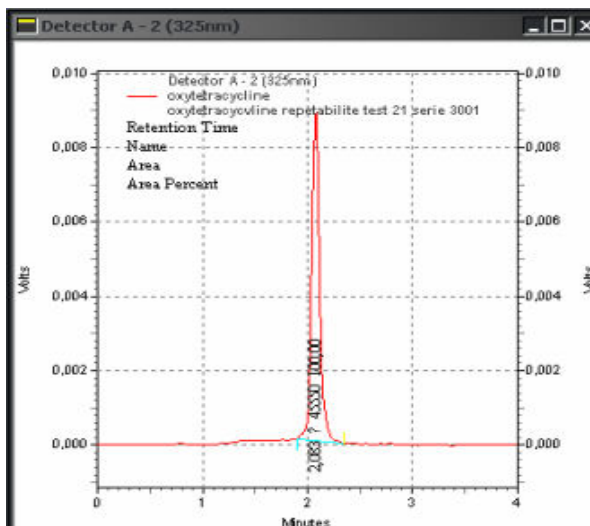
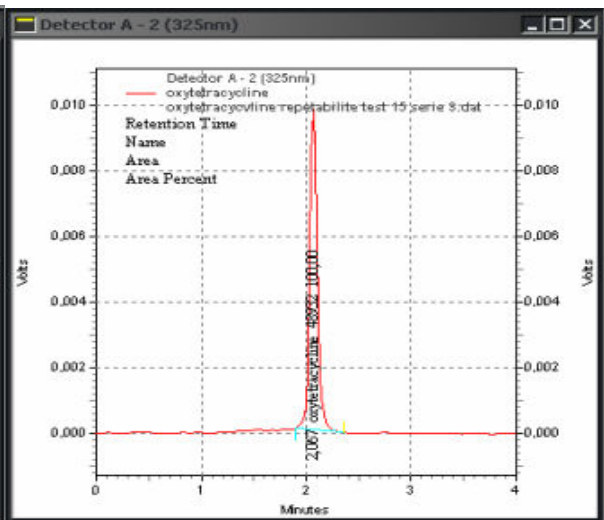
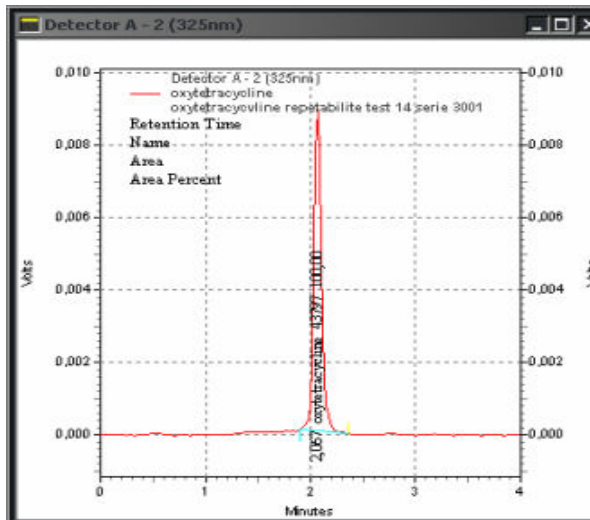
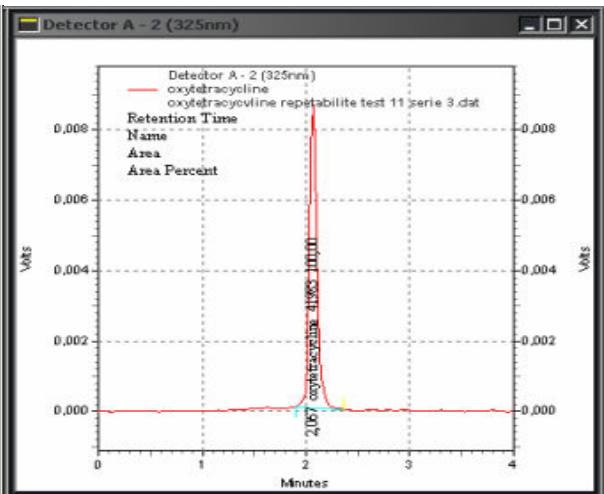
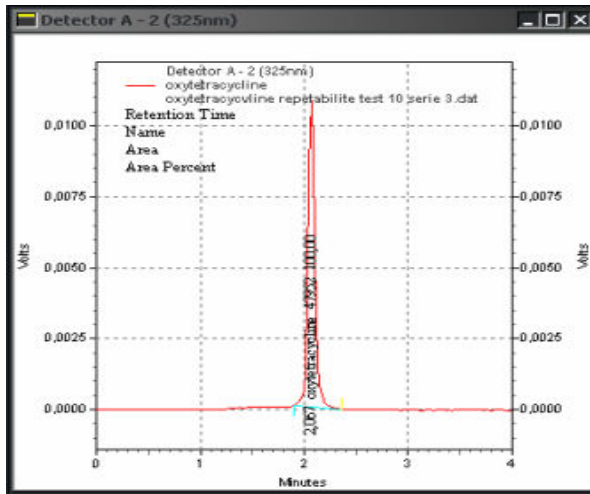


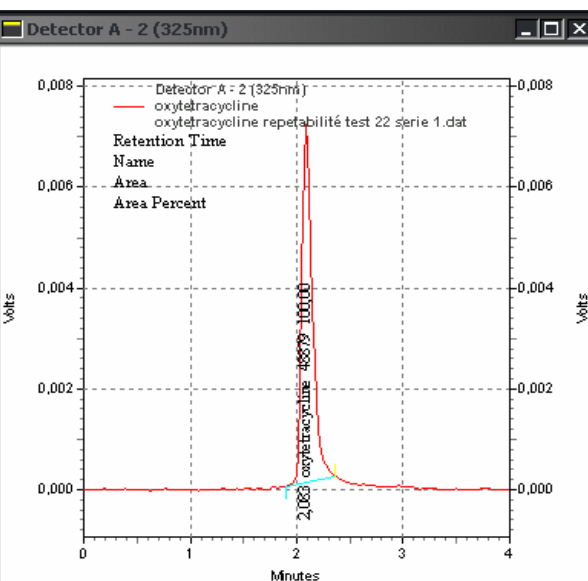
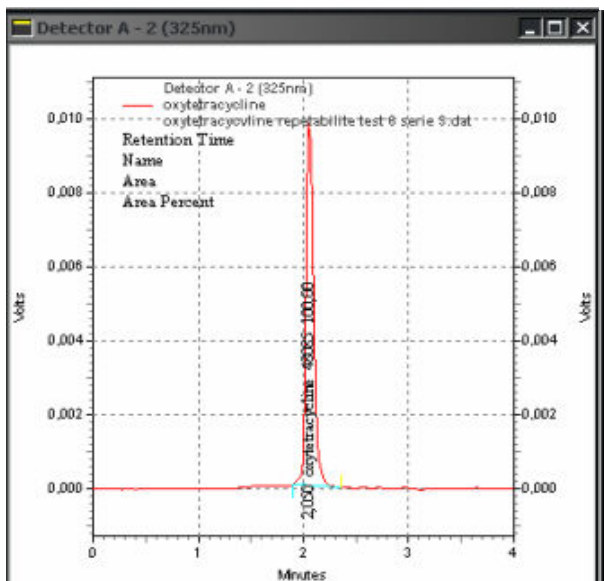
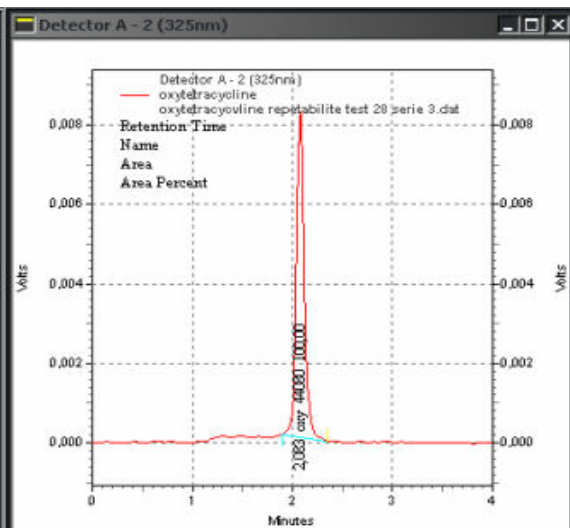
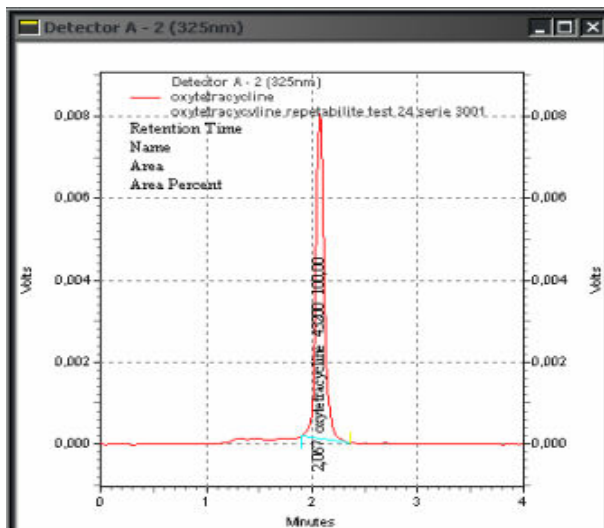
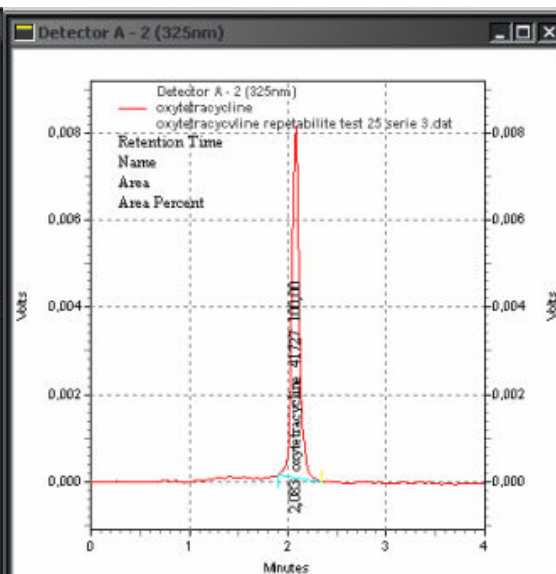
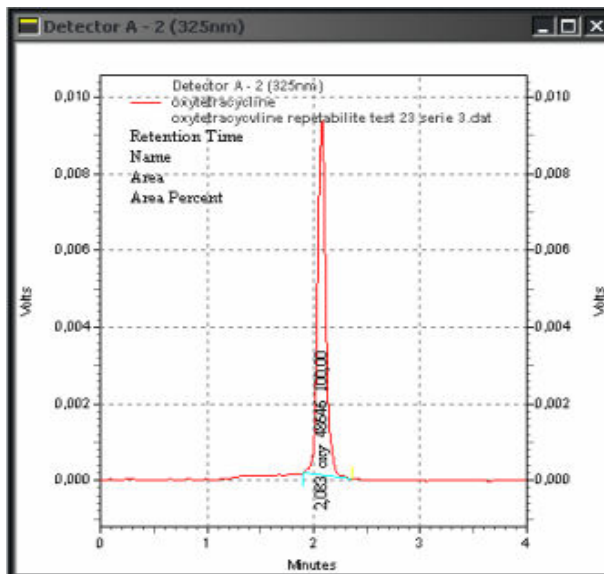
Annexe n° 9 : Courbe détalonnage du standard oxytétracycline.

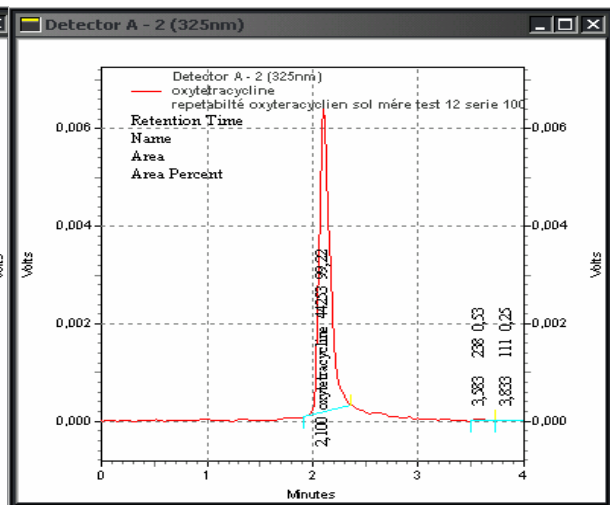
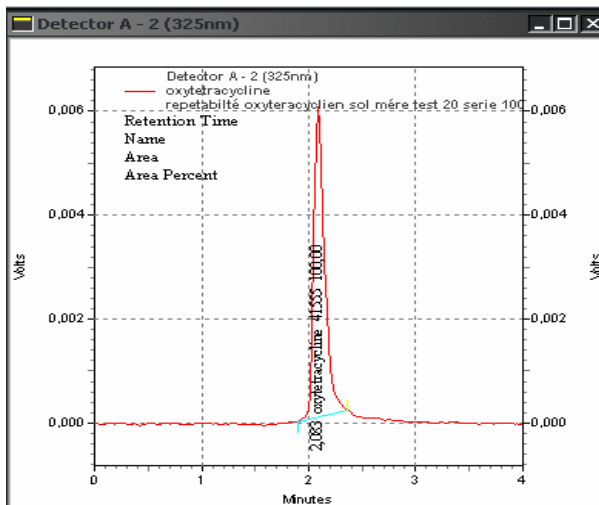
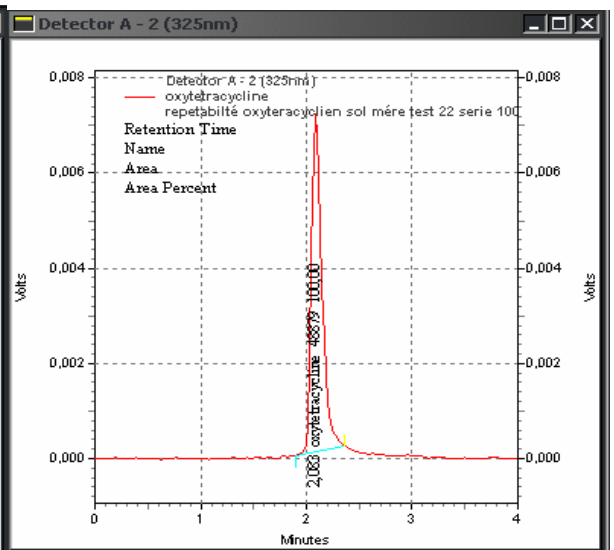
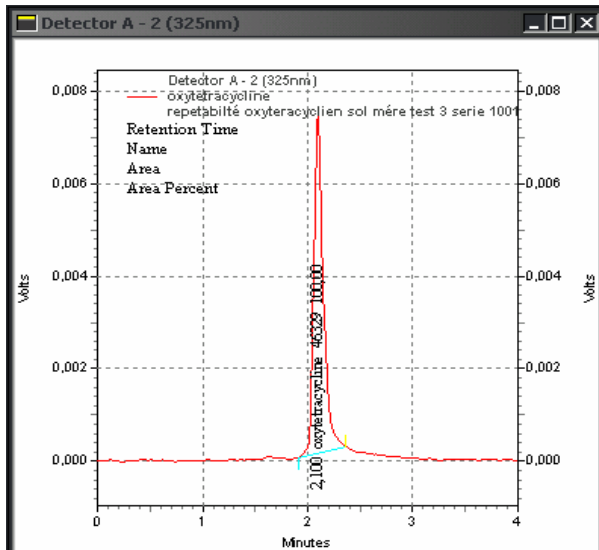
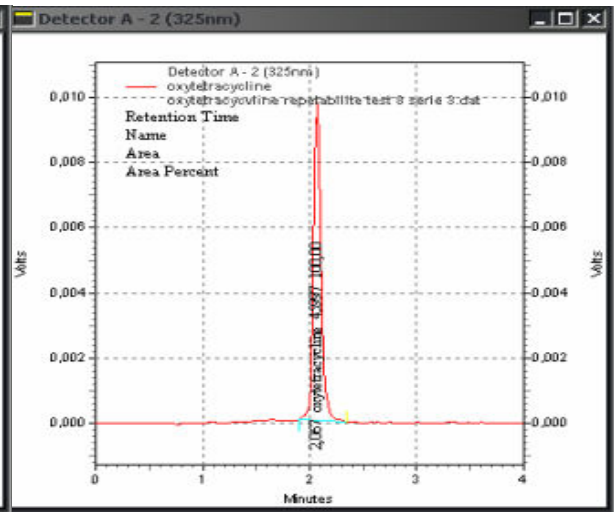
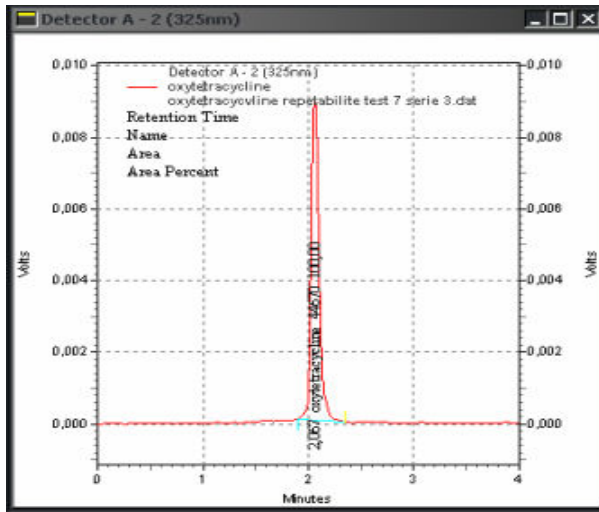


Annexe n° 10 : Courbe détalonnage du standard colistine.

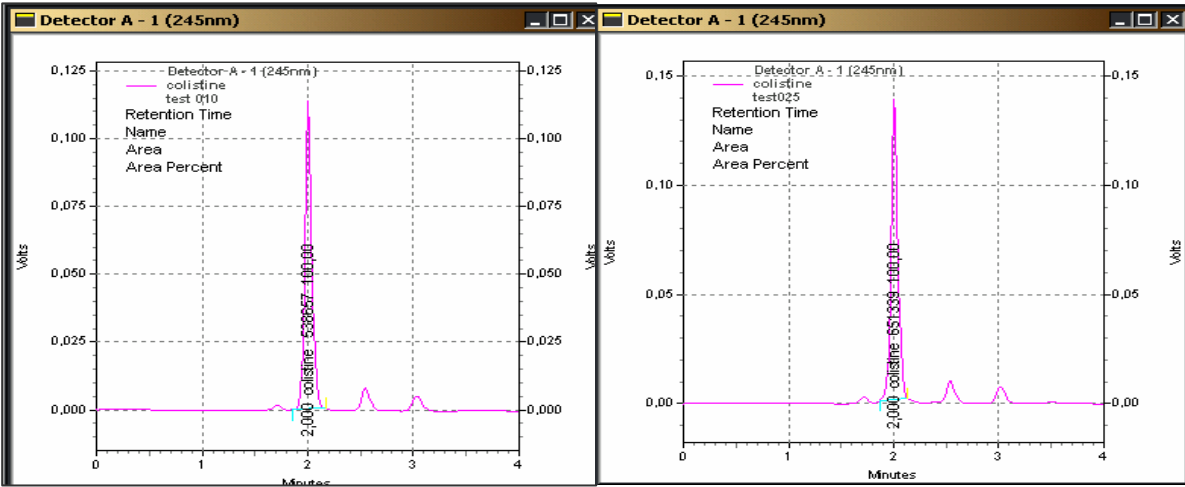
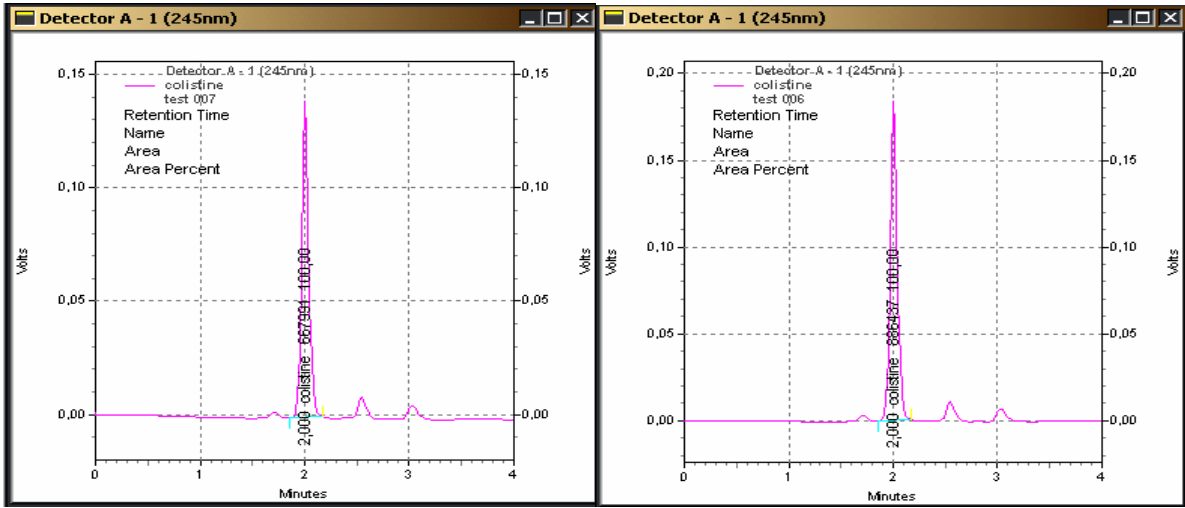
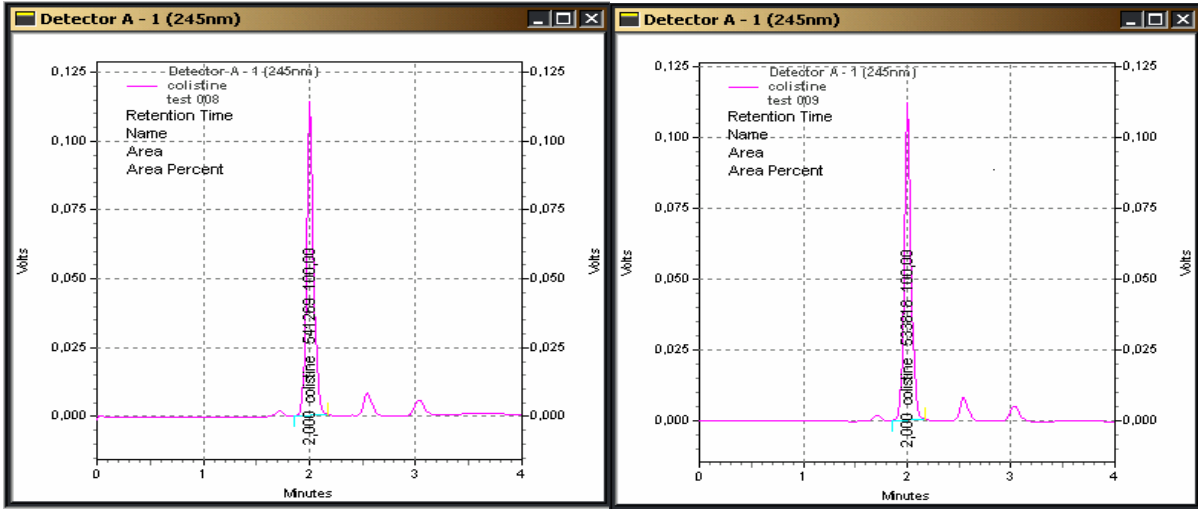
Annexe 11 : Quelques chromatogrammes obtenus durant la vérification de la fidélité de la méthode servant au dosage des résidus d'oxytétracycline.

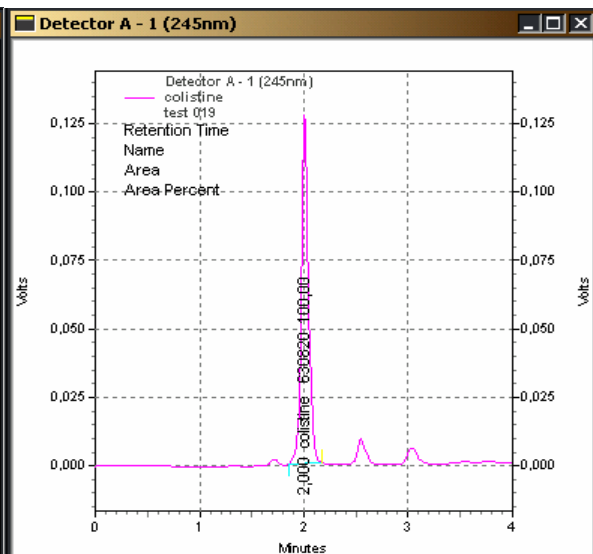
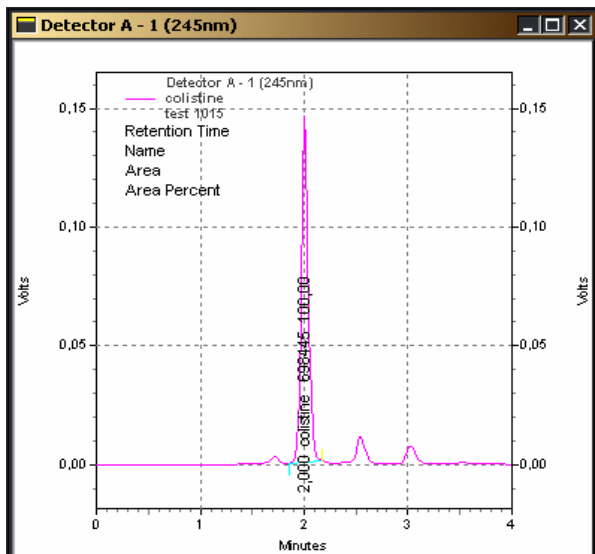
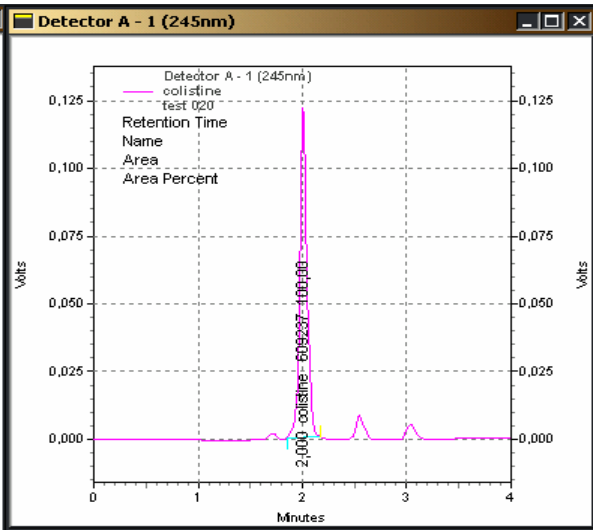
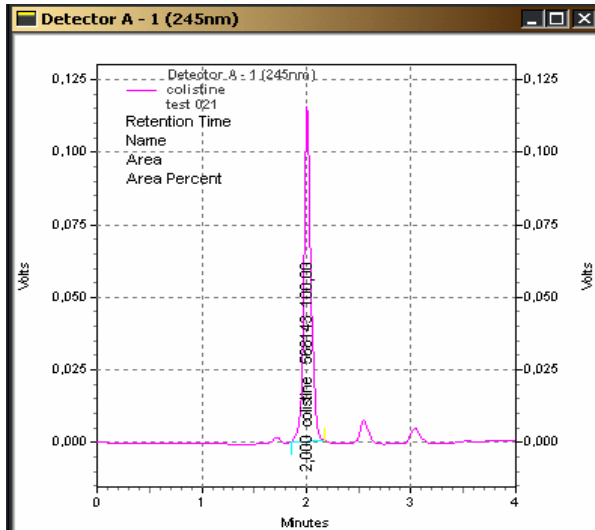
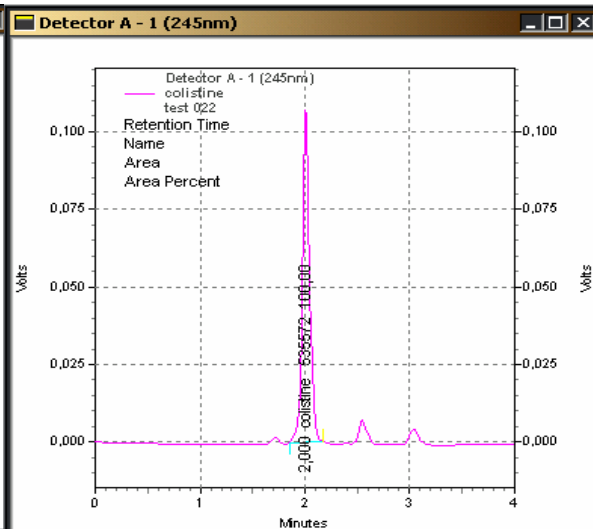
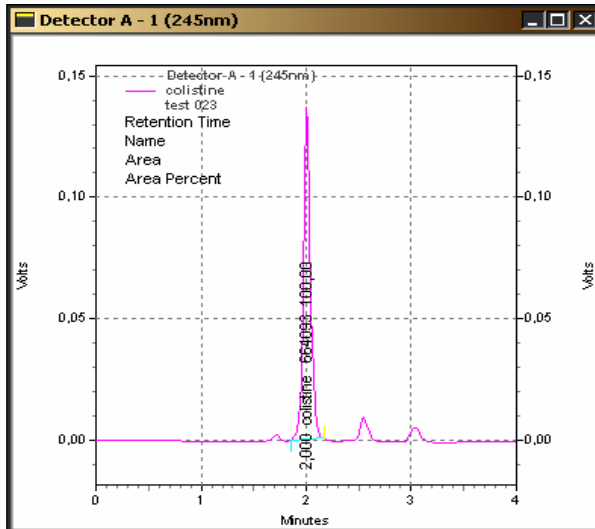


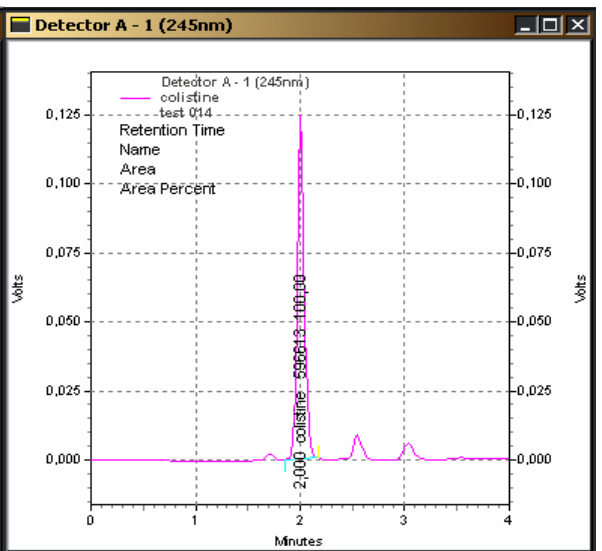
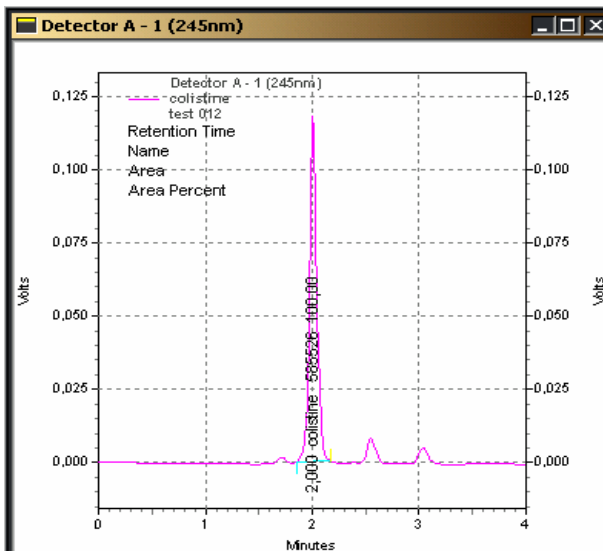
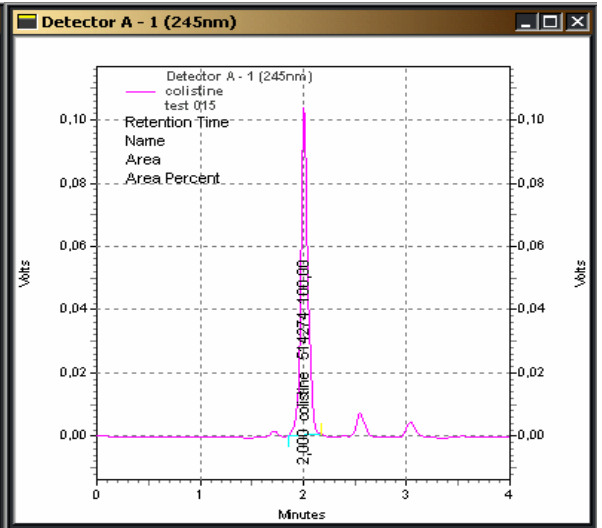
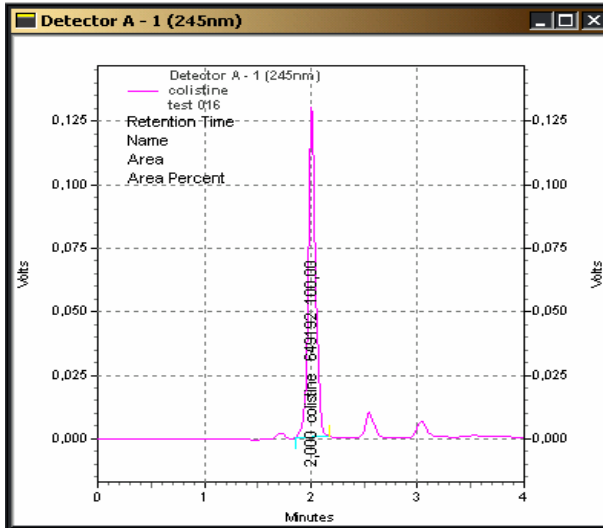
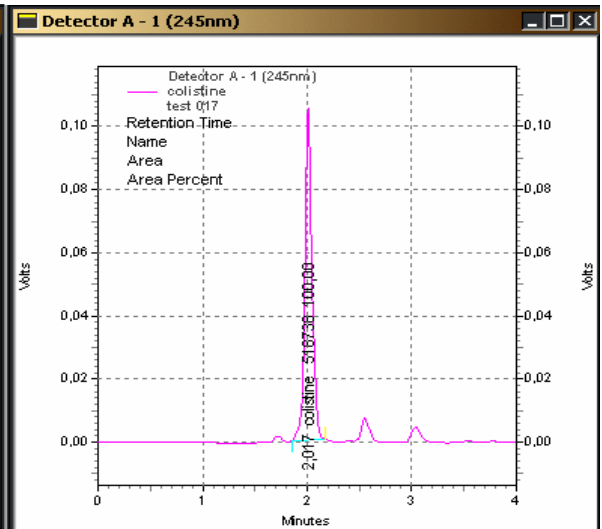
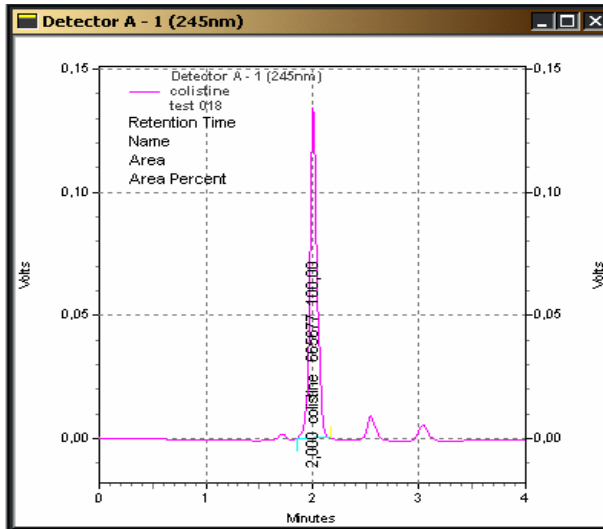




Annexe 12 : Quelques chromatogrammes obtenus durant la vérification de la fidélité de la méthode servant au dosage des résidus de colistine.







Résumé :

L'auteur a procédé à l'optimisation de différents paramètres d'analyse chromatographique (HPLC) pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline et de la colistine dans le muscle du poulet de chair.

Les investigations expérimentales effectuées ont permis de retenir :

Pour l'oxytétracycline :

- une colonne analytique en phase inverse type ODS, C18.
- une phase mobile composé de 100% d'acétonitrile.
- une longueur d'onde de 325 nm et 344 nm.
- un débit de 1.5 ml/mn
- un volume injecté de 11 µl
- une durée d'analyse de 8 mn

Pour la colistine :

- une phase stationnaire en phase inverse type ODS, C18
- une phase mobile composé de 100% de méthanolune longueur d'onde de 245 nm et 260 nm
- un débit de 2 ml/mn
- un volume injecté de 10 µl
- une durée d'analyse de 8 mn

Mots clés : viande blanche, antibiotiques, résidus, HPLC, santé publique.

ملخص:

لقد عمل الكاتب في هذا البحث العلمي على تحسين الشروط التحليلية لجهاز التحليل الغروماتوغرافي ذو الضغط العالي من اجل استشعار و تقدير كمية ترسبات مضادين حيويين هما الاوكسي تتراسكلين و الكوليسيتين في عضلة دجاج اللحم. سمحت البحوث التجريبية بضبط :

بالنسبة للاوكسي تتراسكلين

- عمود تحليلي ذو مرحلة المنعكسة .
- مرحلة متحركة مكونة من 100% اسيتونيتريل.
- طول موجة الامتصاص هو 325 و 344 نانومتر.
- شدة تدفق المرحلة المتحركة هو 1.5 ميلي لتر في الدقيقة الواحدة
- الحجم المحقون هو 11 ميكروليتر.
- مدة التحليل هي 8 دقائق.

بالنسبة للكوليسيتين

- عمود تحليلي ذو المرحلة المنعكسة.
- مرحلة متحركة مكونة من 100% ميثانول.
- طول موجة الامتصاص هو 245 و 260 نانومتر.
- شدة تدفق المرحلة المتحركة هو 2 ميلي لتر في الدقيقة الواحدة
- الحجم المحقون هو 10 ميكروليتر.
- مدة التحليل هي 8 دقائق.

الكلمات المفتاحية :

لحم بيضاء, المضادات الحيوية, الترسبات, جهاز التحليل الغروماتوغرافي ذو الضغط العالي, الصحة العمومية.

Abstract :

An analytical method to detecting and quantify antibiotic residues of oxytetracyclin and colistin in muscle of poultry of meat by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed.

The experimental investigations are conducting to the following conditions:

For oxytetracyclin the work conditions are:

- the column used was VP-ODS C18
- the mobile phase was made up of acetonitrile
- the wave length is 325 and 344 nm
- the flow rate of mobile phase was 1.5 ml/min
- the injection volume was 11 µl
- the run time was 8 min

For colistin the work conditions are:

- the column used was VP-ODS C18
- the mobile phase was made up of methanol
- the wave length used is 260 and 245 nm
- the flow rate of mobile phase was 2 ml/mi
- the injection volume was 10 µl
- the run time was 8 min

Key Words: white meat, antibiotics, residues, HPLC, public health