



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MENTOURI DE CONSTANTINE –

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

**DEPARTEMENT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES
EL KHROUB**

N° d'ordre : 034/MAG/2009

Série : 006/SV/2009

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 PARAMETRES DE DETECTION ET DE
QUANTIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE
HAUTE PERFORMANCE (HPLC) RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES
DANS LA VIANDE**

Présenté par : M^{elle} **HADEF LEILA**

Jury de soutenance

Président : **BENAZZOUZ. H**

Maître de conférence U.M.C

Rapporteur : **EL HADEF EL OKKI. S**

Professeur U.M.C

Examineur: **HARHOURA. K.**

Docteur 3^{ème} cycle E.N.V. Alger

Examineur : **BENSEGUENI. A.**

Maître de conférence U.M.C

ANNEE UNIVERSITAIRE 2008-2009

Remerciement

Je remercie Dieu le clément de m'avoir aidé durant toute ma scolarité et sur lequel je compte tous pour atteindre mon but.

En premier lieu, j'exprime toute ma gratitude à mon encadreur le professeur. EL HADEF EL OKKI SAADOUNE pour avoir accepté de diriger mon travail, pour son dévouement, ses précieux conseils, ses encouragements et sa patience.

Je tiens à remercier aussi monsieur MEKROUD ABDESSALEM, chef de département des Science Vétérinaires

Mes vifs remerciements vont plus particulièrement à monsieur BELKHEIRI MABROUK, chargée de cours à l'institut vétérinaire de BATNA pour son aide précieux, ses conseils.

Mes vifs remerciements également a Mr CHIBAT EL HADI, chargée de cours à l'institut vétérinaire D'EL KHROUB pour son aide précieux,

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury :

Mr BEN AZZOUZ Hamdani, pour avoir bien voulu présider mon jury.

Dr AISSI Miriem, pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Mr BEN SEGUNI Adlène, pour avoir bien voulu examiner ce travail

Je tiens également à remercier tous les enseignants de l'institut D'EL KHROUB et à tous ceux qui m'a rendu service de près ou de loin

Dédicace

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

Je dédie ce modeste travail à :

Mes frères : Nourddine, Walid et Hicham.

Mes sœurs : Malika, elaatra et son mari Alhadi. mina et abir

A mes amis filles et garçons ; surtout Messouda , Zineb, Mbarka , Rafika,

Nawal, fatma, ilham, Naboul, Haiate, Djamilla, Naima, Ilham, et les filles de 5eme années

A tous les étudiants de ma promotion, NAKIB Lydia, BOULTIF Latifa, AIADI Warda,

BENDIAF Houda, CHEBIRA Bassem, ZEGILLET Nour Eddine , HAMAD Brahim,

BOUMEHRES Ali, BOUBZARI Mohamed Taher.

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

INTRODUCTION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: LA VIANDE

1. GENERALITES SUR LA VIANDE	1
1.1. DEFINITION DE LA VIANDE	1
1.2. PLACE DE LA VIANDE DANS LA RATION ALIMENTAIRE.....	2
1.2.1. LA VALEUR NUTRITIVE DE LA VIANDE	2
1.2.1.1. LA VALEUR ENERGITIQUE.....	2
1.2.1.2. LA VALEUR PROTIDIQUE	2
1.3. LA TRANSFORMATION DU MUSCLE EN VIANDE.....	3
1.3.1. LES DIFFERENTES PHASES.....	3
1.3.1.1. LA PREMIERE PHASE (PANTELANTE)	3
1.3.1.2. LA DEUXIEME PHASE (RIGIDITE CADAVERIQUE)	3
1.3.1.3. LA TROISIEME PHASE (PHASE DE MATURATION)	4
1.3.1.4. LA PHASE DE PUTREFACTION.....	4
1.3.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE MATURATION	4
2. LA FILIERE DE VIANDES ROUGES EN ALGERIE	5

CHAPITRE II : LES ANTIBIOTIQUES

1. DEFINITIONS	8
2. LES GRANDES FAMILLES DES ANTIBIOTIQUES	8
2.1. LES β LACTAMINES.....	9
2.1.1. GENERALITES.....	9
2.1.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	9
2.2. LES AMINOSIDES OU AMINOGLYCOSIDES	10
2.2.1. GENERALITES.....	10
2.2.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	10
2.3. PHENICOLES, CHLORAMPHENICOL ET THIAMPHENICOL.....	11
2.3.1. GENERALITES	11
2.3.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	11
2.4. LES TETRACYCLINES	11
2.4.1. GENERALITES.....	11
2.4.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	12
2.5. LES POLYPEPTIDES	12
2.5.1. GENERALITES.....	12
2.5.2 UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	12
2.6. MACROLIDES, LINCOSANIDES, SYNERGISTINES	12
2.6.1. GENERALITES.....	12
2.6.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	13
2.7. LES QUINOLONES	13
2.7.1. GENERALITES.....	13
2.7.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	13

2.8. SULFAMIDES ET ASSOCIATIONS SULFAMIDEES	14
2.8.1 GENERALITES	14
2.8.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE	14
2.9. DIVERS	14
3. LE DEVENIR DES ANTIBIOTIQUE DANS L'ORGANISME	14
3.1. L'ABSORPTION.....	14
3.1.1. ABSORPTION DIGESTIVE.....	15
3.1.2. ABSORPTION PARENTERALE	15
3.2. LA DISTRUBITION.....	15
3.3 LA BIOTRANSFORMATION.....	16
3.4 ELIMINATION	16
4. JUSTIFICATION DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES EN ELEVAGE	16
4.1. LES ANTIBIOTIQUES A USAGE THERAPEUTIQUE	17
4.2. LES ANTIBIOTIQUES A USAGE ZOOTECHNIQUE.....	17
5. LES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES UTILISES EN ALGERIE	17
5.1. IDENTIFICATION DES RAISONS POUSSANT À TRAITER.....	19

CHAPITRE III : LES RESIDUS D'ANTIBOTIQUES

1. DEFINITION	20
2. LE DELAI D' ATTENTE	20
2.1. DETERMINATION DE TEMPS D' ATTENTE	21
2.2. SEUIL DE TOXICITE ET DE TOLERANCE	21
2.3. COMMENT EST ETABLI LE TEMPS D' ATTENTE	22
3. LA LIMITE MAXIMALE DE RESIDUS (LMR).....	22
3.1. La LMR TOXICOLOGIQUE	23
3.2. La LMR BACTERIOLOGIQUE	23
4. LES PROPLEMES POSENT PAR LA PRESENCE DES RESIDUS D' ANTIBIUOTIQUE DANS LES VIANDES ROUGES	23
4.1. EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES VIANDES	23
4.2. DENATURATION DES RESIDUS PRESENTS DANS LES VIANDES	24
4.3. RISQUE D'ORDRE TECHNOLOGIQUE.....	24
4.4. RISQUE ALLERGENE.....	25
4.5. LA TOXICITE	25
4.6. INFLUENCE SUR LA FLORE INTESTINALE	25
4.7. L' ANTIBIORESISTANCE	26
4.7.1. ORIGINES DE LA RESISTANCE	27
5. LA CONDUITE A TENIR DEVANT UN ECHANTILLON CONTROLE POSITIF	29

CHAPITRE IV: LES METHODES DE DETECTION DES ANTIBIOTIQUES

1. STRATEGIE D'ANALYSE DES RESIDUS DES ANTIBIOTIQUES.....	30
1.1. PHASE 1: LE PRE- SCREENING (TEST DE PREMIER DEPISTAGE)	30
1.1.1 .TEST RENAL.....	31
1.1.2. TEST EUROPEEN A 4 PLAQUES.....	31
1.1.3. PREMI TEST	33
1.2. PHASE 2: LE SCREENING (DEPISTAGE SELECTIF)	35
1.2.1. LES IMMUNOESSAIS	35
1.2.1.1. LES METHODES RADIO-IMMUNOLOGIQUES (RIA)	35
1.2.1.2. RECEPTEURS ESSAIS (RRA).....	36
1.2.1.3 .TEST ELISA.....	36
1.2.2. TESTS BIOCHIMIQUES.....	37
1.2.2.1. BETASTAR	37
1.3. PHASE 3: LA CONFIRMATION ET L'IDENTIFICATION	38
1.3.1. LA SPECTROMETRIE DE MASSE	38
1.3.2. LA SPECTROMETRIE DE UV	39
1.4. PHASE 4: LA QUANTIFICATION DE LA TENEUR EN RESIDUS	39

CHAPITRE V: LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

1. HISTORIQUE.....	41
2. DEFINITION	43
3. NATURE DES PHASES	43
3.1. PHASE FIXE	43
3.2. PHASE MOBILE.....	44
4. BUTS DE LA CHROMATOGRAPHIE.....	44
4.1. OBJECTIF ANALYTIQUE.....	44
4.2. OBJECTIF PREPARATIF.....	44
5. LES TYPES DE CHROMATOGRAPHIES.....	45
5.1. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	45
5.2. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	45
5.3. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE OUVERTE.....	46
5.4. LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION	46
5.5. LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS	47
5.6. LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	47
5.7. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	49
5.7.1. DESCRIPTION.....	49
5.7.2. LES DOMAINES D'APPLICATION	50
5.7.3. L'APPAREILLAGE.....	51
5.7.3.1. UN RESERVOIR DE SOLVANT (ELUENT).....	51
5.7.3.2. LA POMPE	51
5.7.3.3. VANNE D'INJECTION	52
5.7.3.4. LA COLONNE	53
5.7.3.5. LA PHASE STATIONNAIRE.....	53
5.7.3.5.1. LA PHASE NORMALE:.....	53
5.7.3.5.2.LA PHASE INVERSE.....	54

5.7.3.6. LA PHASE MOBILE.....	54
5.7.3.7. DETECTEURS	54
5.7.3.7.1. DETECTEUR UV- VISIBLE	55
5.7.3.7.1. DETECTEUR A INDICE DE REFRACTION.....	55
5.3.7.7. ENREGISTREURS	56

PARTIE EXPERIMENTALE

1. MATERIELS ET METHODES	57
1.1. MATERIELS UTILISES	57
1.1.1. L'HPLC (CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE).....	57
1.1.1.1. Appareil HPLC.....	57
1.1.1.2. Le dispositif de filtration	59
1.1.2. L'ORDINATEUR	60
1.1.3. REFRIGERATEUR	60
1.1.4. BALANCE ANALYTIQUE	60
1.1.5. ULTRA SON	61
1.1.6. PAPIERS FILTRES	61
1.1.7. MACRO PIPETTES	62
1.1.8. FLACONS STERILES EN PLASTIQUE	62
1.2. PRODUITS CHIMIQUES ET STANDARDS	63
1.2.1. CONSTITUANTS DE LA PHASE MOBILE	63
1.2.2. STANDARDS	63
1.3. ECHANTILLONAGE.....	64
1.3.1. PREPARATION DES SOLUTIONS MERES ET DES DILUTIONS	64
1.4. PROTOCOLE GENERALE D'ANALYSE	64
1.4.1. REGLAGE DE L'APPAREILLAGE.....	65
1.4.2. FILTRATION DES CONSTITUANT DE LA PHASE MOBILE.....	65
1.4.3. OPTIMISATION DES PARAMETRES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES RESIDUS DE D'OXYTETRACYCLINE ET DE PENICILLINE G.....	65
1.4.4. TESTS DE NETTOYAGES	65
1.5. EXPRESSION DES RESULTATS	66
2. RESULTATS ET DISCUSSION	67
2.1. REGLAGE DE L'APPAREILLAGE	67
2.2. FILTRATION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA PHASE MOBILE	68
2.3. ESSAIS D'OPTIMISATIONS DES PARAMETRES DE DETECTIONS ET DE QUANTIFICATIONS DES STANDART D'OXYTETRACYCLINE ET DE PENICILINE G PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC).....	68
2.3.1. L'OXYTETRACYCLINE	68
2.3.1.1. L'OPTIMISATION PROPROMENDITE	68
2.3.1.1.1. PHASE STATIONNAIRE.....	70
2.3.1.1.2. LA PHASE MOBILE.....	70
2.3.1.1.3. VOLUME INJECTE.....	71
2.3.1.1.4. DEBIT	73

2.3.1.1.5. SPECTRE D'ABSORPTION	74
2.3.1.1.6. LE DILUANT	75
2.3.1.2. TESTS DE NETTOYAGES	77
2.3.1.3. ANALYSE STATISTIQUE.....	77
2.3.1.3.1. LA REPETABILITE.....	77
2.3.1.3.2. REPRODUCTIBILITE	78
2.3.1.3.3. L'ETABLISSEMENT D'UNE COURBE DE CALIBRATION.....	79
2.3.1.3.4. LE CALCUL DU COEFFICIENT LINEAIRE D'OXYTETRACYCLINE.	80
2.3.2. PENICILLINE G.....	81
2.3.2.1. L'OPTIMISATION PROPROMENDITE	81
2.3.2.1.1. PHASE STATIONNAIRE.....	81
2.3.2.1.2. PHASE MOBILE.....	81
2.3.2.1.3. VOLUME INJECTE.....	83
2.3.2.1.4. DEBIT	84
2.3.2.1.5. SPECTRE D'ABSORPTION	85
2.3.2.1.6. LE DILUANT	86
2.3.2.2. ANALYSE STATISTIQUE.....	88
2.3.2.2.1. LA REPETABILITE.....	88
2.3.2.2.2. LA REPRODUCTIBILITE.....	88
2.3.2.2.3. L'ETABLISSEMENT D'UNE COURBE DE CALIBRATION POUR LA PENICILLINE G.....	89
2.3.2.2.4. LE CALCUL DU COEFFICIENT LINEAIRE DE PENICILLINE G.....	90
2.4. LES PARAMETRES RETENUS	90

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Partie bibliographique		
Tableau n°	Titre	Page
01	Structure du cheptel des ruminants en Algérie en 2002	5
02	Évolution de la production et des disponibilités en viandes rouges	5
03	Evolution des importations en viandes rouges réfrigérés et congelées	6
04	Les principaux antibiotiques utilisés en Algérie	18
05	Les temps d'attente des principaux antibiotiques vétérinaires utilisés en Algérie	22
06	Sensibilités des antibiotiques à la chaleur	24
07	Résistance des bactéries aux antibiotiques	28
08	Présentation de la méthode des 4 boîtes utilisée pour le contrôle officiel	32
09	Seuils de détection du Premi®Test	34
10	Les différents types des chromatographies	43
11	Principaux solvants en HPLC	51
Partie expérimentale		

12	Conditions d'analyse du mélange PHYWEE utilisé pour régler l'appareillage.	67
13	Les conditions d'analyse préconisée par le fournisseur du standard oxytétracycline	69
14	Les conditions d'analyse pour l'optimisation de la phase mobile	70
15	Les conditions d'analyse pour l'optimisation du volume injecté	72
16	Les conditions d'analyse pour l'optimisation du débit	73
17	Les conditions d'analyse pour l'optimisation du spectre d'absorption	74
18	Les conditions d'analyse pour l'optimisation du débit	76
19	l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% pour la vérification de la répétabilité	78
20	l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% pour la vérification de la reproductibilité.	79
21	Dilutions issus de la solution mère d'oxytétracycline avec les surfaces correspondants.	79
22	Conditions d'analyse préconisées par le fournisseur pénicilline G	81
23	Conditions d'analyse pour l'optimisation de la phase mobile de pénicilline G	82
24	conditions d'analyse pour l'optimisation du volume injecté de pénicilline G.	83
25	Conditions d'analyse pour l'optimisation du débit de pénicilline G.	84
26	Conditions d'analyse pour l'optimisation du spectre d'absorption de pénicilline G.	85
27	Conditions d'analyse pour l'optimisation du diluant de pénicilline G	87
28	L'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% pour la vérification de la répétabilité de la pénicilline G	88
29	L'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% pour la vérification de la répétabilité de la pénicilline G	89
30	Dilutions issus de la solution mère de pénicilline G avec les surfaces correspondants	89

31	Les paramètres à retenir pour la détection et la quantification des résidus d' oxytetracycline	90
32	Les Paramètres à retenir pour la détection et la quantification de la pénicilline G	91

Liste des figures

Partie bibliographie		
Figure n°	Titre	Page
01	Constituants du sarcomère	3
02	Représentation schématique du muscle	4
03	Représentation schématique d'une molécule de myosine	5
04	Représentation schématique d'une molécule de myosine	5
05	Le Tissu conjonctif	6
06	Mécanisme d'acquisition de résistance	35
07	Test rénal	38
08	Test européen a 4 plaques	39
09	Plage de couleurs de Premi®Test	40
10	Equation de base des dosages immunochimiques par compétition	42
11	Principe a) du RIA – b) du RRA	43
12	Principe c) du Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	44
13	Principe de. BETA -STAR	45
14	Principe de la spectrométrie de masse	46
15	Stratégie analytique	48
16	Expérience inspirée de celle de Tswett	49
17	Chromatogramme des pigments d'une feuille d'épinard	50
18	Chromatographie sur couche mince	53
19	Chromatographe à gaz	54
20	Schéma du tamisage moléculaire	55
21	Le principe de la chromatographie d'affinité	56

22	Différentes techniques chromatographiques	56
23	Chromatographe HPLC	58
24	Schéma d'une pompe en HPLC	60
25	Schéma d'un injecteur à boucle externe	61
26	Principe du détecteur UV	64
27	Trajet optique détecteur du IR	65
Partie experimental		
28	Appareil HPLC	67
29	La seringue d'injection	69
30	Le dispositif de filtration	70
31	Le bain l'ultra son	71
32	Les papiers filtres	72
33	Macro pipette digitale	72
34	Chromatogrammes obtenus par les standards PHYWEE	77
35	Chromatogramme obtenu en appliquant les paramètres d'analyse recommandés par le fournisseur du standard oxytétracycline	80
36	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation de la phase mobile	81
37	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du volume injecte	83
38	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du débit	84
39	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du Spectre d'absorption	85
40	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du diluant	87
41	Deux exemples de chromatogramme enregistré durant les tests de nettoyage	88
42	Courbe de calibration d'oxytétracycline	91

43	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation de la phase mobile	93
44	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du volume injecté	95
45	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du débit	96
46	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du Spectre d'absorption.	97
47	Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation de la phase mobile	99
48	Courbe de calibration de pénicilline G	101

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN : acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : L'adénosine triphosphate

CCM : chromatographie sur couche mince

CPE : coefficients de protection Effectifs

CPG : chromatographie en phase gazeuse

CPN: coefficients de protection nominaux

D.J.A : Dose journalière acceptable

DL : Dose létale

D.S.A : Dose sans effet

ELISA: Enzyme linked Immuno Sorbent Assay

g/j : Gramme par jour

g/kg : Gramme par kilogramme

HPLC : chromatographie liquide haute pression

H₂O : Eau

LMR : Limite minimale des résidus

Me OH : méthanol

mg/kg : Milligramme par kilogramme

mm : Millimètre

mn : minute

NAOH : Office national de la santé animal

nm : nanomètre

pKa : Constante de dissociation ionique

PNDA : Programme national de développement agricole

TLC : Thin Layer Chromatography

µm : Micromètre

INTRODUCTION

En Algérie, l'utilisation curative et préventive des antibiotiques en élevage des animaux de rente n'est pas règlementée. Ainsi, le contrôle de la limite Maximale de Résidus d'antibiotiques (LMR) dans les denrées alimentaires animales ou d'origine animale n'est pas appliqué, ce qui présente un risque certain pour le consommateur algérien sachant que ces résidus peuvent avoir des conséquences néfastes potentielles sur sa santé.

L'importance de ce problème d'ordre sanitaire et économique et le peu de documentation scientifique sur les travaux expérimentaux traitant ce sujet dans notre pays nous ont amené à s'intéresser à ce thème.

Dans la partie théorique nous avons essayé de rassembler les données bibliographiques relatives au sujet traité.

La partie pratique est consacrée à l'optimisation de certains paramètres de la détection et de la quantification des résidus d'oxytétracycline et de la pénicilline G dans la viande rouge.

Les résultats de nos investigations expérimentales traités statistiquement nous permettent de fixer les différents paramètres d'analyse.

.

.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LA VIANDE

1. GENERALITES SUR LA VIANDE

1.1. DEFINITION DE LA VIANDE

Dans le sens général on entend par « viande » : la chair des animaux dont on peut se nourrir. Pour une définition plus scientifique, la viande est l'ensemble des matières alimentaires obtenues par la mise à mort des mammifères domestiques réputés comestibles (Drieux et al, 1962), auxquels on peut ajouter la volaille, le gibier et le poisson.

La viande est une matière alimentaire composée de tissu musculaire squelettique (muscle strié), obtenue après la mise à mort des mammifères domestiques (Craplet, 1966).

La viande est le produit de l'évolution post mortem du muscle strié (Dumont et Valin, 1982; Lenges et Demeyer, 1999).

On distingue trois catégories de viande

- viandes rouges : des viandes bovines, ovins, chevaux, caprins et camelins
- viandes blanches : des volailles et les veaux nourrist au lait
- viandes noires : du gibier (Anonyme 9, 2007).

1.2. PLACE DE LA VIANDE DANS LA RATION ALIMENTAIRE

La prise en compte de l'ensemble des recommandations conduit à une consommation de viande (rouge) de l'ordre de 120 g/j avec utilisation des aliments usuels. Dans ce cadre, la part des apports journaliers qui est assuré par la viande est variable selon les nutriments Elle est supérieure à 60 % pour certains acides aminés indispensables, la vitamine B12 et le zinc, à 40 % pour les protéines, la niacine et le cholestérol, à 20 % pour le fer, le sélénium, la riboflavine, la vitamine B6 et l'acide pantothénique et les acides gras saturés. La viande peut aussi être considérée comme une source de phosphore, de potassium et d'acides gras mono-insaturés, dans la mesure où, pour ces nutriments, les proportions de l'apport journalier qu'elle fournit, sont plus élevées que sa contribution à la fourniture d'énergie (10 à 12 %). En revanche, elle n'est pas une source appréciable d'acides gras poly-insaturés, de magnésium, sodium et calcium ni de thiamine, acide folique et vitamine. Enfin elle n'apporte pratiquement pas de fibres, de glucides et de vitamines A, D et C.

Une augmentation de la proportion de viande implique de s'écarter des préconisations. Ainsi, des apports de viande plus importants vont accroître les apports en vitamine B12, zinc, cholestérol et

protéines, ce qui ne présente pas de risque particulier et est même intéressant pour les personnes âgées. Ainsi la consommation de viande plus de 4 fois par semaine était associée à une réduction du risque de mortalité et d'accidents vasculaires chez des personnes d'au moins 75 ans.

De plus, l'augmentation de la consommation de viande est considérée comme l'un des facteurs qui a permis l'accroissement de la longévité au Japon.

L'intérêt de la viande se manifeste aussi pour améliorer la qualité de régimes à base d'aliments végétaux dont les protéines n'ont pas un équilibre satisfaisant en acides aminés indispensables et qui ne permettent pas de couvrir les besoins en fer, zinc et vitamine B12. Ainsi on constate que la viande maigre a sa place dans tous les régimes équilibrés, même dans ceux prévus pour réduire les risques cardiovasculaires ou assurer une perte de poids régulière car sous un faible grammage, elle contribue efficacement à améliorer la qualité des protéines, à assurer la fourniture de vitamines B12 et B6, impliquées dans la prévention des maladies cardiovasculaires (métabolisme de l'homocystéine) et assurer la couverture des besoins en fer et en zinc, sans accroître la charge lipidique (Mirand, 2008).

1.2.1. LA VALEUR NUTRITIVE DE LA VIANDE

1.2.1.1. La valeur énergétique

La viande est une source d'énergie, elle est surtout en proportion de sa surcharge en graisse (Laurent, 1974)

Dans l'organisme, les protides peuvent être transformés partiellement en glucides ou lipides et donc devenir une source d'énergie (Truchot, 1979).

1.2.1.2. La valeur protidique

Les protéines d'origine animale ont une meilleure digestibilité que les protéines d'origine végétale.

La viande permet un apport de protéine de qualité, riches en acides-aminoés indispensables. Dans une ration équilibrée, la viande apporterait en moyenne :

- 21,8% des calories.
- 42% des protides.
- 41,2% des lipides.
- 3,4% de calcium.
- 29,9% de phosphore.
- 38,8 % de fer.

- 14,6 % de la vitamine A.
- 1,8% de la vitamine C.
- 30% de la vitamine B2.
- 52,8% De la vitamine B1.
- 65,3 % de la vitamine PP (niacine) (Drieux et al, 1962).

1.3. LA TRANSFORMATION DU MUSCLE EN VIANDE

Après l'abattage de l'animal, la carcasse subit des modifications contribuant en particulier à son attendrissement, qui est une des qualités les plus importantes et les plus recherchées par les consommateurs (Chéret, 2005).

1.3.1. LES DIFFERENTES PHASES

Au cours de la maturation à l'état réfrigéré, lorsque le muscle est transformé en viande, le muscle est soumis à une transformation partagée en trois phases.

1.3.1.1. La première phase (pantelante)

Concerne les trois premières heures après l'abattage. Il se caractérise par un muscle « vivant » et flasque. La tendreté du muscle à cet instant est équivalente à celle du muscle après une maturation d'une quinzaine de jours. C'est une phase caractérisée par une perte rapide d'extensibilité en liaison avec la disparition de l'ATP contenu dans les muscles (Fabre- pradal, 1989).

1.3.1.2. La deuxième phase (rigidité cadaverique)

S'installe progressivement (pendant 24 heures dans le cas de la viande de boeuf). Elle se caractérise par des muscles plus durs et inextensibles. Les muscles deviennent alors inextensibles et les axes osseux sont difficiles à déplacer les uns par rapport aux autres (Chéret, 2005).

1.3.1.3. La troisième phase (phase de maturation)

Conduit à un attendrissement du muscle. Lors de cette phase dont la durée peut atteindre plusieurs jours (10 jours environ pour la viande de boeuf) (Ouali, 1990), la dureté est réduite de 80%. Après la phase de rigor mortis, la viande commence à s'attendrir sous l'effet de la maturation. Il s'agit d'un

phénomène naturel, qui résulte du relâchement des liens entre les fibres musculaires, liens établis lors de la rigor mortis. Ce relâchement se fait grâce à l'action de diverses enzymes capables de dégrader les protéines du muscle (Chéret, 2005).

1.3.1.4. La quaterieme phase (phase de putrefaction)

Dans les conditions d'asepsie la poursuite des phénomènes précédents aboutit à l'autolyse (Craplet, 1966).

1.3.2. MECANISMES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE MATURATION

La maturation du muscle en viande dépend de nombreux facteurs biologiques et technologiques, l'action protéolytique des différents systèmes enzymatiques, la température de stockage du muscle, la modification de la gamme du pH, la pression osmotique, la force ionique.

Les mécanismes impliqués dans l'attendrissement de la viande sont des phénomènes enzymatiques et physico-chimiques entre lesquels il existe probablement une synergie (Bendall 1973; Ouali et al, 1983; Mikami et al, 1987; Ouali, 1990; Ouali, 1992; Taylor et al, 1995; Christensen, 2003; Chéret, 2005).

2. LA FILIERE DE VIANDES ROUGES EN ALGERIE

Les « filières viandes rouges » en Algérie reposent globalement sur des élevages bovins et ovins ainsi que, marginalement, des élevages camelins et caprins dont les niveaux de production restent fort modestes (tableaux 1 et 2). Ces élevages, largement extensifs, s'articulent autour d'un marché interne fort rémunérateur du fait du maintien de la demande à un niveau relativement élevé et du faible élasticité de l'offre interne. Des aides publiques ont, certes, été octroyées depuis l'année 2000 dans le cadre du programme national de développement agricole (PNDA), mais la production des viandes rouges n'a pas progressé de manière significative.

Avec 18 millions de têtes composée essentiellement des populations locales (Ouled Djellal, Rembi, Hamra, D'man, barbarine, berbère du Tell, Sidaou), le complexe « Ovins-Céréales - pâturage » domine ces filières. Ce complexe fonctionne sur un marché libre isolé du marché mondial, ce qui a permis aux prix intérieurs d'atteindre des niveaux excessivement élevés et autorisé la constitution de rentes à tous les niveaux des marchés.

En termes économiques, ces élevages occupent une place prépondérante dans les comptes économiques agricoles. La valeur du patrimoine animal représente quelques 438 milliards de DA, alors que la valeur de la production est estimée à 161 milliards de DA.

Tableau n°01 : Structure du cheptel des ruminants en Algérie en 2002. (Anonyme 16, 2008)

Espèces	Effectifs (2002)	Effectifs femelles
Bovins	1.537.846	891.896
Ovins	17.535.500	9.764.650
Caprins	3.310.080	1.929.104
Equins	255.119	42.341
Camelins	249.321	145.969

Tableau n° 02 : Évolution de la production et des disponibilités en viandes rouges (Anonyme 2, 2005).

Années	1991-1999	2000	2001	2002	2003
Production (Tonnes)	290150	250000	259800	290762	300459

Tableau n° 03 : Evolution des importations en viandes rouges réfrigérées et congelées (Anonyme 2, 2005).

Années	2003	2004	2005
Volume (Tonnes)	38669	84738	95126

S'agissant du marché des viandes rouges, un certain nombre de faits peuvent être mis en exergue. Les viandes rouges et plus précisément la viande ovine algérienne sont l'une des plus chères au monde. Le niveau excessivement élevé des prix est la résultante des synergies qui s'établissent entre quatre facteurs :

- un marché interne libre et structuré par le capital commercial privé
- une forte demande générée par les catégories sociales à revenu élevé
- une faible élasticité de la production locale
- un niveau de protection trop élevé voire dissuasif, accentué par les politiques de restriction draconiennes à l'importation des viandes liées aux mesures de protection sanitaire.

En effet, le niveau élevé des coefficients de protection nominaux et effectifs (CPN et CPE) permet de relever que les élevages ovins et bovins d'engraissement sont fortement protégés et isolés du marché mondial sur lesquels les prix sont bas.

Les structures de prix sont dominées par les marges prélevées par les réseaux privés de commercialisation. En effet, le niveau des prix à la consommation des viandes ovines sont fortement déterminés par l'importance des marges commerciales, le coût de production oscillant entre 240 et 300 DA / Kg.

La situation de l'élevage des ruminants à viande nous conduit à affirmer que nous sommes en présence de véritables situations de rente qu'il faudrait appliquer au sein des exploitations agricoles. Ceci est particulièrement vrai pour les viandes ovines.

La consommation des viandes rouges demeure très faible et a significativement baissé durant la période de mise en œuvre du programme d'ajustement structurel. En effet, selon une enquête réalisée en 1998 (1), sur un échantillon de 2000 ménages, il ressort que les fréquences mensuelles de consommation des viandes rouges ont décliné de 40 % durant la période 1993-1997, cette baisse est essentiellement liée à la dégradation du pouvoir d'achat des consommateurs et plus particulièrement des titulaires des revenus fixes (les salariés).

Le niveau de consommation des viandes rouges se situerait actuellement à 10 kg/ans/personne, niveau relativement faible comparativement aux pays industrialisés. En termes d'habitudes alimentaires, le marché algérien est de prime abord un marché de consommation de viandes fraîches ovines et bovines; les viandes camelines et caprines étant marginalement consommées notamment dans les régions du sud du pays.

Enfin, nous relèverons, depuis l'année 2002, l'apparition d'une tendance à la consommation des viandes rouges congelées consécutivement à la réouverture du marché algérien aux viandes importées. Les chiffres de l'année 2004 sont à cet effet fort éloquentes puisque, selon les statistiques officielles, il a été enregistré durant les neuf premiers mois de cette année, l'importation de près de 100 millions de dollars en viandes rouges congelées.

Bien évidemment, le rétablissement du flux des importations de viande est loin de pouvoir rééquilibrer les prix internes et ce tant les besoins restent importants et les circuits de commercialisation du bétail peu efficaces (Anonyme 16, 2008).

CHAPITRE II

LES ANTIBIOTIQUES

1. DEFINITIONS

Selon Waksman, (1943), toutes les substances chimiques produites par des micro-organismes capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes, et d'après Turpin et Velu (1957), Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certaines êtres pluricellulaires (Puyt, 2006).

Le terme "antibiotique" désigne une substance d'origine microbienne (sucre, protéine, amino glycoside... etc.) qui, à très petite dose, ayant la propriété de tuer les bactéries ou d'empêcher leur prolifération (Yahi, 1997; Hellali, 1999)

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre. Plus un antibiotique détruit un nombre important de bactéries, plus son spectre est dit large (Anonyme 12, 2008).

Ils sont sans effet sur les infections parasitaires et virales ni sur les mycoses, qui relèvent respectivement d'une thérapie faisant appel aux antiparasitaires, antiviraux et antifongiques.

Parmi les antibiotiques les plus connus, citons la streptomycine, employée pour traiter la tuberculose, et la pénicilline, utilisée pour combattre de nombreuses maladies infectieuses, parmi lesquelles la syphilis, la gonorrhée, le tétanos et la scarlatine. Les antibiotiques peuvent être d'origine synthétique, semi synthétique, ou naturelle, produits par des bactéries ou des champignons (c'est le cas de la pénicilline, extraite du champignon *Penicilliumnotatum*) (Anonyme 13, 2008).

2. LES GRANDES FAMILLES DES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères qui sont

- l'origine
- la nature chimique
- le mécanisme d'action

- le spectre d'action

Tout en adoptant la classification des antibiotiques en grandes familles, nous étudierons également des généralités mécanismes d'action ainsi que utilisation en médecine vétérinaire des différents antibiotiques (Le Chat, 2007).

2.1. LES β LACTAMINES

2.1.1. GENERALITES

Les β lactamines regroupent un ensemble des antibiotiques antibactériens d'origines naturelle ou semi synthétiques caractérisés sur le plan chimique par la présence d'un noyau β lactame (Puyt, 2006; Yala et al, 2001).

Ils se répartissent en trois groupes :

Groupe I : il comporte le cycle β lactame et un cycle thiazoline (ex : spectre étroits peni M et peni V) (Yala et al, 2001). Les pénicillines diffusent bien dans l'organisme mais passent peu la barrière hémato-encéphalique (Jolliet, 1998).

Groupe II : il comporte un cycle lactame et un cycle dihydrothiazine (ex : spectres larges peni A).

Groupe III : il comporte un noyau limité au cycle β lactame (ex : céphalosporines, etc...) (Yala et al, 2001).

En plus de ces trois groupes, il existe des inhibiteurs de β lactamases tels qu'Augmentin® composé d'amoxiciline et d'acide clavulanique et qui agit sur les bactéries productrices de pénicillinase) (Yala et al, 2001).

2.1.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE

L'usage rationnel des β lactamines s'appuie sur des données pharmacocinétiques propres à chaque espèce animale, la diffusibilité et la mesure de la concentration de l'antibiotique au niveau du foyer infectieux est également des facteurs à prendre en considération.

Les pénicillines orales sont bien tolérées chez le veau et le chien, mais non chez le lapin. La sélection d'un antibiotique administré par voie orale est en fonction de la nature de la flore; les lactobacilles prédominent dans l'intestin gèle des rongeurs, des porcins et des primates alors que les entérobactéries prédominent dans celui des ruminants adultes. La flore anaérobie de caecum du lapin est très sensible aux pénicillines, celle du caecum du cheval l'est davantage aux tétracyclines et à l'érythromycine. Chez le cheval, l'évolution de la pénicillémie, après injection intraveineuse de

dose de pénicilline G comprise entre 12.5 et 37.6mg/kg est très comparable à celle connue chez l'homme. Chez les ruminants la voie intramusculaire est la plus utilisée.

Enfin, la toxicité de ce groupe est très faible (DL50 est de plus de 20g/kg d'amoxiciline chez le chien) mais la sensibilité individuelle (allergie) est un risque omniprésent et incontrôlable (Ruckebusch et Toutaain, 1982).

2.2. LES AMINOSIDES OU AMINOGLYCOSIDES

2.2.1. GENERALITES

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des antibiotiques rapidement bactéricides. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémisynthétiques (Le Chat, 1975).

2.2.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE

La dose thérapeutique par voie parentérale est passée de 15-25mg/kg pour la streptomycine à 3-5mg/kg pour la gentamicine, l'absorption digestive limitée des aminosides en fait des médicaments surtout utilisés par voie orale. C'est le cas de la dihydrostreptomycine, souvent associée à la pénicilline par voie parentérale, mais aussi présentée sous forme de comprimés pour combattre toute péllulation bactérienne anormale dans le tube digestif des carnivores.

La néomycine est réservée pour le traitement local des infections cutané-muqueuses et par voie orale au contrôle de la flore intestinale; la faible absorption digestive évite l'élimination rénale et donc les phénomènes de toxicités rénale ainsi que les troubles cochléaires (hypoacousie et surdité); ceux-ci sont la règle du moins chez le veau dans le cas d'injection parentérale avec un taux résiduel élevé 11 jours après la fin du traitement.

La gentamicine est beaucoup moins toxique; elle représente actuellement le recours ultime contre des infections respiratoires ou génito-urinaires non maîtrisées plus classiquement, et surtout la colibacillose des veaux (Ruckebusch et Toutaain, 1982).

2.3. PHENICOLES CHLORAMPHENICOL ET THIAMPHENICOL

2.3.1. GENERALITES

- Chloramphénicol

Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique à large spectre. Il est considéré comme un antibiotique de réserve, Pour les traitements des salmonelloses en raison des toxicités que comporte chez l'homme une administration prolongée (Fontaine, 1998).

- Thiamphénicol

Le thiamphénicol est très voisin chimiquement du chloramphénicol, son spectre d'action est similaire. Ils sont actuellement remplacés par les céphalosporines de troisième génération.

2.3.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE

Depuis sa découverte, le Chloramphénicol occupe une place de choix en médecine humaine dans le traitement de la typhoïde (d'où son nom commercial de tiphomycine); il la conserve en médecine vétérinaire en raison de son spectre très large, de sa grande diffusion dans le liquide céphalo-rachidien et les milieux oculaires, et d'un faible prix de revient. (Ruckebusch et Toutaain, 1982).

En effet cette molécule a une forte toxicité de ce faite leurs utilisation est interdite dans la plus parts des pays du monde.

2.4. LES TETRACYCLINES

2.4.1. GENERALITES

Les tétracyclines sont l'un des groupes d'antibiotiques les plus employer en médecine vétérinaire en raison de leur large spectre d'activité et leur nombreuses indications et de leur faible toxicité (Puyt, 2006).

Les tétracyclines forment une classe d'antibiotiques semblables par leurs propriétés physico-chimiques, ils ont en commun un noyau naphtacène-2 carboxamide portant divers substitution oxygénées et azotées, ils doivent être conservées à l'abri de la lumière et de la chaleur. La présence de plusieurs systèmes de doubles liaisons conjuguées explique leur absorption dans l'U.V. avec un maximum aux alentours de 250 à 300 nm. Elles sont bactériostatiques et pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité. (Le Chat, 1978; Eugénie et Brogard, 1999; Puyt, 2006).

2.4.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE

L'oxytétracycline est largement utilisée chez les grands animaux, par voie intramusculaire profonde. Le facteur de la variation interspécifique de la posologie est, en fonction de l'élimination rénale de l'oxytétracycline.

Chez le cheval, l'usage de la doxycycline serait plus intéressant que l'oxytétracycline, pour éviter les perturbations de la flore digestive. Enfin des récents essais expérimentaux américains a montré la supériorité de la doxycycline par rapport aux autres tétracyclines en thérapeutique aviaire dans le cas d'affections respiratoires, et les colibacillooses, Il est à rappeler cependant que les antibiotiques sont plus utilisés en aviculture dans un but préventif que curatif (Ruckebusch et Toutaain, 1982; Châtaigner et Stevens, 2001).

2.5. LES POLYPEPTIDES

2.5.1. GENERALITES

Ce sont des antibiotiques bactéricides à spectre étroit, on les utilise dans les infections sévères à bacilles gram négatif. Ce sont les antibiotiques de références pour le traitement des endocardites.

2.5.2 UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE.

La famille des polypeptides, qui comprend la colistine, la polymyxine B, la bacitracine et la tyrothricine, présente les caractéristiques communes suivantes :

- structure polypeptidique
- activité contre les bacilles gram positifs sauf la bacitracine
- faible absorption; d'où leur usage en antibiothérapie digestive.

La colistine entre dans la composition de nombreuses spécialités où elle est associée aux sulfamides, aux β lactamines et aux macrolides (Ruckebusch et Toutaain, 1982).

2.6. MACROLIDES, LINCOSANIDES, SYNERGISTINES

2.6.1. GENERALITES

Les macrolides sont des antibiotiques fréquemment utilisés en pratique de ville à cause de leur facilité d'emploi.

Ils ont un spectre étroit, et sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires. Ils ont une excellente pénétration tissulaire.

Les macrolides sont des antibiotiques macrocycliques possédant un noyau lactone central qui est à la base de leur classification, selon le nombre d'atomes de carbone. Ce sont des molécules lipophiles (Lagier, 1998).

2.6.2. UTILISATION EN MEDICINE VETERINAIRE

Ce groupe agit par blocage de la synthèse protéique des germes résistant aux B-lactamine et aux tétracyclines (en particulier les staphylocoques).il se caractérise par une forte élimination biliaire pour la spiramycine et, à moindres degrés, l'érythromycine (Ruckebusch et Toutaain, 1982).

2.7. LES QUINOLONES

2.7.1. GENERALITES

Ce sont des agents antibactériens de synthèse, cette famille connaît d'importants développements qui ont abouti à la synthèse de nouveaux composés dont les propriétés élargissent les indications des quinolones (Fontaine, 1998).

Schématiquement on peut classer les quinolones sur la base de l'étendue du spectre antibactérien et la nature fluorée ou non du squelette en trois groupes :

- les quinolones de première génération
- les quinolones de deuxième génération
- les quinolones de troisième génération

2.7.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE

Compte tenu de leurs propriétés pharmacocinétiques, les quinolones sont utilisées préférentiellement dans le cas d'infections urinaires ou intestinales.

Les quinolones dont le spectre d'action est large vis-à-vis des entérobactéries, se présentent sous la forme de poudre insoluble dans l'eau mais bien absorbées par voie digestive et éliminées par voie rénale (Ruckebusch et Toutaain, 1982).

2.8. SULFAMIDES ET ASSOCIATIONS SULFAMIDEES

2.8.1 GENERALITES

Les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques. L'association d'un sulfamide au triméthoprime ou à la pyriméthamine leur confère un pouvoir bactéricide. Ils bloquent la synthèse par la cellule de l'acide tétrahydrofolique, ce qui inhibe la synthèse des folates. Cette classe d'antibiotiques est très allergisante (Joliet et al, 1998).

2.8.2. UTILISATION EN MEDECINE VETERINAIRE

Les sulfamides sont largement utilisés en thérapeutiques aviaires pour leur action anti-infectieuse ou anti-coccidienne. Ils s'administrent dans l'eau de boisson plus souvent que dans l'aliment. Les sulfamides sont utilisés seuls ou associés à la pyriméthamine pour une action anti-coccidienne, et au triméthoprime pour une action antibactérienne.

(Ruckebusch et Toutaain, 1982).

2.9. DIVERS

Les Antibiotiques de structures diverses, utilisés surtout en antibio-supplémentation (Fontaine, 1998). Préférentiellement dans les infections urinaires ou intestinales comme les nitrofurannes et les oxyquinilones qui sont utilisées préférentiellement dans les infections urinaires ou intestinales (Ruckebusch et Toutaain, 1982).

3. LE DEVENIR DES ANTIBIOTIQUE DANS L'ORGANISME

Le terme de métabolisme des antibiotiques désigne l'ensemble des phénomènes physico chimiques et biochimiques qui régissent le cheminement de ces substances dans l'organisme (Keck 1, 1978 ; Saux, 2006 ; Le chat, 2007)

3.1. L'ABSORPTION

Pour pouvoir gagner les organes et les tissus où aura lieu l'action pharmacologique, l'antibiotique doit dans un premier temps être absorbé c'est-à-dire pénétrer dans le liquide circulaire (Keck 1, 1978; Le chat ,2007).

3.1.1. ABSORPTION DIGESTIVE

L'absorption digestive se fait essentiellement au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. La muqueuse digestive peut être considérée comme une membrane lipoprotéique à pores. L'absorption répond donc aux règles du passage trans-membranaire.

Dans le tube digestif, la fraction solubilisée d'un antibiotique est seul à être résorbé, cette résorption résulte en fait de l'addition de deux vitesses qui sont:

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

En outre, plusieurs facteurs peuvent interférer avec cette résorption comme :

- pH et pKa (constante de dissociation ionique):

Les antibiotiques de caractères acides sont résorbés principalement au niveau gastrique où la réaction acide inhibe leur dissociation ionique, tandis que les autres de caractère basique sont résorbés au niveau intestinal où le milieu est alcalin.

- Structure physique.
- Etat de vacuité gastrique; plus souvent la résorption digestive des antibiotiques est retardée par la présence des aliments (Keck 1, 1978; Le chat, 2007).

3.1.2. ABSORPTION PARENTERALE

L'administration par voie parentérale est particulièrement utilisée en médecine vétérinaire car elle représente souvent une voie plus commode que la voie orale (Keck 1, 1978).

Le rythme d'absorption peut être ralenti par certains artifices modifiant la molécule ou par association de certains composants par les tissus moins irrigués (peau, tissus graisseux) et qui fait fonction de réservoir.

3.2. LA DISTRUBITION

Après absorption, les substances chimiques vont être distribuées dans tout l'organisme, essentiellement par voie sanguine, elles se fixeront sur divers organes et tissus en fonction de différents paramètres tenant à la substance considérée et à l'organe en cause (Keck 2, 1978; Le chat, 2007).

3.3 LA BIOTRANSFORMATION

On peut définir la biotransformation comme un ensemble de réactions biochimiques en générale enzymatiques, ayant pour effet de modifier la structure des substances introduites dans l'organisme (Keck 3, 1978; Le chat, 2007)

Certains antibiotiques peuvent traverser l'organisme en étant peu ou pas métabolisés; ils sont ensuite éliminés sous leur forme originale, non modifiée ou conjuguée.

Le type des antibiotiques peu métabolisés est représenté surtout par les antibiotiques hydrosolubles, tandis que les antibiotiques lipophiles subissent, grâce à l'intervention de certains enzymes, des modifications métaboliques durant leur passage dans l'organisme.

Cette biotransformation métabolique se fait à plusieurs niveaux : intestin, plasma, foie, reins, placenta.

3.4 ELIMINATION

Les deux principales voies d'élimination sont la voie rénale et la voie biliaire.

L'élimination fait appel aux processus généraux de passage transmembranaire : diffusion passive, filtration, transport actif (Keck 4, 1978 ; Le chat, 2007)

Les antibiotiques sont éliminés soit exclusivement par voie rénale, soit exclusivement par transformation métabolique, soit enfin, par des voies à la fois rénale et extra rénale.

Il existe trois possibilités métaboliques pour un antibiotique.

Seuls les antibiotiques hydrosolubles peuvent être éliminés directement par le rein.

De ce fait le pH du liquide tissulaire (urinaire) peut influencer l'élimination des antibiotiques (Le chat, 2007).

4. JUSTIFICATION DE L'USAGE DES ANTIBIOTIQUES EN ELEVAGE

Les antibiotiques sont utilisés en médecine vétérinaire et en agriculture depuis plus de 40 ans. Leur emploi a permis d'atteindre un triple objectif : accroître l'efficacité de la production, procurer aux consommateurs une source de protéines d'excellente qualité à un prix plus abordable et, finalement, d'améliorer la santé des animaux. L'utilisation d'antibiotiques en élevage a deux objectifs: thérapeutique ou zootechnique.

4.1. LES ANTIBIOTIQUES A USAGE THERAPEUTIQUE

En élevage de rente, les antibiotiques ont tout d'abord une utilisation thérapeutique visant l'éradication d'une infection présente (but curatif) ou la prévention d'une infection possible, à l'occasion d'un transport, d'une vaccination ou d'un stress (but prophylactique) L'utilisation des antibiotiques dans un but thérapeutique est sous le contrôle des vétérinaires.

La voie d'administration la plus rapide pour traiter un grand nombre d'animaux, est l'eau de boisson ou l'incorporation dans l'aliment. Cet aliment de traitement ou aliment médicamenteux est alors préparé pour la durée du traitement et est considéré comme un médicament.

Les principales familles d'antibiotiques sont représentées mais le nombre de molécules est très restreint si on le compare avec celui des molécules à usage humain (Scippo, 2008).

4.2. LES ANTIBIOTIQUES A USAGE ZOOTECHNIQUE

A côté de cette utilisation thérapeutique, on trouve une utilisation propre à l'élevage de rente : l'usage zootechnique. Cette pratique relève d'une observation qui date du début de l'utilisation des antibiotiques:si de faibles quantités d'antibiotiques étaient incorporées dans l'aliment pendant la période de croissance des animaux, on obtenait une amélioration du gain de poids que l'on pouvait estimer entre 2 à 5 %.

Cet effet zootechnique était principalement observé dans des élevages avec un niveau d'hygiène précaire, et tendait à diminuer avec l'amélioration sanitaire de l'élevage (Scippo, 2008).

5. LES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES UTILISES EN ALGERIE

Les informations suivantes sont issues d'interview des vétérinaires et des agents vétérinaires étatiques.

Les principaux antibiotiques utilisés en Algérie chez les ruminants sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau n°04 : Les principaux antibiotiques utilisés en Algérie.

Principe actif	Nom déposé	laboratoires	Raison d'utilisation
Oxytétracycline	Oxytétracycline 20%	(Iaprovét)	Affection bénigne
Oxytétracycline	Avicycline 20%	(Avico)	Affection bénigne
Oxytétracycline	Tenaline 20%	(CEVA)	Affection bénigne
Oxytétracycline	Terramycine 20% LA	(Pfizer)	Affection bénigne
Penicilline G + dihydrostreptomycine	Shotapen	(Virbac)	(infection pulmonaire)
Penikel 15*15	Penikel 15*15	Kela	Affection bénigne
Streptomycine			(infection Pulmonaire)
Sulfamides	Septotryl		(si très grave)

Les antibiotiques sous forme injectable les plus utilisés par les vétérinaires et techniciens vétérinaires (et donc par les éleveurs prenant eux même l'initiative de traiter) sont tous ceux à base d'oxytétracycline longue action (Terralon 20%, Oxytetracycline 20%, Tenaline 20%). La pénicilline G (peni kel 15*15) est également utilisée mais dans une moindre mesure (Anonyme 2, 2005).

Lorsque le traitement est à poursuivre pendant quelques jours par l'éleveur, ce sont des antibiotiques en poudre qui sont prescrits (Imequyl 10%, Biaprim).

5.1. IDENTIFICATION DES RAISONS POUSSANT À TRAITER

Suivant les habitudes des éleveurs, lorsqu'un animal vient d'être acquis, un traitement antibiotique préventif lui est administré.

De nombreux éleveurs traitent eux même leurs animaux en cas de faiblesse générale ou de signes pathologiques (toux, diarrhée, boiterie...). Le type de molécules utilisées sont les mêmes que celles des vétérinaires mais les notions sur la quantité à administrer ou les délais d'attente sont absentes.

Lors d'échecs thérapeutiques, les éleveurs ont recours aux vétérinaires. De plus certaines pratiques consistent à administrer aux ruminants des médicaments destinés à une autre espèce (aux volailles par exemple). La voie d'administration, les doses ainsi que la molécule utilisée peuvent être alors des facteurs favorisant la présence de résidus dans les viandes (Anonyme 2, 2005).

CHAPITRE III

LES RESIDUS DES ANTIBOTIQUES

1. DEFINITION

Les médicaments administrés aux animaux de ferme et en particulier les antibiotiques, soit par injection ou par l'intermédiaire de la nourriture, passent dans les muscles, les reins ou le foie. Ceux-ci génèrent des résidus pendant une durée variable (Beverley et Sharman, 2001).

De ce fait les résidus sont toutes les substances pharmacologiquement actives qu'il s'agisse des principes actifs d'excipient ou des produits de dégradation, ainsi que leur métabolites restant dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux auxquels le médicament vétérinaire en question a été administré.

Il s'agit de traces indésirables de médicaments ou de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci dans le produit final (Châtaigner et Stevens, 2003).

L'expression "résidus de médicaments vétérinaires" désigne les résidus de substances originales, de leurs métabolites ou de leurs impuretés appliquées ou administrées par les différentes voies à des animaux à titre de médicaments et restant dans certains produits d'origine animale destinés à l'alimentation (Kolbener et al, 2005; Cartier, 2007).

2. LE DELAI D'ATTENTE

Le délai d'attente ou période de retrait représente le temps nécessaire à l'excrétion complète d'un médicament après sa dernière prise.

Selon l'étude de Delatour, on entend par temps d'attente, le délai minimal à observer entre l'administration du médicament à l'animal, dans les conditions normal d'emploi et l'utilisation des denrées alimentaires provenant de cet animal (Milhaud, 1978)

Cette notion de temps d'attente apparemment simple dans son principe, présente de nombreuses difficultés d'application. Cependant le temps d'attente retenu dépend du seuil de sensibilité de la méthode de détection employée. Une méthode peu sensible entraîne un temps d'attente court et inversement.

Le temps d'attente est établi par les laboratoires pharmaceutiques de manière à garantir qu'à la première livraison de viande, la concentration en résidus est inférieure à la LMR de la molécule administrée (Fabri et al, 2006).

2.1. DETERMINATION DU TEMPS D'ATTENTE

Le temps d'attente nécessaire pour qu'il n'y ait plus de résidus : les hygiénistes souhaitent que les denrées alimentaires ne contiennent pas des résidus, en réalité on peut seulement affirmer qu'un produit ne contient pas les résidus mesurables.

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 ces métabolites et d'étudier leurs décroissances en fonction du temps. Les différents temps d'attente proposés devront assurer qu'il n'y ait pas de résidus mesurables dans les denrées alimentaires obtenues après l'abattage.

Pour qu'il n'y ait plus de résidus mesurables il faut ainsi fixer un temps d'attente supérieur à 10 fois de la demi vie d'une substance. Il est nécessaire d'envisager des interdictions d'emploi, si l'on veut que le temps d'attente soit respecté.

Le temps d'attente nécessaire pour que les denrées alimentaires ne contiennent pas des résidus toxiques ou dangereux. Le temps d'attente sera alors le temps qu'il convient d'attendre pour que les résidus dans les denrées alimentaires soient en concentration inférieure ou égale à la tolérance. Même si le calcul le promet, on n'attribue pas des tolérances très élevées, nettement supérieures teneurs en résidus que l'on rencontre à la suite d'une bonne utilisation du médicament.

2.2. SEUIL DE TOXICITE DE TOLERANCE

D'un point de vue toxicologique, les fondements de la notion de seuil de toxicité de tolérance deviennent de plus en plus larges et sûrs.

On est alors amené à réaliser une étude toxicologique pour chaque substance.

Cette étude comprend plusieurs étapes qui sont :

- détermination de la dose sans effet (D.S.A) qui est la dose la plus élevée avec laquelle aucun effet toxique n'a été dépisté chez aucune espèce animale
- détermination de la dose journalière acceptable (D.J.A) qui est la quantité totale de résidus pouvant être quotidiennement ingérée par le consommateur. Pour les antibiotiques les calculs ont été effectués de façon à ce que les denrées alimentaires ne contiennent pas de résidus décelables.

La fixation de tolérance et son corollaire de temps d'attente pour les antibiotiques apparaissent indispensables pour deux raisons principales :

D'une part, éviter la présence de résidus toxiques ou dangereux dans les denrées destinées à l'alimentation humaine et d'autre part, éviter que les viandes ne deviennent impropres à toute transformation industrielle (Clément et al, 1978).

2.3. COMMENT EST ETABLI LE TEMPS D'ATTENTE

Le temps d'attente est établi par les laboratoires pharmaceutiques de manière à garantir que la concentration en résidus est inférieure à la LMR de la molécule administrée.

Pour établir ce temps d'attente, des essais sont réalisés sur un nombre de vaches suffisant, selon des protocoles et des méthodes statistiques qui sont désormais définies au niveau européen.

Le temps d'attente est défini pour une dose, une voie d'administration et une durée de traitement précis. Si on augmente la dose, l'antibiotique persiste plus longtemps dans la viande. Chaque éleveur doit être conscient que lorsqu'on modifie soit la dose, soit la durée de traitement, il convient de modifier le temps d'attente. Dans ce cas, et pour plus de précautions, il est possible de réaliser, à l'issue de ce nouveau temps d'attente (défini par le vétérinaire) un test de recherche des résidus d'antibiotiques (Anonyme 14, 2008).

Le tableau 5 montre Les temps d'attente des principaux antibiotiques vétérinaires utilisés en Algérie.

Tableau n°05 : Les temps d'attente des principaux antibiotiques vétérinaires utilisés en Algérie.

PRICIPE ACTIF	NOM DEPOSE	LABORATOIRE	DELAID'ATTENTE
Oxytetracycline	Terramycine	Pfizer	21 jours
Oxytetracycline	Oxytetracycline	Phénix	21 jours
Oxytetracycline	Avicycline	Avico	21 jours
Pénicilline G	Penikel 15*15	Kela	30 jours
Pénicilline G	Peni sterp	Norbrouk	30 jours

3. LA LIMITE MAXIMALE DE RESIDUS (LMR)

La Limite Maximale de Résidus (LMR) est la concentration maximale en résidus dans un produit (lait, viande, oeuf...) que les scientifiques et les autorités 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.

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 (Anonyme 10, 2008).

3.1. 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 (Fabri et al, 2006).

3.2. LA LMR BACTERIOLOGIQUE

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 (Fabri et al, 2006).

4. LES PROBLEMES POSES PAR LA PRESENCE DES RESIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LA VIANDES ROUGES

Destinées à l'alimentation humaine la viande rouge contenant des résidus des antibiotiques est susceptible de présenter un danger. Dans pareil cas, les risques encourus semblent en fait être de deux types : réels et théoriques

4.1. EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES VIANDES

La présence anormale d'antibiotiques ou de résidus actifs dans les viandes rend possible la modification des résultats, des examens de laboratoires destinés à juger de leur salubrité et de leur qualité bactériologique. Ils peuvent inhiber le développement des flores microbiennes de contamination.

La présence de germes pathogènes risque ainsi de passer inaperçu. De plus, il est possible de masquer une éventuelle septicémie avec un traitement antibiotique massif. Ceci est souvent le cas dans les abattages d'urgence (Dominique, 1983).

4.2. DENATURATION DES RESIDUS PRESENTS DANS LES VIANDES

Selon Dominique (1983) la dénaturation spontanée de l'antibiotique contenu dans une viande est nulle tant que celle-ci conserve toutes ces propriétés et toutes ses qualités organoleptiques habituelles. Cependant le froid n'a aucune action. Le taux d'antibiotique reste inchangé dans une viande congelée après un séjour de cinq mois à -12°C .

Par contre la chaleur possède un certain rôle, variable selon l'antibiotique. On peut classer les antibiotiques selon leurs sensibilités à l'action de la chaleur dans le tableau suivant :

Tableaux n°06 : Sensibilités des antibiotiques à la chaleur (Dominique, 1983).

Les antibiotiques	Sensibilité
-La pénicilline -La tétracycline	-Thermosensibles
-La streptomycine -La néomycine -La kanamycine -La framycétine	-Thermostables
-Le chloramphénicol -Les macrolides -L'oxytétracycline	-Intermédiaires

Enfin, même après inactivation thermique pendant une heure à 90°C , les pénicillines peuvent encore présenter des propriétés allergènes, alors qu'elles sont considérées comme thermosensibles.

4.3. RISQUE D'ORDRE TECHNOLOGIQUE

La présence d'antibiotiques dans la viande entraîne des accidents de fabrication du salami et autres produits de fermentation de la viande (Scippo, 2008).

4.4. RISQUE ALLERGENE

Le danger le plus fréquent pour le consommateur est allergologique (urticaires, dermatoses, prurit, choc), il se présente selon deux modalités principales.

-soit c'est le sujet qui, sensibilisé par des traitements antibiotique antérieurs, réagit après ingestion de denrées contaminées, cette sensibilisation, est très facile à obtenir avec les pénicillines, possible avec la streptomycine plus rare avec les tétracyclines.

Le pouvoir allergène de la pénicilline obéit à un mécanisme immunologique. Elle se comporte alors comme un haptène qui, après couplage avec des protéines sériques induit la formation des anticorps responsables des états d'hypersensibilité. De plus, c'est le noyau 6- amino- pénicillinique, sans activité antibiotique, qui est impliqué dans cette réaction.

Soit c'est une sensibilisation par ingestions répétées de petites quantités de résidus qui amène la réaction au cours d'un traitement médical (Dominique, 1983; Châtaigner et Stevens, 2003).

4.5. LA TOXICITE

Les risques toxiques résultent de l'absorption répétée de résidus retrouvés dans les aliments et de leurs accumulations dans l'organisme humain (Baumeister et al, 2005).

Les facteurs toxiques sont :

- la dose ingérée par l'homme avec son aliment
- la nature de l'antibiotique

Actuellement la streptomycine, la néomycine, la polymyxine, la cholrtetracycline et surtout la chloramphénicol (Dominique, 1983).

Certains antibiotiques possèdent une pouvoir feototoxique comme les tétracyclines par leur pouvoir de compactations avec les métaux bi – et tri valent elles modifient le métabolisme du calcium ceci ayant des répercussions osseuses et dentaires néfastes (Pantaleon et al, 1969).

Aussi certains sulfamides sont foetotoxiques à forte dose (Châtaigner et Stevens, 2003).

4.6. INFLUENCE SUR LA FLORE INTESTINALE

Les antibiotiques peuvent tuer certaines bactéries, ou diminuer leur aptitude à proliférer dans l'intestin par différents mécanismes qui sont :

- diminution de vitesse de croissance
- diminution de l'affinité pour le substrat nutritionnel

- diminution de l'adhésion (Corpet et al, 1989; Lobry et al, 1992).

L'atteinte de certaines populations bactériennes qui font partie de la flore normale permet à d'autre à augmenter en taille c'est le phénomène d'abaissement des barrières microbiologique (Vollaard et al, 1990; Tancrede, 1992; Vanderwaaiji, 1992).

L'effet de barrière, et donc l'action antagoniste exercée par la microflore envers certaines bactéries, notamment celles qui viennent de l'extérieur.

L'affaiblissement des barrières microbiologiques peut avoir plusieurs conséquences pour la santé individuelle ou publique.

- une bactérie pathogène, en transit ou présente en petit nombre, peut devenir dominante dans l'écosystème digestif; causant des maladies graves (Tancrede, 1992).

- une bactérie opportuniste, potentiellement pathogène pour certains individus sensibles peut augmenter en nombre dans l'intestin (Andrement et al, 1989).

- une bactérie résistante aux antibiotiques peut être sélectionné par un résidu antibiotique soit directement par l'élimination des bactéries sensibles correspondantes soit indirectement par l'affaiblissement (Holmberg, 1987; Wiedemann, 1993).

- l'équilibre de la flore : peut être modifié de façon significative, mais sans conséquence néfaste (Carman 1 et al ,1993; Carman 2 et al ,1993; Gorbash, 1993).

4.7. L'ANTIBIORESISTANCE

L'antibiorésistance est la faculté qu'ont certaines bactéries de survivre à l'exposition à un antimicrobien particulier qui devrait normalement les détruire.

Les antibiotiques à usage thérapeutique sont utilisés dans le traitement et le contrôle de maladies infectieuses diverses chez un grand nombre d'espèces animales.

Cette utilisation peut conduire à la sélection de germes résistants aux antibiotiques, ce qui est un phénomène naturel et inévitable. C'est un risque inhérent à l'utilisation des antibiotiques chez toutes les espèces, l'homme y compris.

L'apparition de germes pathogènes humains multi résistants aux antibiotiques a attiré l'attention sur l'usage, tant en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine, de ces médicaments essentiels. Toutefois, il reste encore à comprendre la contribution relative des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire à ce phénomène.

4.7.1. ORIGINE DE LA RESISTANCE

Il existe deux types de résistances :

- naturelle ou intrinsèque : La souche n'est naturellement pas sensible à l'action de l'antibiotique.
- acquise : résistance chromosomique et résistance par transfert (figure 1)

La résistance chromosomique se développe à la suite d'une mutation spontanée au niveau d'un locus sur le chromosome microbien qui contrôle la sensibilité à un antibiotique donné. Par exemple grâce à une mutation ponctuelle d'un gène qui bloque la fabrication d'une protéine sur laquelle l'antibiotique agissait. L'antibiotique ne peut alors plus se lier à sa cible, et la bactérie résiste au traitement. La présence de l'antibiotique agit comme un mécanisme de sélection pour éliminer les micro-organismes sensibles et donc promouvoir la croissance de mutants résistants. Ces mutations spontanées sont transmises verticalement.

Les résistances peuvent aussi se développer à la suite de transfert de matériel génétique entre bactéries. Les plasmides, les transposons et les intégrons, qui sont de courtes séquences d'ADN, peuvent être transmis à la fois verticalement et horizontalement et peuvent coder pour de multiples résistances.

On estime que la plus grande partie des résistances acquises sont transmises via les plasmides, mais nous ignorons encore le ou les mécanismes intimes relatifs à certains flux de gènes (Anonyme 4, 2005).

n°

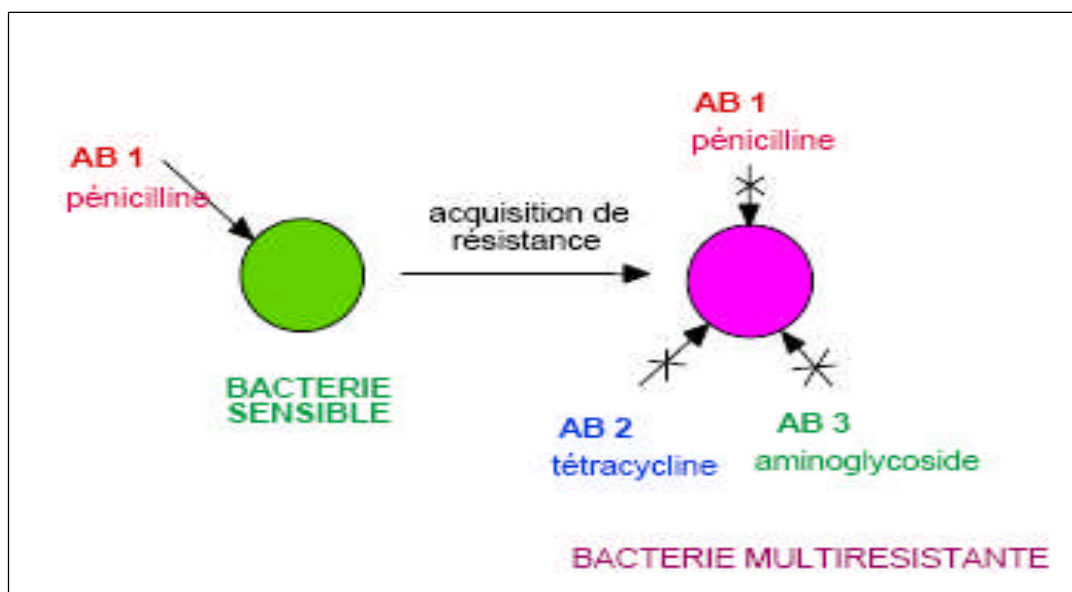


Figure 01:

Mécanisme d'acquisition de résistance (Maghuin, 2002; Scippo, 2008).

Le tableau 7 indique la résistance de quelques bactéries aux antibiotiques

Tableau n° 07: Résistance des bactéries aux antibiotiques. (Maghuin, 2002)

Bactéries	Résistance
Salmonella	SalmonellaTyphimuriumDT104 résistante à plus de 9 antibiotiques. Présente dans la viande
Escherichia Coli	Sulfamidés, 70 % des E.Coli
Campylobacter	Fluoroquinolones, tétracyclines, macrolides
Staphylococcus aureus	Résistance à la vancomycine
Pseudomonas	Fluoroquinolones, gentamycine•
Enterococci	Résistance à la vancomycine, gentamycine, β -lactamines, glycopeptides

5. LA CONDUITE A TENIR DEVANT UN ECHANTILLON CONTROLE POSITIF

Pour garantir l'innocuité et l'apparence acceptable des produits de viande ainsi que leur conformité aux normes, les inspections ante- et post-mortem sont complétées à l'aide d'examens de laboratoire visant à déceler la présence de substances chimiques, de microorganismes et à vérifier la conformité aux normes. L'exploitant est responsable des aspects de l'assurance qualité. Un inspecteur réalise par la suite un contrôle de la qualité de l'entreprise en vue de déterminer si les produits de viande sont préparés conformément aux normes prescrites,

Quant au contrôle des résidus proprement dit, il a pour objectif de déterminer les niveaux et les types de produits chimiques et de médicaments présents dans les animaux et les produits de viande. La surveillance de la présence de résidus d'antibiotiques chez les principales espèces d'abattage vise à vérifier que les méthodes d'utilisation courantes des antibiotiques ne laissent pas de résidus dans la viande. On recherche surtout les animaux ayant subi un traitement thérapeutique dont la période de retrait n'a pas été respectée. Les animaux qui présentent des marques d'injection ou des conditions chroniques non fébriles (par exemple, la mammite, l'arthrite, la métrite, etc.) sont considérés comme suspects et doivent subir des épreuves pour la détection des résidus d'antibiotiques (Anonyme 4, 2005).

Que ce passe t-il lorsque la présence d'une substance interdite est détecté ou qu'une LMR est dépassée.

Si des tests démontrent que des produits sont dangereux pour la santé humaine, ces derniers sont saisis et détruits, et les tests réalisés sur les produits et les substances en question sont renforcés.

Les états membres sont informés par le biais du système d'alerte rapide. Les pays tiers concernés sont également avertis si le produit dont il s'agit a été importé

(Anonyme 4, 2005). Ces mesures de sécurité sanitaire sont presque absentes dans notre pays.

CHAPITRE IV

LES METHODES DE LA DETECTION DES RESIDUS DES ANTIBIOTIQUES

1. STRATEGIE D'ANALYSE DES RESIDUS DES ANTIBIOTIQUES

L'analyse des denrées alimentaires est nécessaire afin de garantir la maîtrise de la qualité d'un point de vue sanitaire ou commercial (Elle apparaît indispensable dans le cadre des contrôles exercés par l'autorité compétente, mais d'avantage encore aujourd'hui, dans le cadre de l'autocontrôle au sein des entreprises. C'est une des conditions importantes de la libre circulation des marchandises en particulier au sein du grand marché.

La recherche des antibiotiques dans le lait est une action simple et bien connue (les fameux « inhibiteurs »). Mais les recherches sur la viande restent moins systématiques et plus méconnues... sauf par quelques médias qui braquent les projecteurs sur cette présence éventuelle de résidus dans les denrées.

L'analyse des denrées alimentaires passe généralement par deux phases qui sont :

- Le dépistage

Effectué au moyen d'une méthode d'analyse qui donne une indication forte de la présence d'un résidu dans un échantillon (Maghuin-Rogister, 2005; Scippo, 2008).

La méthode de dépistage est une méthode de routine réalisée par les laboratoires départementaux d'analyses ; cette méthode est selon les cas, uniquement qualitative ou doit nécessairement être confirmé par une méthode de confirmation (Mircovich et Bozec, 2003).

- La confirmation

La méthode de confirmation est beaucoup plus fine d'un point de vue technique que la méthode de dépistage. Elle permet d'identifier précisément la molécule en cause et sa concentration (Mircovich et Bozec, 2003; Maghuin-Rogister, 2005; Scippo, 2008).

Pour rendre la stratégie de contrôle des résidus plus efficace, il faudrait idéalement établir un plan en quatre phases :

1.1. PHASE 1: LE PRE- SCREENING (TEST DE PREMIER DEPISTAGE)

Cette étape est déjà opérationnelle dans le contrôle sanitaire et ces tests sont effectués dans des laboratoires agréés. Il s'agit du test, pratiqué sur les reins des animaux d'abattoir,

connu sous le nom de test rénal ou nouveau test rénal belge. Le test de dépistage utilisé actuellement, permet uniquement de détecter la présence d'antibactériens dans les échantillons (Maghuin-Rogister et al, 2001; Scippo, 2008).

1.1.1. TEST RENAL

Actuellement, le test appliqué pour déterminer si un échantillon est positif ou négatif, est le test rénal belge (figure 2). Ce test microbiologique de pre-screening (premier dépistage), appliqué sur les reins des animaux abattus, se base sur l'activité antimicrobienne des antibiotiques. Il permet uniquement de détecter la présence de substances inhibitrices dans l'exsudat rénal. Mais il ne permet pas d'identifier la substance concernée et encore moins de la quantifier dans les parties consommables de la carcasse et en particulier dans la viande.

C'est pourquoi, pour progresser dans l'application des LMRs, des méthodes de dépistage simples et rapides d'identification des antibiotiques doivent être appliquées. Celles-ci viendront compléter l'information obtenue lors du test rénal (Maghuin-Rogister, 2002).

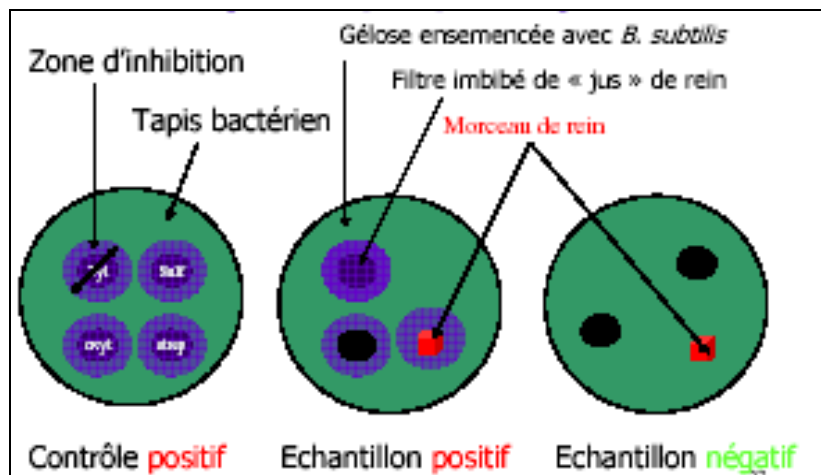


Figure n° 02: Test rénal (Scippo, 2008).

1.1.2. TEST EUROPEEN A 4 PLAQUES

Repose sur l'utilisation des boîtes de Pétri sur lesquelles sont déposés des disques de la viande à tester (figure 3).

Ces boîtes contiennent différents milieux de culture, sont ensemencées avec différentes bactéries sensibles à des familles d'antibiotiques différents (tableau 8). La présence d'antibiotique dans la

viande se traduit, après 24 heures de culture, par une zone d'inhibition autour du disque de viande. Si le diamètre d'inhibition est supérieur à 2 mm, le morceau de viande est considéré comme positif (Maghuin-Rogister, 2002).

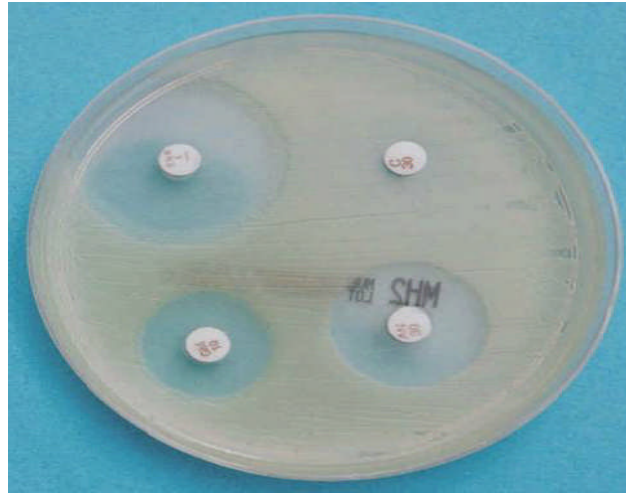


Figure n° 03 : test européen a 4 plaques (Anonyme 7, 2006).

Tableau n ° 08 : Présentation de la méthode des 4 plaques utilisée pour le contrôle officiel.
(Anonyme 11, 2008)

Boite	1	2	3	4
Souche	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis	Micrococcus luteus
PH	6	7,4	8	8
Observation		Ajout Trimethoprim		
Molécule cible (1)	Bétalactames + Tétracyclines	Sulfamides	Aminosides	Bétalactames + Macrolides

(1) La boîte considérée est « plus sensible » aux antibiotiques énumérés Légende Quatre boites sont nécessaires pour rechercher parmi un large « spectre » de familles différentes d'antibiotique

1.1.3. PREMI TEST

Est un test à large spectre, il détecte un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande. Au bout de 4 heures et donne un résultat fiable.

Le Premi Test est d'une utilisation simple :

- Verser un peu de jus de viande dans le tube à essai
- préchauffer l'incubateur pendant 20 minutes
- incuber l'échantillon à 64 °C pendant trois heures environ et vérifier la couleur

Si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que la quantité de composés antimicrobiens se situe en dessous des limites de détection du Premi®Test. Une couleur violette indique un taux d'antibiotiques supérieur ou égal à la limite de détection du test (Korsrud et al 1998; Anonyme 15, 2008).



Figure n° 04: plage de couleurs de Premi®Test (Gaudin et al, 2006)

Chaque antibiotique a un seuil de détection spécifique (tableau 9).

Tableau n°09 : Seuils de détection du Premi®Test (microgrammes / kilo) (Anonyme 11, 2008)

Antibiotiques	Volaille, Bovins	LMR viande (muscle)
Tétracycline : oxytétracycline Chlorotétracycline, doxycycline	100	100
Pénicilline A : amoxicilline, ampicilline	5	50
Céphalosporine : ceftiofur	100	100 (Bv)
cefquinome	75	50 (Bv)
Aminoside : DHS	1500	500(Bv)
Néomycine, Gentamicine	300	500
	100	50
Macrolide, Tylosine,	50	100
Erythromycine	100	200
Lincomycine	100	100
Spiramycine	1000	200(Vol) (BV)
Sulfadiazine	75	100
Qunilone : enrofloxacin	600	100
Fluméquine	100	200 (BV) 400 (Vol)
Phénicolés : Florfénicol	100	100 (Vol) 200 (BV)
Bacitracine	500	150(lapins)

Légende : Les résultats n'indiquent pas de différence de sensibilité notable entre l'origine des viandes : bovins, volailles (Anonyme 11, 2008).

1.2. PHASE 2: LE SCREENING (DEPISTAGE SELECTIF)

Les échantillons donnant une réponse positive lors du pre-screening sont soumis au dépistage sélectif. Lors de ce screening, on tente d'identifier plus précisément la famille à laquelle appartient la substance active repérée. Cette détection se fait au moyen d'immunoessais, ou d'autres tests biochimiques, commercialisés sous différents formats ou encore grâce à d'autres techniques de dépistage comme la chromatographie sur couche mince. (Maghuin-rogister et al, 2001)

1.2.1. LES IMMUNOESSAIS

1.2.1.1. Les méthodes radio immunologiques (RIA)

Ensuite dans les années'80, on a vu se développer des méthodes radio immunologiques (RIA) pour le dépistage de résidus d'antibiotiques dans des échantillons. Ici c'est la reconnaissance d'une molécule par un anticorps qui est détectée. Une compétition est organisée pour une liaison à des anticorps entre l'antigène non marqué, à savoir la molécule à rechercher dans l'échantillon, et un antigène de nature similaire mais marqué par un isotope radioactif (tritium, carbone 14) (figure 5) (Scippo et Maghuin-rogister, 2006)

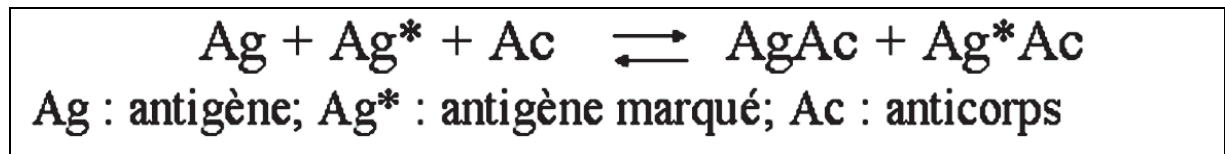


Figure n° 05 : Equation de base des dosages immuno-chimiques par compétition. (Scippo et Maghuin-rogister, 2006)

Dans cette technique, on mesure la radioactivité liée aux anticorps après avoir éliminé la radioactivité libre.

Grâce à une courbe de calibration, on peut déterminer la concentration de la substance dans l'échantillon.

Ces méthodes permettent de détecter des concentrations en résidus de l'ordre du ppb (microgramme par kg) (Scippo et Maghuin-rogister, 2006). Les anticorps sont généralement très spécifiques.

Dans certains cas, par exemple pour le bêta agoniste ou certains antibiotiques comme les tétracyclines, il existe des anticorps capables de réactions croisées avec plusieurs substances différentes d'une même famille. Dans ce cas, un dépistage multianalyte est possible.

Ces méthodes sont moins utilisées actuellement, mais plusieurs kits sont encore disponibles commercialement.

1.2.1.2. Récepteurs essais (RRA)

Des récepteurs essais pour les principaux antibiotiques, tétracyclines, β lactamines...) ont été mis au point.

Tous ces récepteurs sont des protéines qui appartiennent à une superfamille de facteurs transcriptionnels qui présentent une organisation commune en domaines (Scippo et Maghuin-rogister, 2006; Anonyme 15, 2008).

Le principe de ces récepteurs est illustré dans la figure 6 :

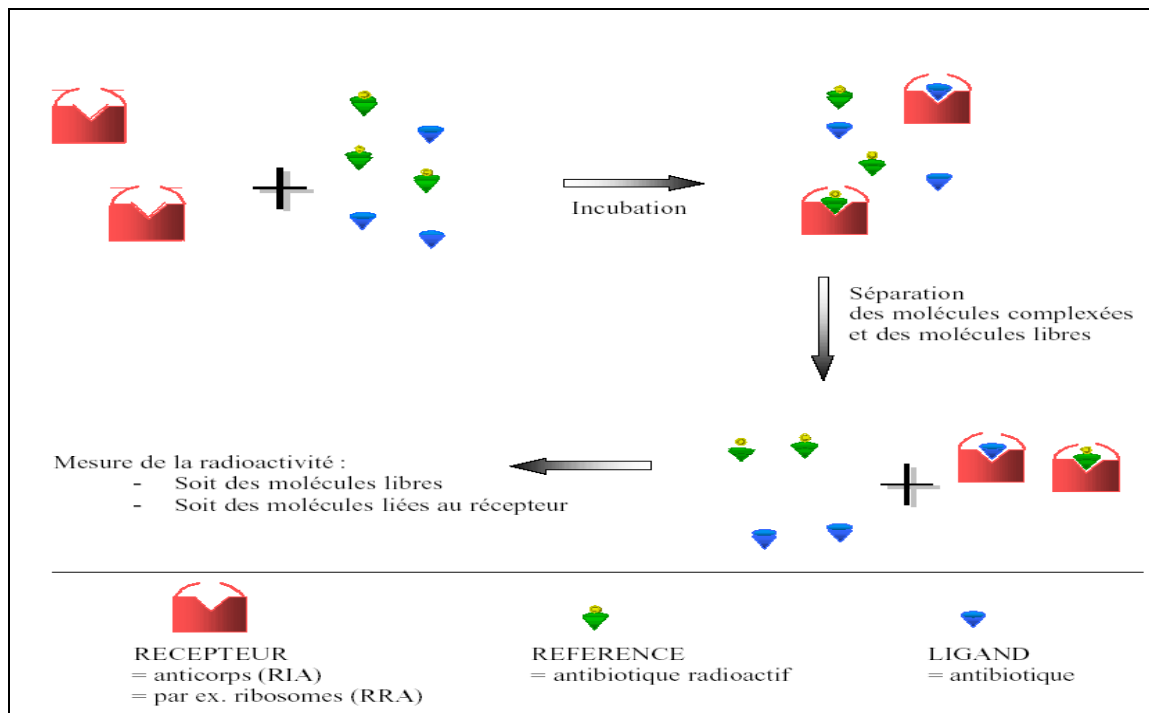


Figure n° 06 : Principe a) du RIA – b) du RRA (Maghuin-rogister et al, 2001)

1.2.1.3 .Test ELISA

L'ELISA (Enzyme- linked ImmunoSorbent Assay) est analogue au RIA. Cette fois l'antigène est marqué par un enzyme dont l'activité liée aux anticorps peut être mesurée grâce à une coloration correspondant à la transformation du substrat de l'enzyme en produit (figure 7).

La réponse est inversement proportionnelle à la concentration en analyte dans l'échantillon.

De nombreux kits de dosage Elisa pour les résidus d'antibiotiques ont été développés (Jenster et al, 1992; Anonyme 15, 2008).

Elle est cependant dépourvue des inconvénients liés à l'utilisation de la radioactivité.

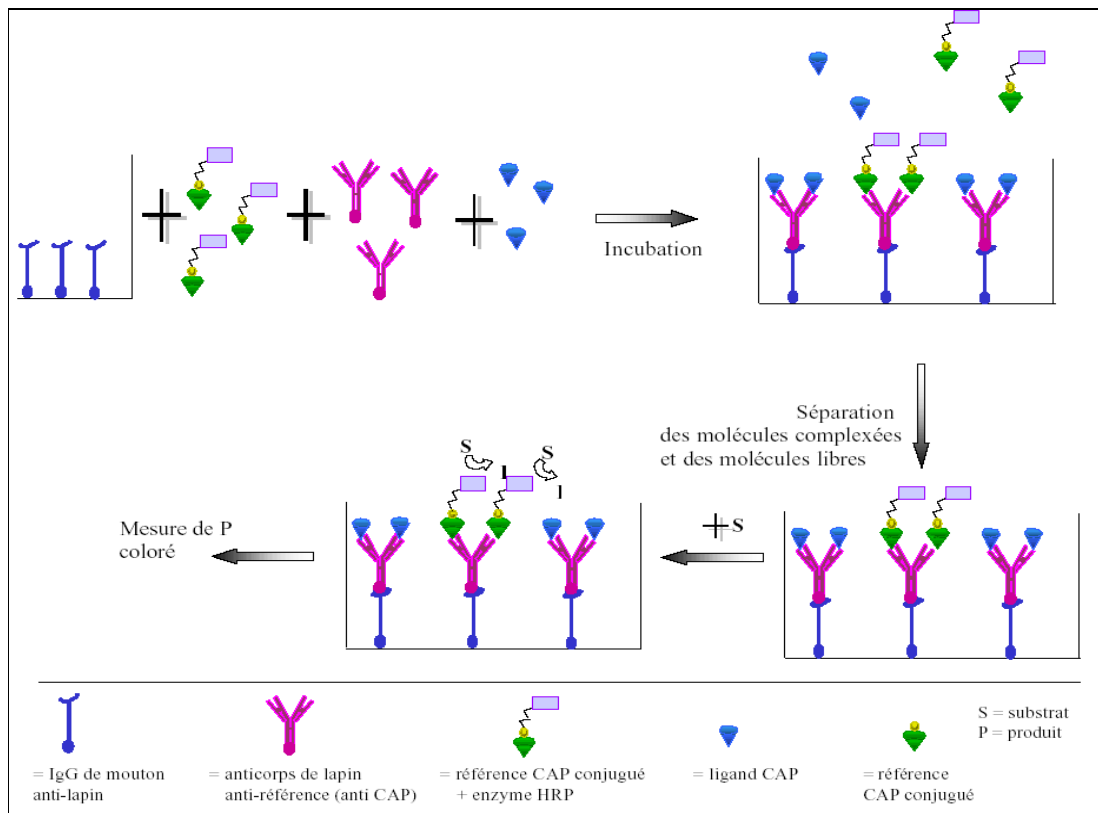


Figure n°07: Principe c) du Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (Maghuin-rogiester et al, 2001).

1.2.2. TESTS BIOCHIMIQUES

1.2.2.1. Betastar

Est un test rapide spécifique des bêta lactamines fondé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or.

C'est un test très simple d'emploi, la lecture s'effectue sur des bandelettes (figure n° 8) (Gaudin et al, 2006; Anonyme 15, 2008).

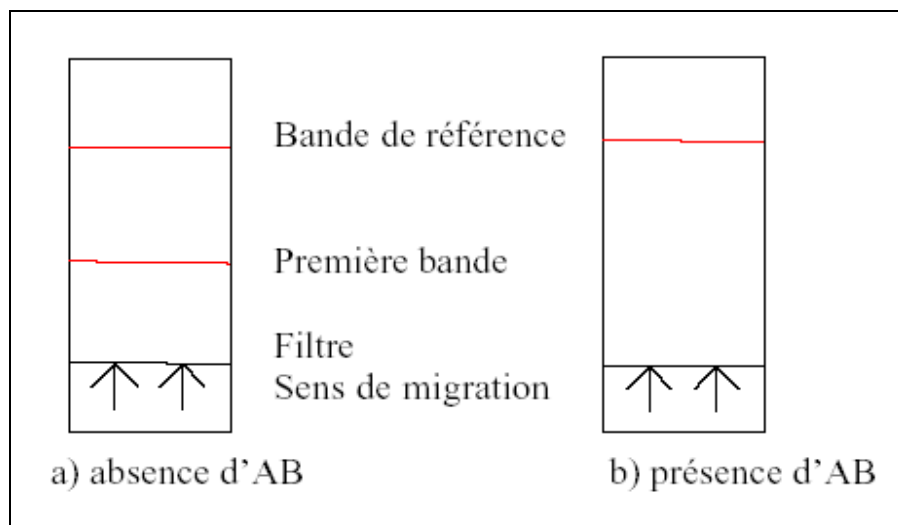


Figure n° 08 : principe de BETA -STAR (Maghuin-rogister et al, 2001).

2 situations sont représentées a) échantillons sans antibiotique b) échantillon avec antibiotique

1.3. PHASE 3: LA CONFIRMATION ET L'IDENTIFICATION

Un résultat positif lors d'un test de dépistage doit être considéré comme potentiellement douteux en raison d'interférences possibles (risque de faux positifs). Il doit donc être confirmé au moyen d'une méthode d'analyse dont le principe de détection est différent de celui de la méthode de dépistage. On entend par identification la distinction de la substance responsable du résultat positif lors du dépistage par rapport à des substances de structures analogues. Du fait que les valeurs de LMR peuvent varier d'une substance à l'autre au sein d'une même famille d'antibiotiques (par exemple les bêtas lactames) une identification non ambiguë du résidu est indispensable.

Les techniques les plus utilisées, tant pour la confirmation que pour l'identification, sont des chromatographies liquides (LC) couplées à différents détecteurs spectrométriques (LC-UV, LC-MS, LC-MS/MS, ...)(Maghuin-rogister et al, 2001).

1.3.1. LA SPECTROMETRIE DE MASSE

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 (figure 9). On montre que la déviation est proportionnelle.

Un spectrographe de masse dont lequel on ne modifie aucun paramètre 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 1, 2001; Anonyme 5, 2006)

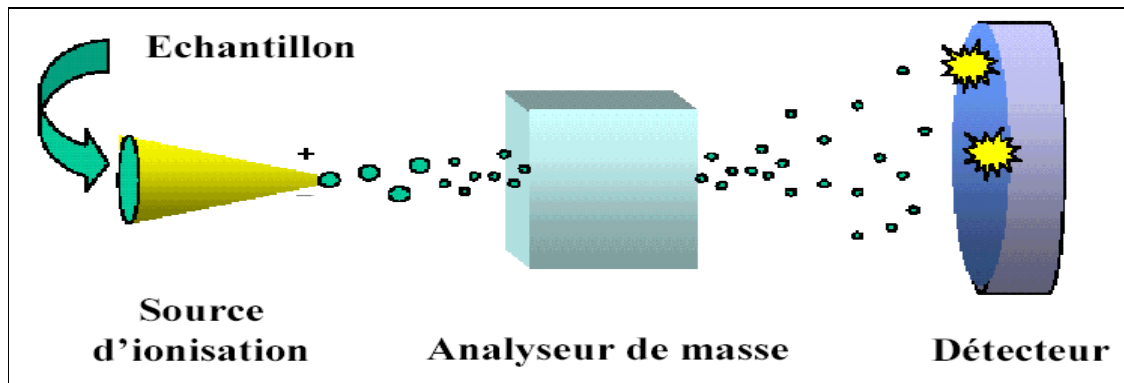


Figure n° 09 : principe de la spectrométrie de masse (Laurence, 2003).

1.3.2. LA SPECTROMETRIE DE UV

Le spectre compare un faisceau monochromatique de longueur d'onde donnée λ passant au travers de la solution à étudier, et un autre faisceau de même longueur d'onde et de même intensité initiale passant au travers d'une cuve ne contenant que le solvant utilisé. Soit I l'intensité du premier et I_0 celle du second. On définit la densité optique de la solution à étudier par : $D = \log(I_0/I)$, qui est toujours positif. La densité optique d est proportionnelle à la longueur de la cuve et à la concentration molaire volumique du composé. Le coefficient de proportionnalité s'appelle le coefficient d'extinction molaire

$$e : D = e \cdot l(\text{cm}) \cdot c(\text{g/l})$$

e varie beaucoup. Au maximum d'absorption de chacun des corps suivant (λ_{max}) (Anonyme 5, 2006).

1.4. PHASE 4: LA QUANTIFICATION DE LA TENEUR EN RESIDUS

En principe, la méthode d'analyse de confirmation et/ou d'identification, basée sur la chromatographie liquide, peut être appliquée de manière quantitative (calibration au moyen d'un standard interne ou au moyen d'une courbe standard à différentes dilutions).

Le choix des antibiotiques analysés est basé sur la disponibilité sur le marché de dosages immuno-chimiques ou d'autres tests biochimiques. Quant aux analyses de confirmation, elles sont réalisées par des méthodes d'analyses physico-chimiques.

Les substances antibactériennes les plus souvent rencontrées dans les tissus et produits animaux appartiennent à l'une des sept familles d'agents antibactériens : les b-lactames, (fluoro)quinolones, macrolides, phénicolés, tétracyclines, aminoglycosides et les Sulfonamides (Maghuin-rogister et al, 2001).donc on peut résumé la stratégie analytiques dans la figure 10:

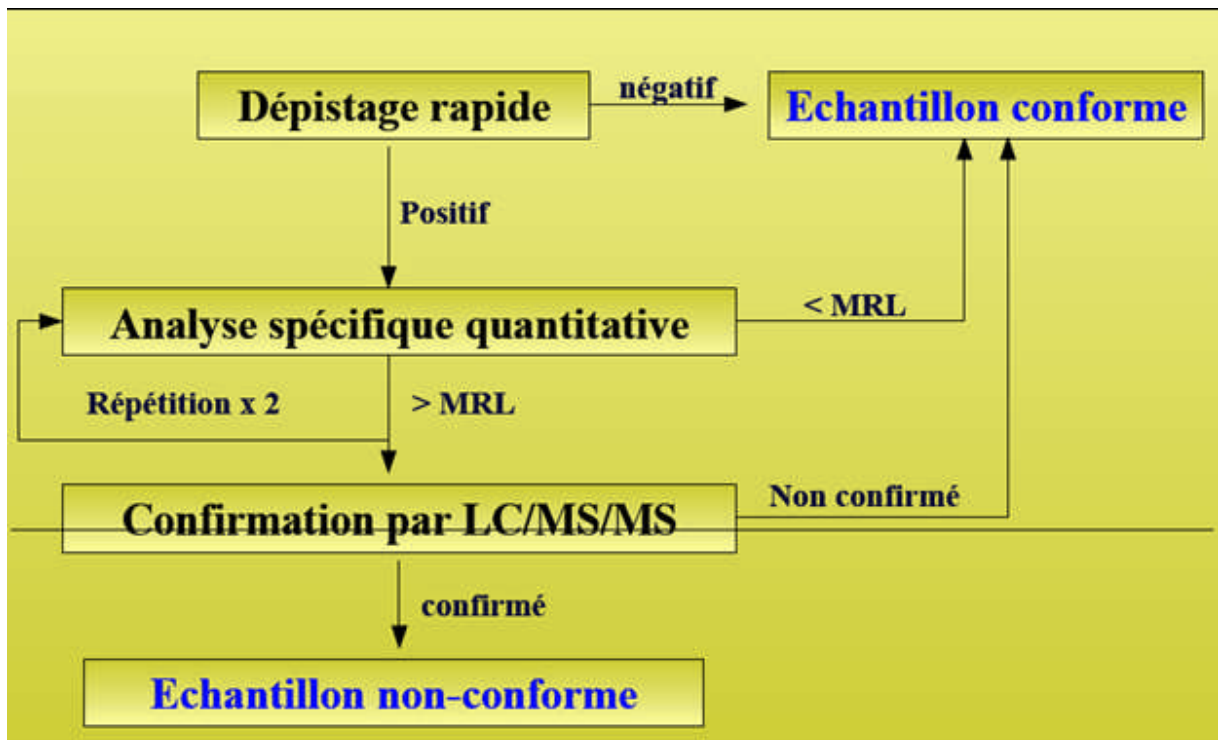


Figure n° 10 : Stratégie analytiques (Anonyme 7, 2006).

CHAPITRE V

LA CHROMATOGRAPHIE

La plupart des méthodes qu'on a cité dans le chapitre précédent sont des méthodes plutôt de détection. Ils ne permettent pas de quantifier réellement les résidus d'antibiotiques raison pour la quelle nous avons opté pour la chromatographie liquide haute performance.

1. HISTORIQUE

Le nom de chromatographie dérivé du mot grec khrôma qui signifie couleur. La première chromatographie a été réalisée par le botaniste russe Tswett, en 1905. Pour reproduire une expérience inspirée de celle qu'il avait effectuée, on utilise le montage ci-dessous, qui permet de séparer les pigments d'une feuille d'épinard.

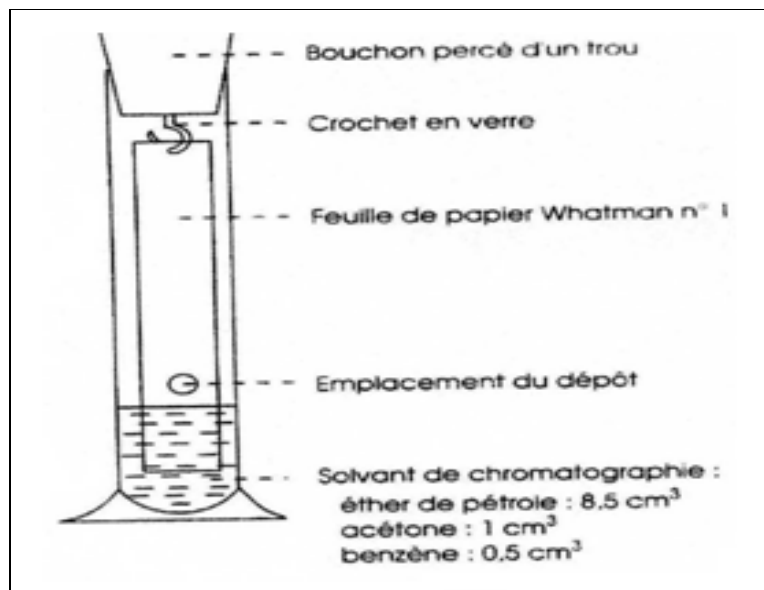


Figure n° 11: Expérience inspirée de celle de Tswett (Audigié et al, 1995).

Le dépôt est obtenu en écrasant, sur l'emplacement prévu à cet effet, un disque de 0.5 cm de diamètre découpé dans la feuille, à l'aide d'un agitateur en verre le chromatogramme est mis en place dans la cuve préalablement saturées pendant 30 mn, le solvant monte le long de la feuille de papier par capillarité. Le solvant est la phase mobile, la feuille de papier constitue la phase stationnaire. Les différents pigments migrent à des vitesses différentes est lorsque le front du solvant

atteint la partie supérieure de chromatogramme, on note la position des spots (figure 12)

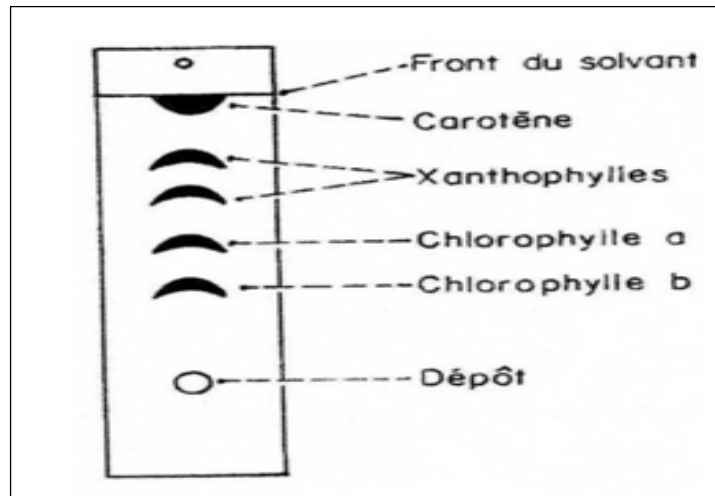


Figure n° 12: chromatogramme des pigments d'une feuille d'épinard (Audigié et al, 1995).

Tandis que l'on perfectionnait la méthode primitive de chromatographie d'adsorption, d'autres chercheurs s'appliquaient à découvrir de nouveaux procédés chromatographiques basés sur des principes physiques différents. L'avènement des méthodes modernes de détection a également contribué à l'éclosion de plusieurs modes de chromatographie différents. Actuellement, certains types de chromatographe permettent la détection de quantités aussi infimes que des parties par billion (ppb) de composés. La découverte des principaux modes de chromatographie apparaît dans la liste suivante par ordre chronologique :

- la chromatographie sur couche mince (CCM) (1938). (TLC : Thin Layer Chromatography)
- la chromatographie sur papier (1944).
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG) (1952). (GC : Gas Chromatography)
- la chromatographie sur gel (1959).
- la chromatographie liquide haute pression (CLHP) (1967). (HPLC: High Pressure Liquid Chromatography) (Salghi, 2003).

2. DEFINITION

La chromatographie est une méthode physique de séparation non destructrice en son principe basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile (Anonyme 5, 2006),

il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces deux types de phase ; le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe, qui va les séparer les unes des autres (Anonyme 15, 2008).

La proportion de molécule dans la phase stationnaire et mobile dépend des forces d'interaction relatives entre la phase stationnaire et molécules, sauf dans le cas de la chromatographie d'exclusion. Selon la nature des interactions, on a divers types de chromatographie qui sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau n°10 : Les différents types des chromatographies (Burgot et Burgot, 2002).

Types de chromatographies	Interactions mises en jeu
Absorption ou phase directe	Polaires
Phase inverse	Hydrophobes
Interactions hydrophobes	Hydrophobes
Echange d'ions	Eléctrostatiques
Affinité	spécifiques
Exclusion	Pas d'interactions

3. NATURE DES PHASES

3.1. PHASE FIXE

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitée, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie haute performance ou HPLC) ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince ou CCM)

La phase fixe peut aussi être constituée par un liquide imprégnant un support solide ou encore par une chaîne carbonée fixée sur un support (phase greffée). Ainsi en chromatographie sur papier, la phase fixe est formée par l'eau que les molécules de cellulose du papier adsorbent, alors qu'en

chromatographie en phase gazeuse, elle est constituée d'un liquide peu volatil et thermiquement stable imprégnant un granulé poreux.

3.2. PHASE MOBILE

La phase mobile est:

- soit un gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse): la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur.
- soit un liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne): la phase mobile est appelée éluant.

4. BUTS DE LA CHROMATOGRAPHIE

On peut distinguer deux objectifs principaux:

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 5, 2006).

4.2. OBJECTIF PREPARATIF

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 kg / jour) et le procédé ne sera utilisé que pour préparer des substances rares, sensibles à la chaleur (protéines, etc...) (Anonyme 5, 2006).

5. LES TYPES DE CHROMATOGRAPHIES

Les différents types de chromatographies sont:

5.1. LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

La phase stationnaire forme une fine couche sur un support inerte (plaque de verre ou d'aluminium). la phase mobile migre de base en haut par capillarité (figure 13).



Figure n°13: Chromatographie sur couche mince (Anonyme 6, 2007)

5.2. LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Le principe de la séparation par C.P.G. consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. La phase stationnaire est constituée d'une colonne en matériau inerte de 0.1 à 0.32 mm de diamètre. La paroi de la colonne est greffée chimiquement, donnant un caractère plus au moins polaire à la colonne. La phase mobile est un gaz inerte (Azote, hélium, hydrogène) (Anonyme 5, 2006).

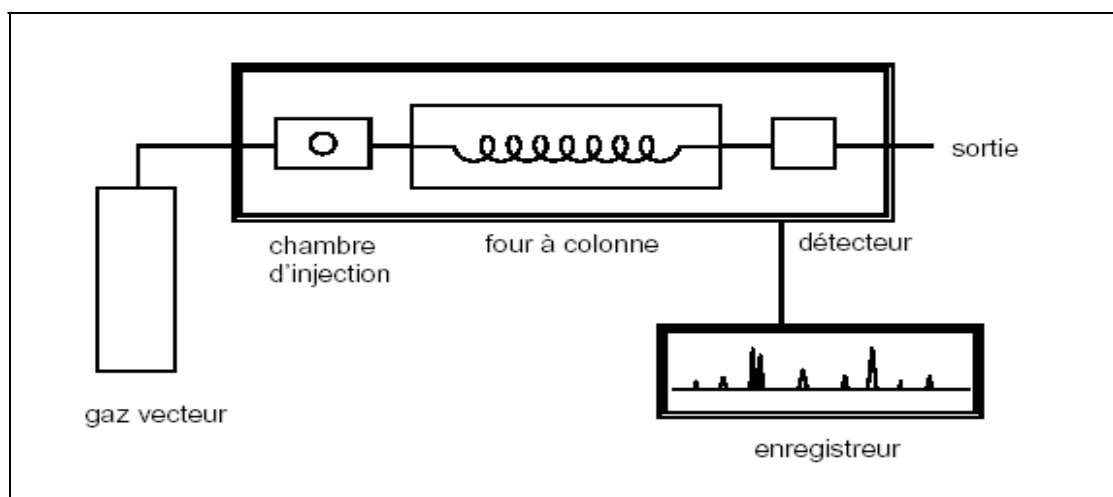


Figure n°14 : Chromatographe à gaz (Salghi, 2003).

5.3. LA CHROMATOGRAPHIS SUR COLONNE OUVERTE

Un tube de verre de section comprise entre 5 et 50 mm est rempli de phase d'une granulométrie comprise entre 50 et 500 μ m. La phase mobile se déplace de haut en bas par gravité (Anonyme 5, 2006).

5.4. LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise une sorte de tamis à l'échelle moléculaire, dit à permutation sélective. Les grosses molécules sont exclues du gel et sortent donc en premier de la colonne; les petites molécules cheminent dans les mailles du réseau et sont donc retardées. Le coefficient de partition s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion. Cette technique est encore appelée filtration sur gel ou perméation de gel selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique).

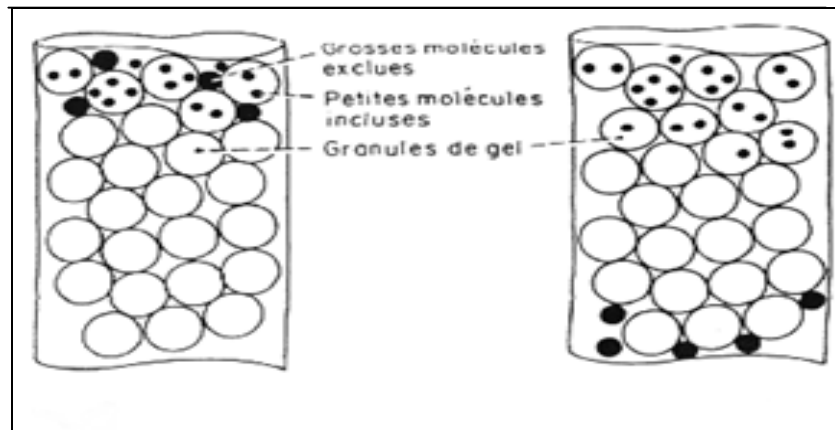


Figure n°15 : Schéma du tamisage moléculaire (Anonyme 5, 2006).

5.5. LA CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

La phase mobile est une solution tampon aqueuse et la phase stationnaire la plus courante est constituée de polystyrène sous forme de sphères de quelques micromètres de diamètre, lesquelles ont été chimiquement transformées en surface pour faire apparaître des sites ioniques. Ces phases permettent l'échange de leurs contre ions mobiles avec des ions, de même signe, présents dans la phase mobile. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases (Burgot et Burgot, 2002).

5.6. LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Il existe une interaction spécifique entre un ligand fixé à la résine de la colonne et un des constituants du mélange déposé (figure 16). Les interactions sont faibles et peuvent être rompues par augmentation de la force ionique ou modification du pH du milieu (Anonyme 5, 2006).

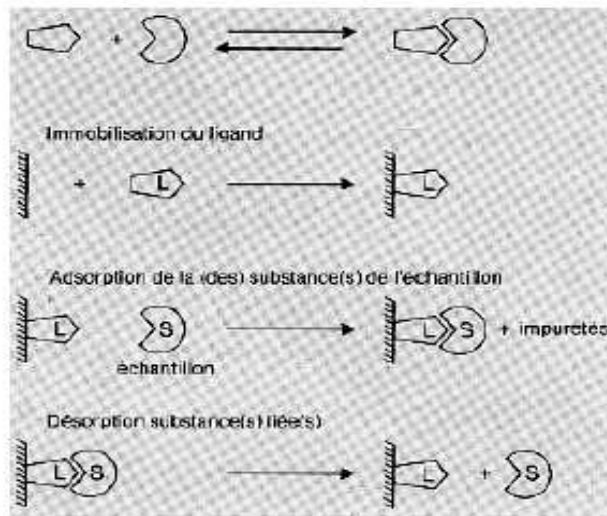


Figure n°16 : le principe de la chromatographie d'affinité (Anonyme 3, 2005).
 Les trois derniers types chromatographiques sont illustrés dans la figure 17 :

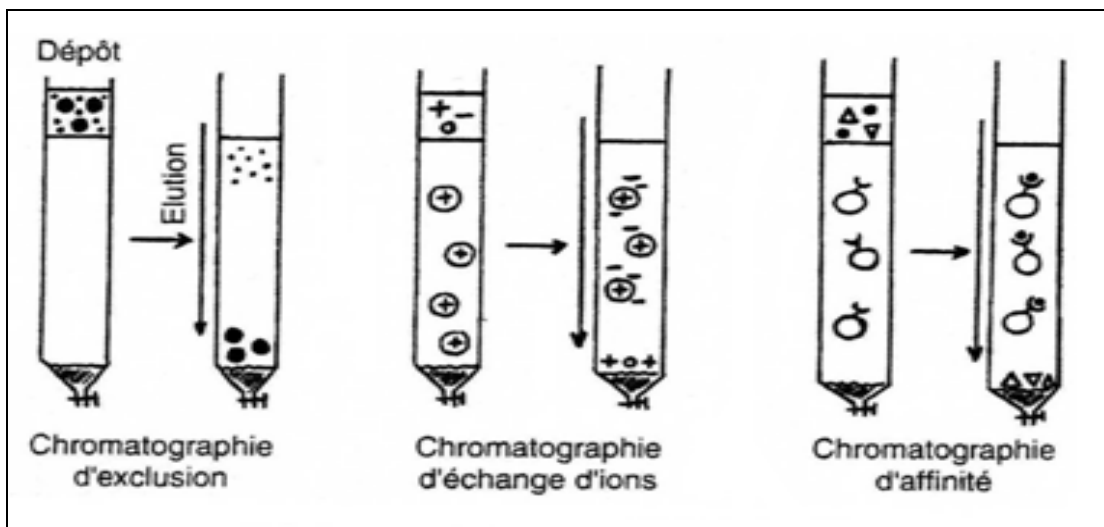


Figure n° 17: Différentes techniques chromatographiques (Burgot et Burgot, 2002)

5.7. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

La phase stationnaire, constituée de billes de granulométrie entre 3 et 50 μm est compactée sous pression dans une colonne en métal inoxydable. La phase mobile se déplace dans la colonne sous pression à l'aide d'une pompe.

La chromatographie liquide haute performance, utilisés en routine depuis 1995 a réduit au moyenne de 10 fois le temps nécessaire à l'analyse de nombreux composés biochimiques. On est passé à des durées de quelques minutes alors qu'auparavant une chromatographie requérait quelques dizaines de minutes.

Le Gain de temps et haut pouvoir de résolution sont les maîtres mots de cette technologie (Audigié et al, 1995).

5.7.1. DESCRIPTION

- L'HPLC n'est pas un principe en soi, chaque type de support permet de réaliser une chromatographie dont le principe est déjà connu et appliqué en pression ambiante: adsorption, exclusion- diffusion, ionique, phase inversée, etc.

- L'HPLC se distingue des systèmes classiques par une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide et l'accroissement du nombre des plateaux théoriques (Audigié et al, 1995).

- L'HPLC est caractérisé par un fluide appelé phase mobile parcourt un tube appelé colonne.

Cette colonne peut contenir des "granulés" poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne.

- Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne.

De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi élués de la colonne les uns après les autres et donc séparés.

- Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme. En effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic.

- Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté.
- Comme pour la chromatographie en phase gazeuse, la chromatographie liquide haute pression s'effectue avec un appareil commercial, dont les principales composantes sont vendues en modules séparés, ou incorporées dans la chromatographie, tel qu'illustré dans le schéma 18:

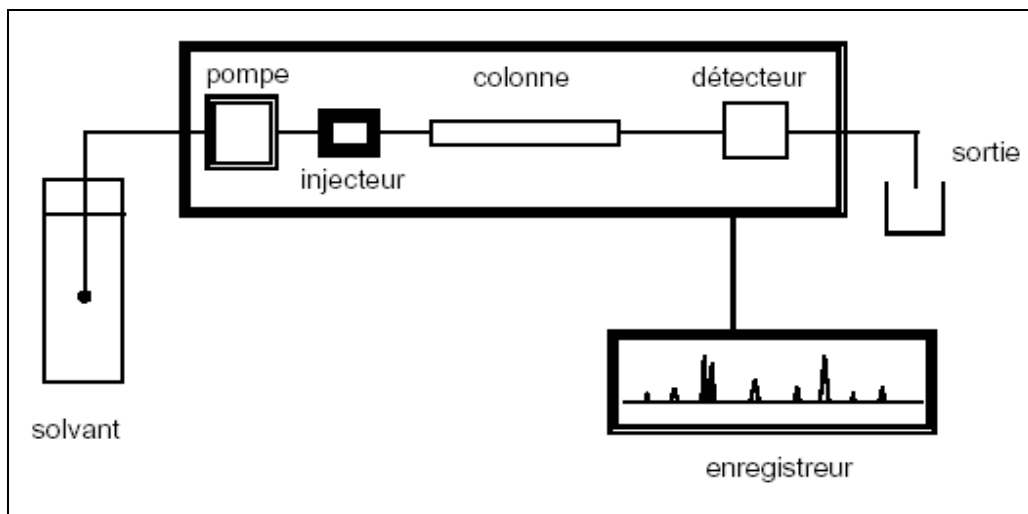


Figure n°18 : chromatographe HPLC. (Salghi, 2004).

5.7.2. LES DOMAINES D'APPLICATION

La chromatographie liquide haute performance a pour objet plus une analyse quantitative que qualitative car il paraît difficilement envisageable de balayer tout l'intervalle de longueur d'onde accessible pour détecter n'importe quel produit contenu dans la solution étudiée.

- L'HPLC se développe de plus en plus pour des très nombreuses molécules (hormones, vitamines, médicaments, ...). C'est un appareil de base indispensable dans tous les laboratoires de recherches.
- L'HPLC est aussi employé en cosmétologie elle permet l'analyse soit des substances thermiquement instable soit des substances peu volatiles, soit encore des substances ionisées
- Les molécules d'intérêt biologique comme les vitamines, les sucres et les acides aminés peuvent être analysés directement sans passer par la formation de dérivés, et la séparation des protéines et de polymères synthétiques peut être réalisée même si leur masse est élevée (Anonyme 5, 2006).

5.7.3. L'APPAREILLAGE

Un chromatographe liquide haute pression comporte une ou plusieurs pompes qui propulse l'éluant dans une colonne analytique.

L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques μl) dans l'éluant sous pression.

Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un logiciel assure l'acquisition et le traitement des données (Audigié et al, 1995).

Tableau n °11 : Principaux solvants en HPLC (Salghi, 2004).

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

5.7.3.1. Un réservoir de solvant (éluant)

Il contient la phase mobile en quantité suffisante.

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui doit être de pureté analytique et filtré pour éliminer les particules solides qui risqueraient d'endommager la pompe ou de bloquer la colonne. Le filtre, en acier inoxydable d'une porosité de 2 μm , est placé à l'extrémité dans le réservoir à solvant (Salghi, 2004).

Plusieurs flacons d'éluant (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse (Anonyme 5, 2006).

5.7.3.2. La pompe

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant (figure 19). Elle permet de travailler:

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse, on utilise une pompe simple, réglable en pression, ou en débit.

- en mode gradient (de polarité, de force ionique, ou de PH), c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluant.

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min (Audigié et al, 1995 ; Salghi, 2004 ; Anonyme 5, 2006)

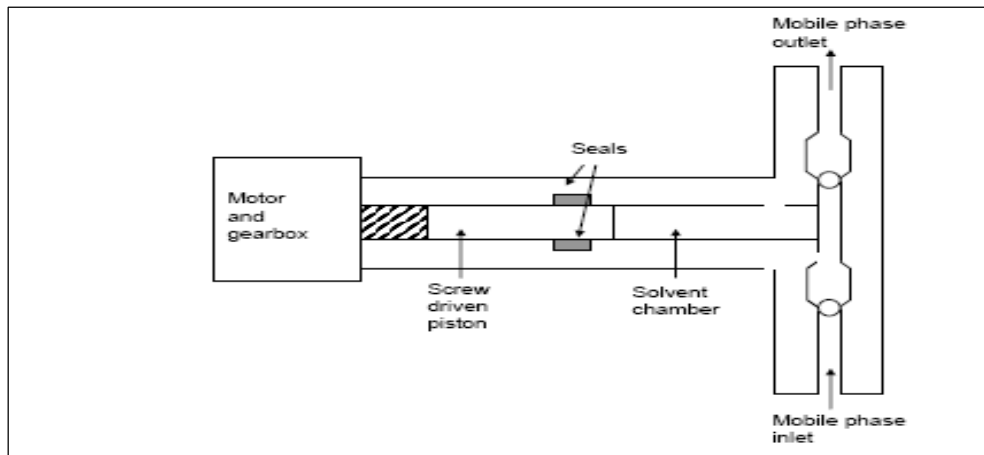


Figure n°19 : Schéma d'une pompe en HPLC (Salghi, 2004).

5.7.3.3. Vanne d'injection

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de $20\mu\text{l}$. 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.

Comme la pression dans le circuit pompe colonne est très élevée, on utilise un moyen indirect pour introduire l'échantillon à l'entrée de la colonne (Anonyme 5, 2006).

Celui-ci est d'abord introduit à l'aide d'une seringue dans un injecteur à boucle externe, en position LOAD. On injecte toujours un volume supérieur à celui de la boucle, en prenant soin de ne pas introduire de bulles d'air dans la boucle. En tournant la valve en position INJECTE, seul le contenu de la boucle est dirigé en tête de colonne (figure 20). Cette méthode d'injection a l'avantage de donner des résultats très reproductibles, d'une injection à l'autre.

Pour réaliser une injection dans des bonnes conditions, il convient :

- de ne pas surcharger la colonne; si l'échantillon est trop important on aboutit à des pics très larges et des phénomènes de traîne, autant de facteurs qui concourent à diminuer le pouvoir de résolution de la chromatographie (Salghi, 2004).
- d'injecter très rapidement. La durée d'une injection est égale à :

t (secondes) = Volume de la boucle (μl) / Vitesse du flux ($\mu\text{l/s}$)

Pour injecter rapidement on injecte des échantillons de faible volume (Audigié et al, 1995).

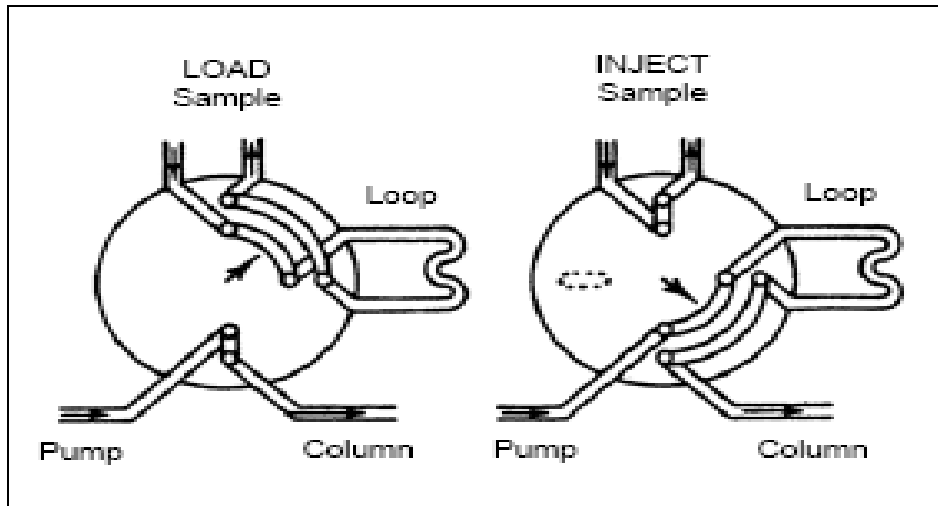


Figure n° 20 : Schéma d'un injecteur à boucle externe (Salghi, 2004)

5.7.3.4. La colonne

La colonne est la partie la plus importante du système, puisque c'est à cet endroit que se fait la séparation des composés. Les colonnes sont en acier inoxydable, de longueur variant de 5 à 25 cm avec un diamètre interne de 4 à 4,6 mm. Ces colonnes sont remplies de la phase stationnaire, dont le diamètre des particules varie de 3 à 10 μm . Des compagnies se spécialisent dans la vente de colonnes pour HPLC.

Pour éviter l'obstruction et la détérioration des colonnes par les contaminants, on place habituellement une colonne de garde plus petite et moins dispendieuse au sommet de la colonne principale. Les colonnes de garde doivent être changées régulièrement (Salghi, 2004).

5.7.3.5. La phase stationnaire

5.7.3.5.1. 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.

5.7.3.5.2. La phase inverse

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée 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, Me OH, 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.

5.7.3.6. 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.

Les silices greffées conduisent en général à une perte importante de polarité. Avec une phase greffée, l'ordre d'éluion est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. On réalise des gradients d'éluion en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant (ex : mélange eau /acétonitrile dont la concentration en acétonitrile va en croissant au cours de l'éluion).

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'éluion de la phase mobile (Anonyme 5, 2006).

5.7.3.7. Détecteurs

Le détecteur est placé à la sortie de la colonne chromatographique et doit être capable de détecter les composés qui sortent de la colonne. Le signal est converti en impulsion électrique qui est transmise à l'enregistreur. Comme en chromatographie en phase gazeuse, les détecteurs utilisés en chromatographie liquide haute pression doivent posséder certaines qualités, dont les principales sont

- une grande sensibilité
- une réponse linéaire sur une gamme de concentration élevée

- une capacité à détecter le plus de produits possible (Salghi ,2004).

Les principaux détecteurs utilisés en HPLC sont :

5.7.3.7.1. Détecteur UV- visible

Il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne (Audigié et al, 1995). Et opère à longueur d'onde constante, celle-ci ayant été fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190-350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisé à la longueur d'onde non variable de 254 nm.

Pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que:

- le produit à détecter absorbe la lumière à une longueur d'onde accessible à l'appareil, et que son coefficient d'absorption soit suffisamment grand ;
- la phase mobile n'absorbe pas la lumière à la longueur d'onde choisie par l'opérateur.

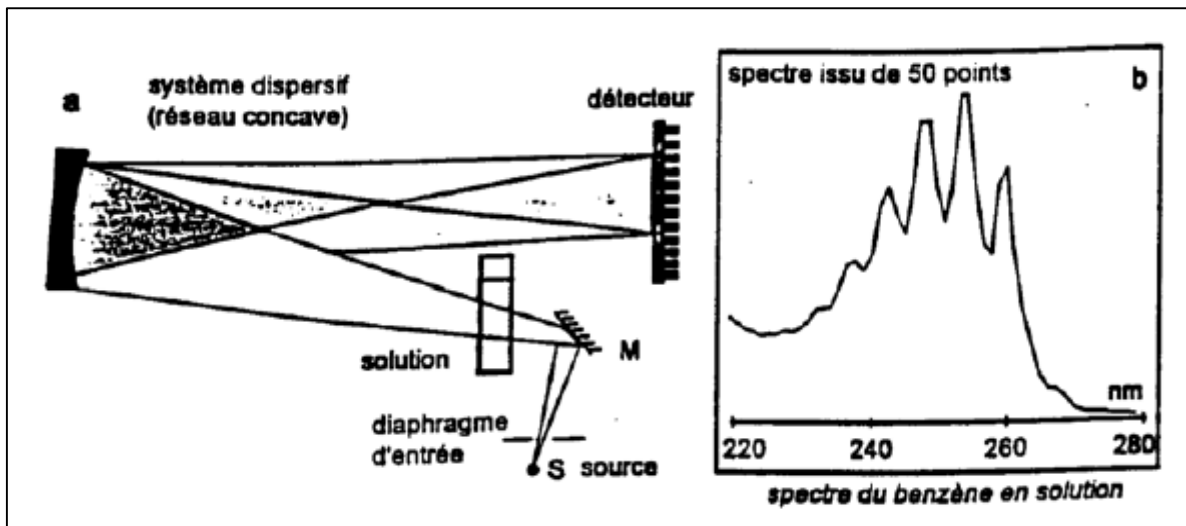


Figure n°21: Principe du détecteur UV (Anonyme 5, 2006).

5.7.3.7.1. Détecteur à indice de réfraction

Le détecteur mesure l'indice de réfraction du liquide sortant de la colonne. C'est un détecteur universel puisque l'indice de réfraction de l'éluant est modifié lorsqu'un composé, quel qu'il soit, sort de la colonne. Il donne une réponse similaire pour les composés de la même famille (ex. : sucres), mais son principal inconvénient est sa faible sensibilité (Salghi, 2004).

Ce détecteur exclut les variations de la composition de la phase mobile ; il n'est donc possible de travailler qu'en mode isocratique avec ce détecteur.

Les données sont collectées par l'intermédiaire soit d'un intégrateur ou d'une station d'acquisition (Anonyme 5, 2006).

La figure suivante représente le trajet optique de détecteur à indice de réfraction

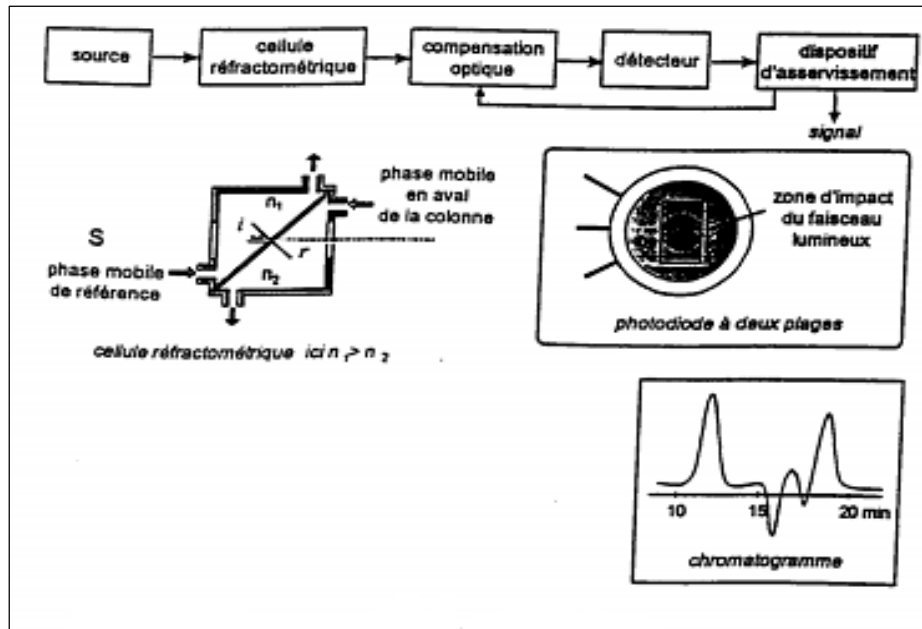


Figure n°22 : Trajet optiques détecteur du IR (Anonyme 5, 2006).

5.3.7.8. Enregistreurs

Les enregistreurs sont les mêmes que ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse. Les logiciels d'application, comme le Millennium, sont également utilisés en HPLC (Salghi, 2004).

PARTIE EXPERIMENTALE

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 pénicilline G dans la viande rouge, il est impératif d'optimiser les paramètres d'analyse à savoir, la phase stationnaire, la phase mobile, la longueur d'onde, le débit de la phase mobile et le volume injecté.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. MATERIELS UTILISES

1.1.1. L'HPLC (CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE)

Dans l'ensemble le matériel est constitué d'un appareil HPLC, d'un ordinateur et d'un dispositif de filtration.

Ces machines sont reliées par une fiche type LPT2.

1.1.1.1. Appareil HPLC

L'appareil utilisé est constitué des organes suivants :

- un dégaseur
- deux Pompes
- un détecteur et un intégrateur



Figure n°23 : appareil HPLC.

- le dégaseur

Le DGU-20A5 est un dégaseur en ligne qui utilise la membrane de fluoro-éthylène, sa capacité interne représente 1/25 de la valeur des autres modèles des dégaseur, et le temps d'attente ou remplacement et la stabilisation de phase mobile peuvent être sensiblement réduit

- deux pompes

C'est l'unité dissolvante de la livraison de la HPLC, elle est de type LC-10AT vp, conçue particulièrement pour des analyses des bio- molécules fragiles. Ce type de pompe maintient et protège facilement les échantillons à analyser contre l'interaction et la contamination délétères. La série LC-10AT est excellente pour séparer les échantillons biologiques .Le chemin d'écoulement de la phase mobile ne contient aucun ion, ce manque d'interférence d'ion, combiné avec la longévité du système et la résistance à la corrosion, assure des résultats fiables.

- le détecteur

Ce dispositif SPD-10AVvp à faible bruit et de grand choix dynamique assure l'exécution prouvée de la HPLC. Les données acquises par le SPD-10AVvp, sont transférées au contrôleur par un câble coaxial par l'intermédiaire d'une interface de fibre optique et sont digitalement traitées par le poste de travail.

- l'intégrateur

C'est le contrôleur du système utilisé au niveau de notre laboratoire désigné sous le nom de SCL-10Vvp; il commande directement tous les composants de série VP, son menu d'affichage est simplifié et facile à utiliser. Tous les modules du système de HPLC sont commodément reliés au contrôleur par des câbles de fibres optiques pour l'installation rapide de plug-and-play. L'interface de fibre optique permet la transmission des données a grande vitesse ce qui augmente la fiabilité et la sensibilité du système.

Une interface facultative permet au système multiple du HPLC d'être relié a un ordinateur muni d'un logiciel puissant de chromatographie (CLASS-VPTM) pour mieux analyser les graphes.

- la colonne

Les colonnes utilisées sont de type VP-ODS 250L*40, ce type a été développé pour répondre aux exigences des laboratoires pharmaceutiques et de contrôle de qualité.

- la boucle d'injection

Le volume maximum qu'on peut injecter dans cette vanne est de 20 µl et pour cela on utilise une seringue bien adaptée.

- la seringue

Sa forme ainsi que son aiguille permettent d'injecter les quantités de l'ordre de μl dans la vanne d'injection. Elle est de type spéciale HPLC, marque COSGE et sa capacité est de 1 à 50 μl .

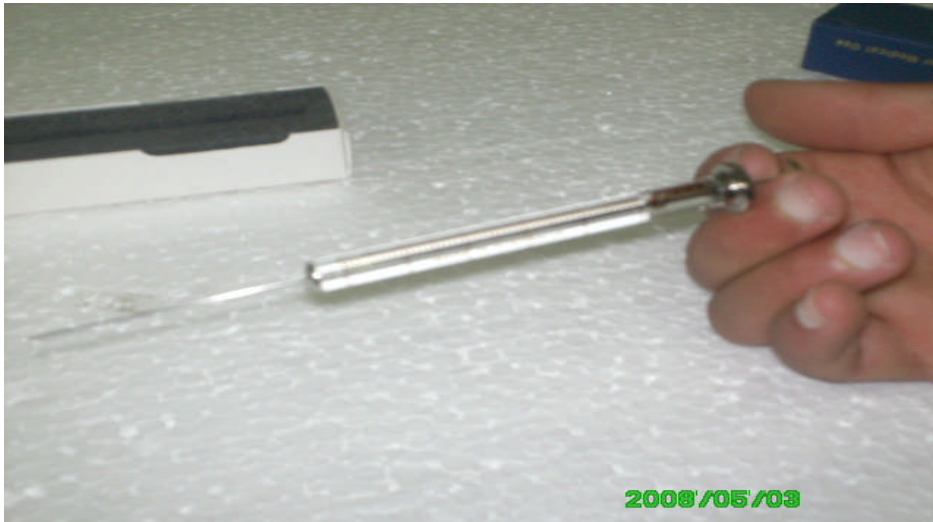


Figure n°24 : la seringue d'injection.

- les flacons

Ils sont en verre, ils sont au nombre de deux : le premier contient le solvant, et le deuxième recueille ce dernier après purgation dans la tuyauterie

- la tuyauterie

La tuyauterie de l'appareil est faite de trois types de tubes

- tuyau en plastique de calibre 1cm
- tuyau en plastique de calibre 0,5cm
- tuyau en plastique de calibre 2mm.

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

1.1.1.2. 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 artéfacts ou les pics parasites.



Figure n°25 : le dispositif de filtration.

1.1.2. L'ORDINATEUR

L'ordinateur joue un rôle d'intégrateur, grâce au logiciel intégré (CLASS VP) il nous permet de manipuler et d'analyser d'une manière très aisée le graphe obtenu.

1.1.3. REFRIGERATEUR

De marque : CALYPSO - : RT-405 °C

Permet de conserver les produits à analyser à des températures de 4° C pendant des durées variables.

1.1.4. BALANCE ANALYTIQUE

C'est une balance très sensible dont les caractéristiques sont :

- marque : SALTEC
- modèle: SPB31
- max : 210 g
- d : 0,1mg
- dare : 0,00000

1.1.5. ULTRASON

- MEMMET. Type : WB 22 (Réf.1501-0771)

Le bain ultrason est utilisé pour éliminer les bulles d'air qui sont trouvés dans les solutions liquides que nous avons préparé.



Figure n°26 : le bain l'ultra son.

1.1.6. PAPIERS FILTRES

De type SUPELCO (0.45 μ m x 4.7mm).

Ces papiers filtres sont utilisées pour filtrer l'acétonitrile ou le méthanol après chaque usage (la figure 27).



Figure n°27 : les papiers filtres.

1.1.7. MACRO PIPETTES

De type SOCOREX CALIBRA[®] 832

Macro pipette digitale est utilisée pour prélever les dissolvants et tous les solutions que nous avons utilisés pour réaliser notre travail (figure 28).



Figure n°28 : Macro pipette digitale.

1.1.8. FLACONS STERILES EN PLASTIQUE

Ces flacons sont utilisés pour les déluitions préparés.

1.2. PRODUITS CHIMIQUES ET STANDARDS

Tous les dissolvants utilisés sont spécifiques à la chromatographie liquide haute performance et les réactifs utilisés sont de type analytiques.

L'acétonitrile et le méthanol sont les produits chimiques le plus souvent utilisés. Tous les dissolvants et solutions ont été filtrés à l'aide de la membrane filtre et dégazés avant emploi.

1.2.1. CONSTITUANTS DE LA PHASE MOBILE

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

1.2.2. STANDARDS

- **standards antibiotiques:** deux types de standards purs ont été utilisés :

- oxytétracyclin Hydrochloride VETERANAL. (Réf. 46598. SIGMA-ALDRICH)
- Penicillin G potassium Salt VETERANAL 250mg. (Réf. 46609. SIGMA-ALDRICH)

- **standards phywe**

- anthracène
- tétracène
- acénaphène
- acénaphthylène

- **Caractéristiques chimiques du standard oxytétracycline**

- nom du produit : oxytétracyclin hydrochloride VETRANAL.
- il 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.

- **Caractéristiques chimiques du standard (penicilline G)**

- formule chimique : $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$
- masse molaire : 372.48 g/ mole
- nom du produit :

- nom du laboratoire fabricant : SIGMA-ALDRICH
- date de fabrication: 16 janvier 2004.
- date de péremption : 16 janvier 2010.

1.3. ECHANTILLONAGE

1.3. 1. PREPARATION DES SOLUTIONS MERES ET DES DILUTIONS

- **oxytétracycline:** deux solutions mères ont été préparées :

Dans la première nous avons mélangé 8 mg du standard pur (oxytétracycline) avec 20 ml de méthanol afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 0.4 mg/ml de diluant.

Dans la deuxième nous avons mélangé 4 mg du standard pur (oxytétracycline) avec 10 ml d'acétonitrile.

Par la suite nous avons fait plusieurs dilutions de l'ordre de : 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 de chacune des deux solutions mères.

- **pénicilline G:** deux solutions mères ont été préparées :

Dans la première nous avons mélangé 8 mg du standard pur pénicilline G avec 20 ml de méthanol afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 0.4 mg/ml de diluant.

Dans la deuxième solution nous avons mélangé 4 mg du standard pur pénicilline G avec 10 ml d'acétonitrile.

Par la suite nous avons fait plusieurs dilutions de l'ordre de : 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 de chacune des deux solutions mères.

1.4. PROTOCOLE GENERALE D'ANALYSE

Afin de détecter et de quantifier des résidus d'oxytétracycline et de pénicilline G dans la viande rouge, il est indispensable d'optimiser les paramètres d'analyse, à savoir:

- la phase stationnaire
- la phase mobile
- le débit
- le spectre d'absorption
- le volume injecté

1.4.1. REGLAGE DE L'APPAREILLAGE

il a fallu procéder avant d'entamer l'optimisation des paramètres la mise en marche de l'appareillage avec un composé (anthracène, acénaphène, pyrène, fluoranthène) spécialement préparé par le fournisseur PHYWEE dans des conditions bien déterminées.

1.4.2. FILTRATION DES CONSTITUANT DE LA PHASE MOBILE

L'acétonitrile et le méthanol utilisés dans l'HPLC doivent passer par le dispositif de filtration avant et après chaque utilisation.

1.4.3. OPTIMISATION DES PARAMETRES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES RESIDUS DE D'OXYTETRACYCLINE ET DE PENICILLINE G

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 : c'est la phase inverse
- le diluant : c'est le solvant dans le quel, le standard sera dissout
- la phase mobile : un solvant ou un mélange de solvants qui élue la solution injecté dans l'appareil.
- la boucle d'échantillonnage : la capacité de la boucle d'échantillonnage est de 20µl
- débit : exprimé en ml/min.
- spectre d'absorption : c'est la longueur d'onde dans la quelle l'antibiotique absorbe le maximum de la lumière
- la durée d'analyse : variable selon le temps de rétention de la molécule à analyser dans la colonne

1.4.4. TESTS DE NETTOYAGES

Entre les tests d'optimisation on fait toujours des tests de nettoyages afin de nettoyer la colonne et d'éviter les artefacts.

1.5. EXPRESSION DES RESULTATS

Nous résultats sont exprimés en μg et nous avons appliqués le test de student (Chibat, 2006) pour analyser nos résultats.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. REGLAGE DE L'APPAREILLAGE

Les paramètres d'analyse du mélange PHYWEE sont représentés dans le tableau 12.

Tableau n° 12: Conditions d'analyse du mélange PHYWEE utilisé pour régler l'appareillage.

Phase mobile	Méthanol
Phase stationnaire	Phase inverse (C18).
Longueur d'onde	254 nm (4 composants) et 270 nm (2 composants).
Débit	1.5 ml/min.
Quantité injectée	20µl.
Durée d'analyse	10 minutes.

Les résultats obtenus d'analyse du mélange PHYWEE utilisé pour régler l'appareillage sont représentés par les chromatogrammes de la figure

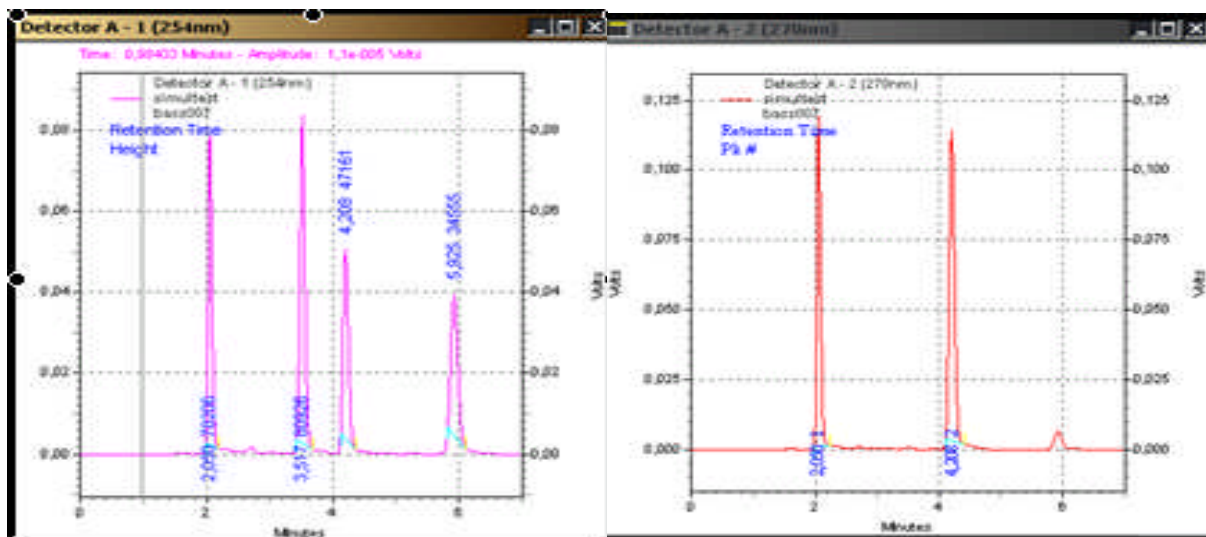


Figure n° 29 : Chromatogrammes obtenus par les standards PHYWEE.

2.2. FILTRATION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA PHASE MOBILE

Avant et après chaque utilisation d'acétonitrile ou de méthanol pour la phase mobile, il est impératif de les passer dans le dispositif de filtration afin d'éviter les pics parasites et les artefacts.

2.3. ESSAIS D'OPTIMISATIONS DES PARAMETRES DE DETECTIONS ET DE QUANTIFICATIONS DES STANDART D'OXYTETRACYCLINE ET DE PENICILINE G PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC).

Afin de détecter et de quantifier les résidus d'oxytétracycline et de pénicilline G dans les denrées alimentaires, il est impératif de fixer les paramètres d'analyse qui sont:

- phase mobile.
- phase stationnaire.
- boucle d'échantillonnage.
- débit.
- spectre d'absorption.

2.3.1. L'OXYTETRACYCLINE

2.3.1.1. L'optimisation propromendite

Avant d'entamer l'optimisation des paramètres de détection et de quantification de l'oxytétracycline il a fallu d'utiliser les paramètres prédéfinis par le producteur du standard de l'oxytétracycline (tableau 13).

Tableau n°13: Les conditions d'analyse préconisées par le fournisseur du standard oxytétracycline.

Phase mobile	-L'acétonitrile -Eau +0,1% de l'acide phosphorique
Phase stationnaire	Phase inverse (C18).
Longueur d'onde	264 nm
Débit	2 ml/min.
Quantité injectée	10µl.
Durée d'analyse	15 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,4 mg/ml

La figure 30 nous montre le pic obtenu par l'utilisation des paramètres prédéfinis par le producteur du standard de l'oxytétracycline

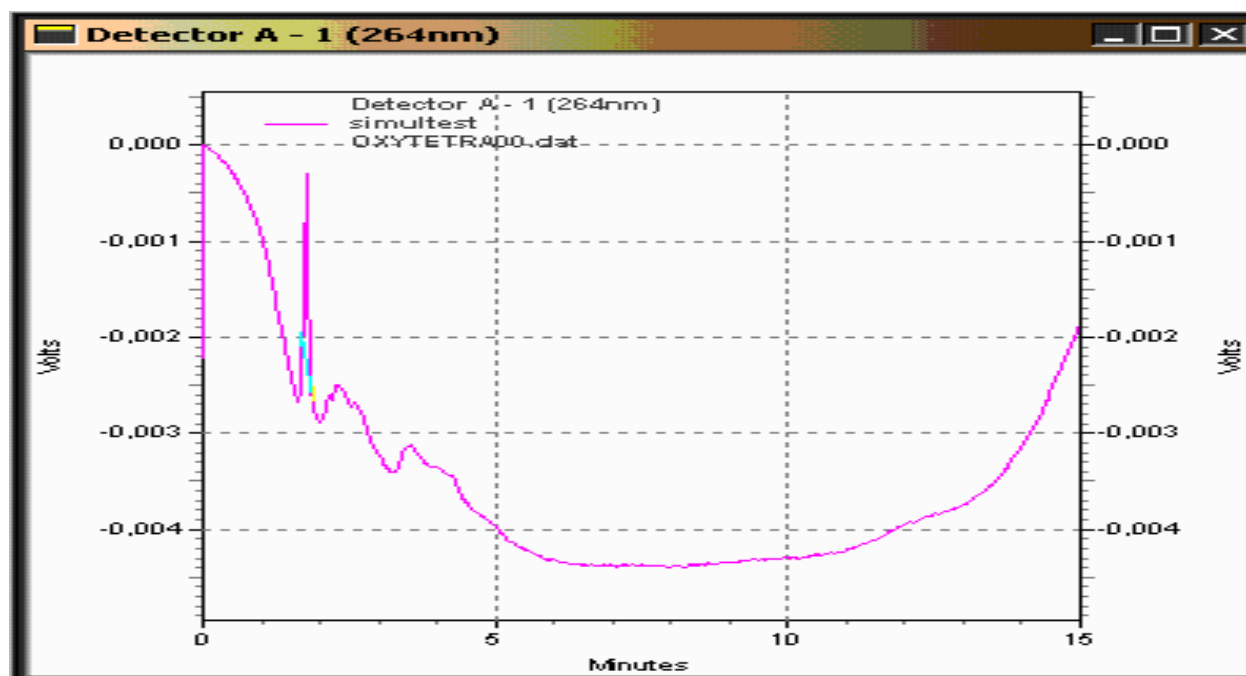


Figure n°30: Chromatogramme obtenu en appliquant les paramètres d'analyse recommandés par le fournisseur du standard oxytétracycline.

Les paramètres préconisés par le standard d'oxytétracycline ne sont pas exploitables pour nos conditions d'analyses et de ce fait nous avons été contraints d'optimiser chacun des différents paramètres d'analyse.

2.3.1.1.1. Phase stationnaire

Une seule phase stationnaire a été utilisée, il s'agit de la phase inverse C18, qui est constituée de molécules hydrophobes greffées sur de la silice.

La colonne utilisée est de type VP-ODS 250 L x 4

Ce type de colonne a été développé pour répondre aux exigences des laboratoires pharmaceutiques et de contrôle de qualité.

2.3.1.1.2. La phase mobile

Pour l'optimisation de ce paramètre, 115 essais ont été effectués,

Nous avons utilisés deux phases mobiles : l'une est constituée de méthanol (85 essais), l'autre d'acétonitrile (30 essais).

Les autres paramètres sont fixés (tableau 14) et les chromatogrammes obtenus dans nos conditions d'analyse sont représentés par la figure 36 :

Tableau n°14 : Les conditions d'analyse pour l'optimisation de la phase mobile

Phase mobile	Méthanol Acétonitrile.
Phase stationnaire	Phase inverse (C18).
Longueur d'onde	320 nm
Débit	1.5 ml/min.
Quantité injectée	12µl.
Durée d'analyse	4 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,4 mg/ml
Diluant	Méthanol

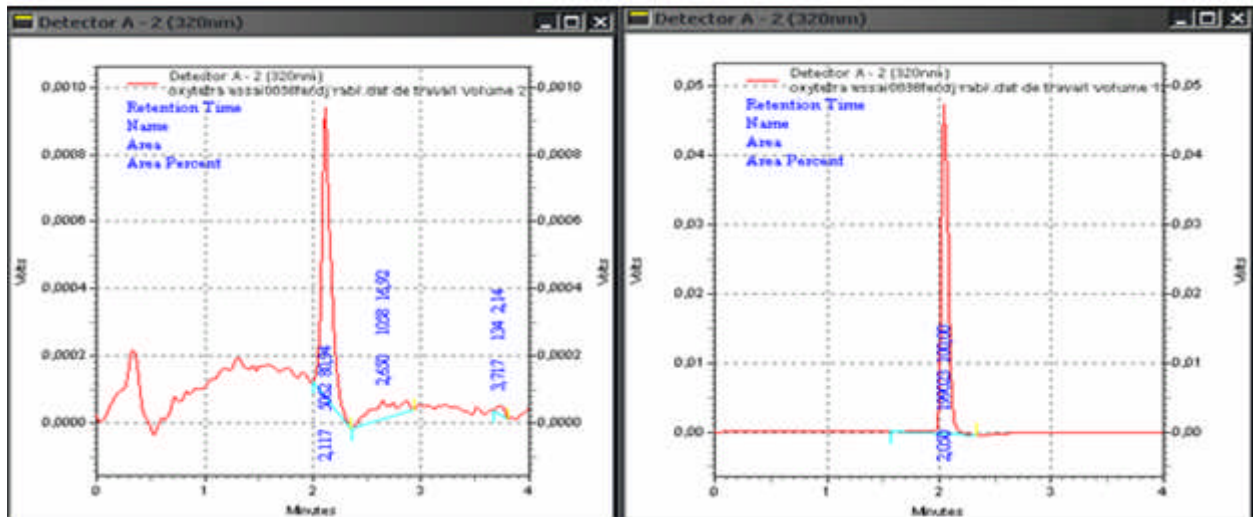


Figure n° 31 : Chromatogrammes obtenus durant l’optimisation de la phase mobile

A droite : Chromatogramme phase mobile acétonitrile.

A gauche : Chromatogrammes phase mobile méthanol.

La figure 31 montre clairement que la phase mobile d'acétonitrile permet d'obtenir du meilleur chromatogramme que celui de méthanol cela signifie que le standard d'oxytétracycline est élué bien par l'acétonitrile

Senyuva et al, 2000 ont adopté l'acétonitrile comme phase mobile pour la détermination des résidus d’oxytétracycline dans les produits de la viande.

Cependant d'autres auteurs tel que Babié et al, 2004, ils ont adopté comme phase mobile un mélange composé de (acide oxalique – méthanol – acetonitrile) pour l’extraction de la phase solide et la détermination des produits pharmaceutiques vétérinaires dans les eaux usées par HPLC alors que Xiaofeng et al 2004 ont utilisé un mélange d'acide formique, méthanol et d’acétonitrile pour la préparation et la détection des résidus d’antibiotiques sur le gelé royal par l’HPLC.

2.3.1.1.3. Volume injecté

Pour l’optimisation de ce paramètre, (65) essais ont été effectués avec des volumes injectés variable (varie de 1 jusqu’à 20µl) et les autres paramètres sont stables (tableau 15) :

Tableau n°15 : Les conditions d'analyse pour l'optimisation du volume injecté

Phase mobile	Acétonitrile.
Phase stationnaire	Phase inverse (C18).
Longueur d'onde	320 nm
Débit	1.5 ml/min.
Quantité injectée	1-20 µl.
Durée d'analyse	4 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,4 mg/ml

La figure 32 nous montre deux exemples des pics obtenus durant l'optimisation du volume injecté dans nos conditions d'analyse.

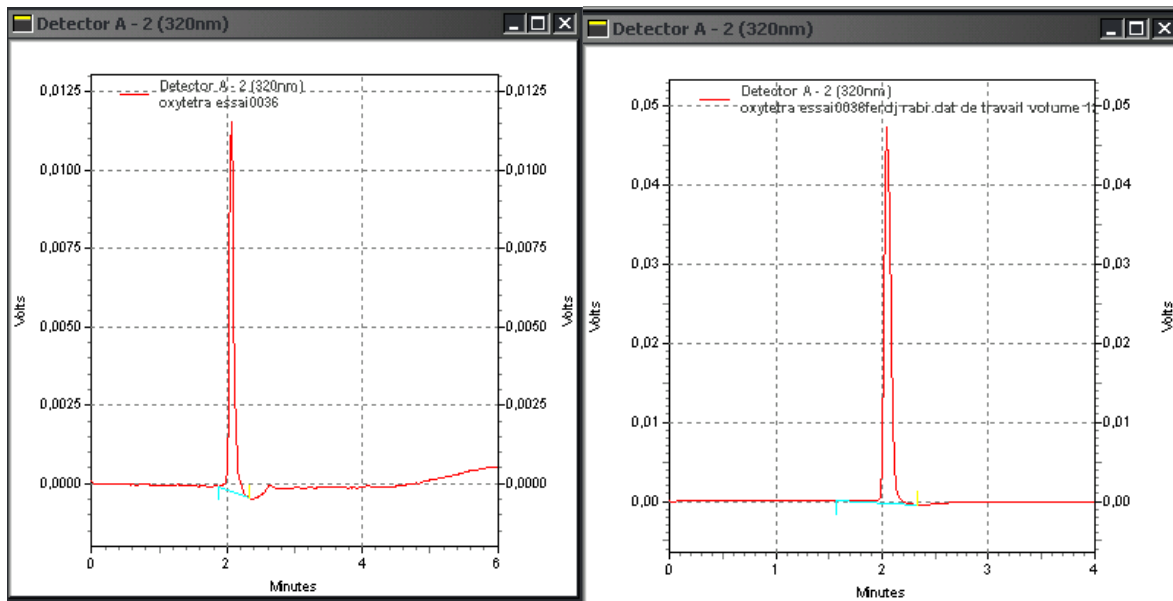


Figure n° 32 : Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du volume injecté.

A droite : Chromatogramme obtenu avec un volume de 11 µl.

A gauche : Chromatogramme obtenu avec un volume de 5 µl.

Les essais réalisés nous ont permis de fixer le volume d'injection à 11 µl, quantité injecté qui permet d'obtenir des meilleurs pics (figure 32).

D'autres auteurs ont adoptés des volumes différents tel que Senyuva et al, 2000; Babić et al, 2004, Oruc et Sonal, 2005 ; Charoenraks et al, 2005 ont utilisé un volume de 20 µl pour l'Analyse de la tétracycline par HPLC avec Amper Ometric détection.

Alors que Xiaofeng et al 2004 ont fixé avec un volume de 30 µl mais il faut préciser en premier lieu que notre boucle d'échantillonnage a une capacité maximale de 20 µl.

2.3.1.1.4. Débit

Pour l'optimisation de ce paramètre, (65) essais ont été effectués, nous avons testé différents débits (de 1 à 2 ml / min). Les conditions d'analyse sont illustrées dans le (tableau 16) et les exemples des résultats obtenus dans nos conditions d'analyse sont représentés dans la figure 33:

Tableau n°16: Les conditions d'analyse pour l'optimisation du débit.

Phase mobile	Acetonitrile
Phase stationnaire	Phase inverse (C18).
Longueur d'onde	344 nm
Débit	(1-1.5-1.7-2)ml/min.
Quantité injectée	1-20 µl.
Durée d'analyse	4 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,4 mg/ml

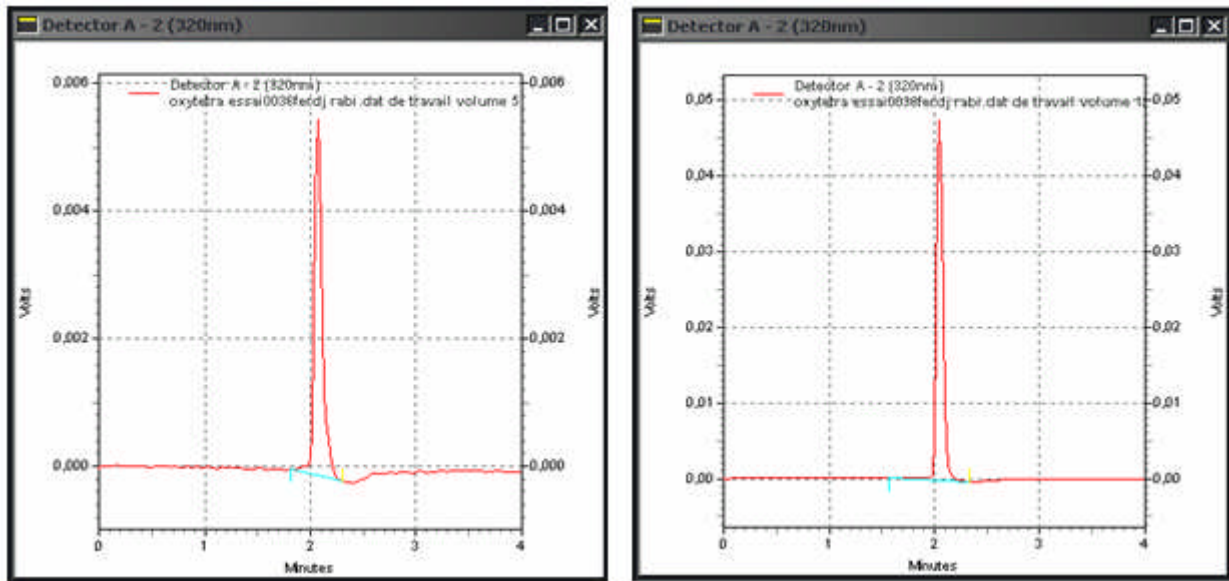


Figure n° 33 : Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du débit.

A droite : Chromatogramme obtenu avec un débit 1.5 ml/min.

A gauche : Chromatogramme obtenu avec un débit 1 ml/min.

La figure 33 montre que le chromatogramme obtenu avec un débit de 1.5 ml/min est meilleur que celui obtenu avec un débit de 1 ml/min.

Senyuva et al, 2000 ont adopté le débit 1.5 ml/min, alors que Babić et al, 2004 et al, 2005 et Oruc et Sonal, 2005 ont fixé un débit de 1 à 0.8 ml/min.

2.3.1.1.5. Spectre d'absorption

Plusieurs longueurs d'ondes ont été testées (de 264 nm jusqu'au 370 nm) et les autres paramètres sont fixés (tableau 17).

Tableau n°17: Les conditions d'analyse pour l'optimisation du spectre d'absorption.

Phase mobile	Acétonitrile
Phase stationnaire	Phase inverse (C18).
Longueur d'onde	(264-370) nm
Débit	1.5 ml/min.
Quantité injectée	1-20 µl.
Durée d'analyse	4 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,4 mg/ml
Diluant	Méthanol

La figure 34 illustre deux chromatogrammes qui ont été enregistré durant l'optimisation du débit dans nos conditions d'analyse.

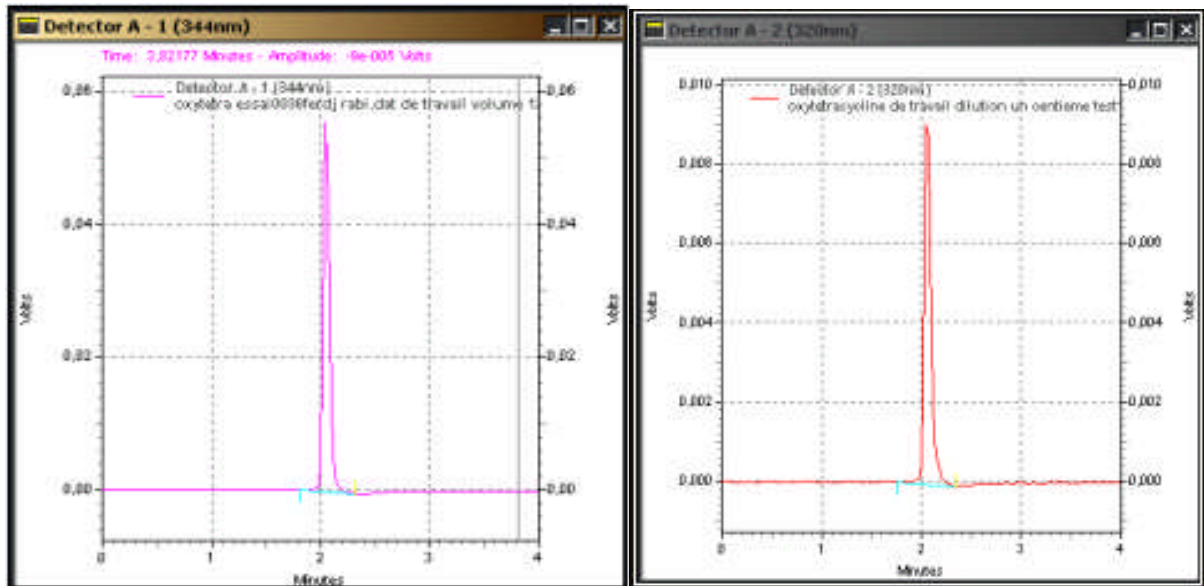


Figure n°34 : Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du Spectre d'absorption.

A droite : Chromatogramme obtenu avec un longueur d'onde 344 nm.

A gauche : Chromatogrammes obtenu avec un longueur d'onde 320 nm.

Les essais réalisés nous ont permis de fixer le spectre d'absorption de l'oxytétracycline est de l'ordre de 320 à 344 nm, les longueurs d'ondes qui permet d'obtenir des meilleurs pics (figure 34)

Senyuva et al, 2000; Oruc et Sonal, 2005 ; ont fixé un spectre d'absorption de 360 nm et 354 nm

2.3.1.1.6. Le diluant

Pour l'optimisation de ce paramètre, 22 essais ont été effectués: deux dilution ont été utilisées ; l'une est constituée de méthanol (12 essais), et l'autre d'acétonitrile (10 essais)

Les conditions d'analyse sont illustrées dans le (tableau 18) et les exemples des résultats obtenus dans nos conditions d'analyse sont représentés dans la figure 35:

Tableau n°18: Les conditions d'analyse pour l'optimisation du diluant.

Phase mobile	Acétonitrile
Phase stationnaire	Phase inverse (C18).
Longueur d'onde	344 nm
Débit	(1-1.5-1.7-2)ml/min.
Quantité injectée	1-20 µl.
Durée d'analyse	4 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,4 mg/ml
Diluant	-Acétonitrile -méthanol

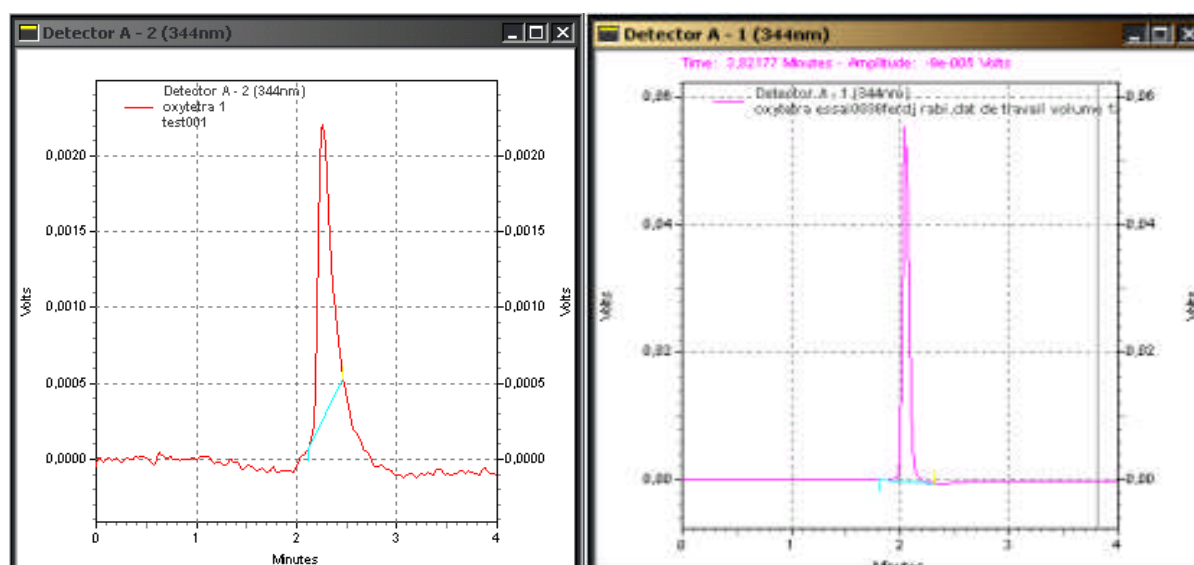


Figure n°35 : Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du diluant.

A droite : Chromatogramme obtenu avec un diluant acétonitrile

A gauche : Chromatogramme obtenu avec un diluant méthanol.

La figure 35 montre que le chromatogramme obtenu par un diluant méthanol est meilleur que celui obtenu par un diluant acétonitrile donc nous avons choisi le méthanol comme diluant pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline.

2.3.1.2. Tests de nettoyages

Entre les tests d'optimisation propromendite on a fait toujours des tests de nettoyages par le méthanol ou l'acétonitrile selon l'éluant utilisé et par les mêmes paramètres de l'essai encours afin de nettoyer la colonne et d'éviter les artefacts. La figure (36) montre deux chromatogrammes enregistrés au cours de deux essais de nettoyage.

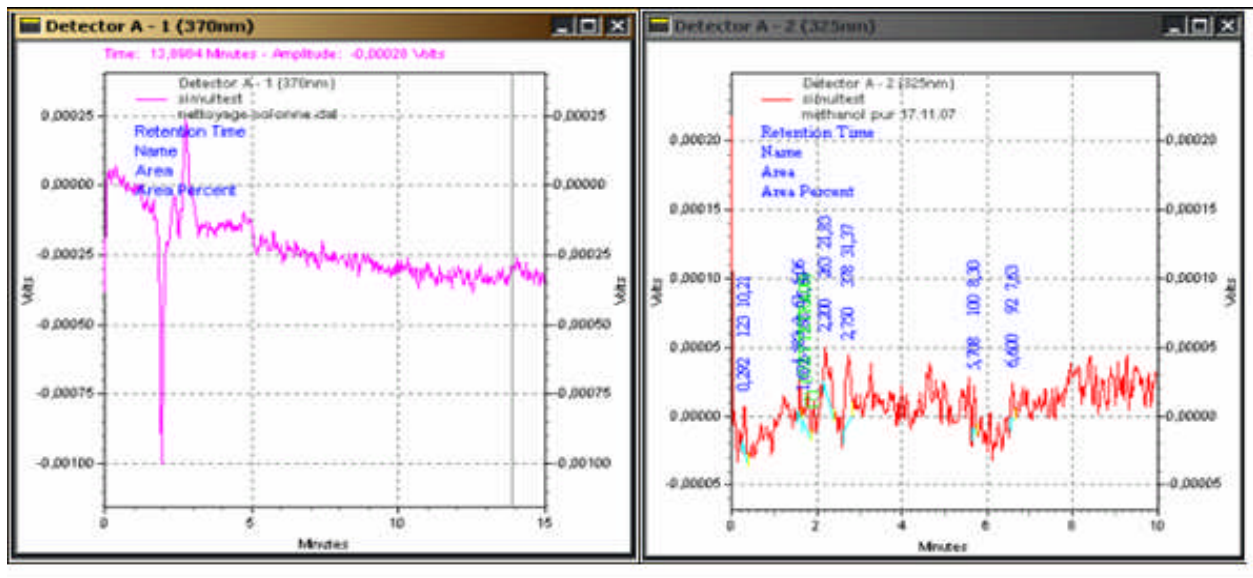


Figure n° 36 : deux exemples de chromatogramme enregistré durant les tests de nettoyage.

2.3.1.3. Analyse statistique

Les paramètres que nous avons optimisés seront le point de départ pour la deuxième étape qui consiste sur la vérification de la fiabilité de la méthode HPLC adaptée pour l'analyse,

2.3.1.3.1. La répétabilité

Pour la vérification de la répétabilité de la méthode nous avons effectuer 3 séries contient 18 tests dans le même jour et nous avons calculé la moyenne, l'écart type, et le Coefficient de variation

Les résultats obtenus pour la vérification de la répétabilité de l'oxytetracycline sont figuré dans le tableau 1 (annexes).

L'analyse statistique a été réalisée à partir de ces moyennes logarithmiques par l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1%

Tableau n°19: l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% pour la vérification de la répétabilité.

Séries	(1-2)	(2-3)	(1-3)
t calculé	0,09	0,53	0,42
t table au 5%	1251,11	1204,67	1068,17
t table au 1%	1644,24	1583,21	1403,82
NS /DS	NS	NS	NS

DNS : différence non significatif si **t calculé** < **t table**

DS : différence significatif si **t calculé** > **t table**

L'analyse statistique montre qu'il n'y pas une différence significative entre les trois séries, cela signifie que nos tests sont répétables.

Les essais de répétabilité réalisés dans le même jour ont conduit à des coefficients de variation varie entre 5,35 - 6,32 %.

2.3.1.3.2. Reproductibilité

Pour la vérification de la reproductibilité de la méthode nous avons effectué une série, chaque série contient 20 tests et nous avons calculé la moyenne, l'écart type, et l'intervalle de confiance entre ces séries.

Les résultats obtenus pour la vérification de reproductibilité de la l'oxytetracycline sont figuré dans le tableaux 2 (annexes)

L'analyse statistique a été réalisée à partir de ces moyennes logarithmiques par l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% (tableau 20).

Tableau n°20: l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% pour la vérification de la reproductibilité.

Séries	(1-2)	(2-3)	(1-3)
t calculé	0,85	1,12	0,27
t table au 5%	952,96	1100,09	925,45
t table au 1%	1252,4	1445,77	1216,24
NS /S	NS	NS	NS

L'analyse statistique montre qu'il n'y pas une différence significative entre les trois séries, cela signifie que nos tests sont reproductibles.

Les essais de reproductibilité réalisés sur 3 jours sur la même concentrations ont conduit à des coefficients de variation varie entre 4,88% - 5,91%

2.3.1.3.3. L'établissement d'une courbe de calibration

La linéarité de la méthode est vérifiée sur 4 points de gamme d'étalonnage à des concentrations croissantes (quatre dilutions à partir de la solution mère d'oxytétracycline) (tableau 22).

Tableau n°21: dilutions issus de la solution mère d'oxytétracycline avec les surfaces correspondantes.

Le niveau	Les dilutions (mg/µl)	Les surfaces
1	1	122812
2	2	298434
3	3	527862
4	4	860539

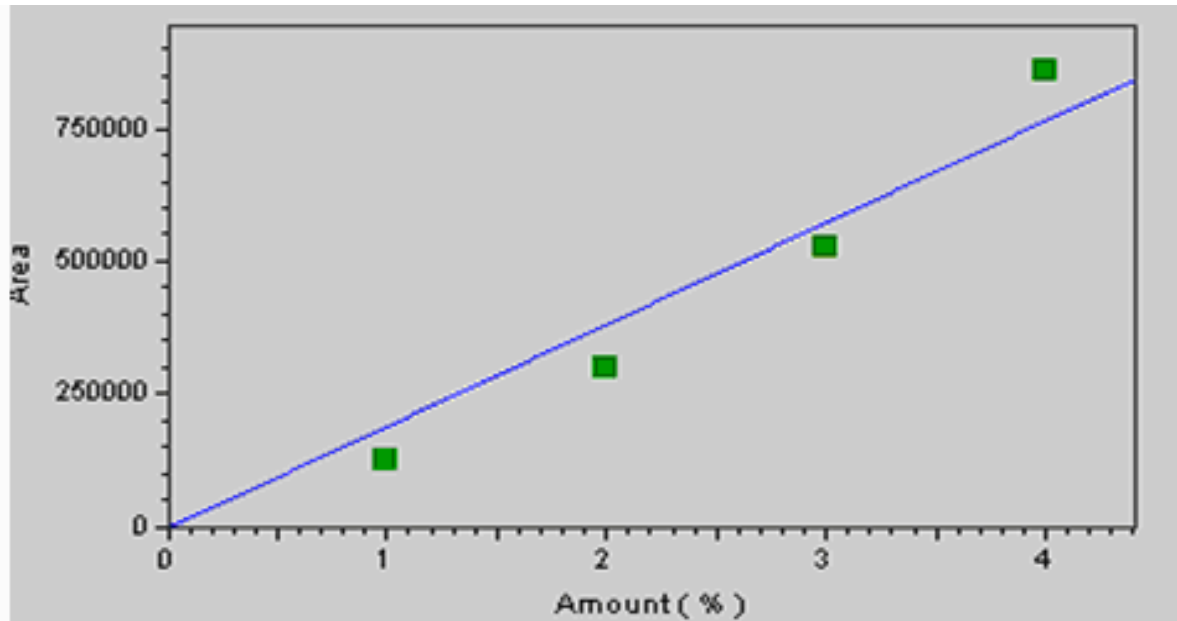


Figure n°37: Courbe de calibration d'oxytétracycline.

2.3.1.3.4. Le calcul du coefficient lineaire d'oxytétracycline

Le coefficient linéaire= $a x + b$, $a = 191514$ et $b = 0$

c.l (r^2) = 0.924551

Le coefficient de corrélation (r^2) est égal à 0,924.

L'équation du modèle linéaire postulé est $y = 191514 x + 0$.

2.3.2. PENICILLINE G

2.3.2.1. L'optimisation propromendite

Avant d'entamer l'optimisation des paramètres de détection et de quantification de pénicilline G il a fallu d'utiliser les paramètres de producteur du standard pénicilline G qui sont représentés dans le tableau 22.

Tableau n°22: Conditions d'analyse préconisées par le fournisseur pénicilline G.

Phase mobile	75% Eau pour HPLC+25% Acetonitrile
Phase stationnaire	phase inverse (C18).
Longueur d'onde	220 nm
Débit	1 ml/min.
Quantité injectée	20µl.
Durée d'analyse	6 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,15 mg/ml

Les paramètres préconisés par le standard pénicilline G ne sont pas exploitables pour nos conditions d'analyses et de ce fait, nous avons obligé d'optimiser les différents paramètres d'analyse.

2.3.2.1.1. Phase stationnaire

Une seule phase stationnaire a été utilisée, il s'agit de la phase inverse C18,

2.3.2.1.2. Phase mobile

Pour l'optimisation de ce paramètre, 10 essais ont été effectués,

Deux phases mobiles ont été utilisées : l'une est constituée de méthanol (5 essais), l'autre d'acétonitrile (5essais) les autres paramètres sont fixés (tableau 23) et les résultats obtenus dans nos conditions d'analyse sont représentés par deux exemples qui sont illustrés dans la figure 38.

Tableau n°23: Conditions d'analyse pour l'optimisation de la phase mobile de pénicilline G.

Phase mobile	-Acétonitrile -Méthanol
Phase stationnaire	phase inverse (C18).
Longueur d'onde	240 nm
Débit	1 ml/min.
Quantité injectée	20µl.
Durée d'analyse	6 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,15 mg/ml
Diluant	Acétonitrile

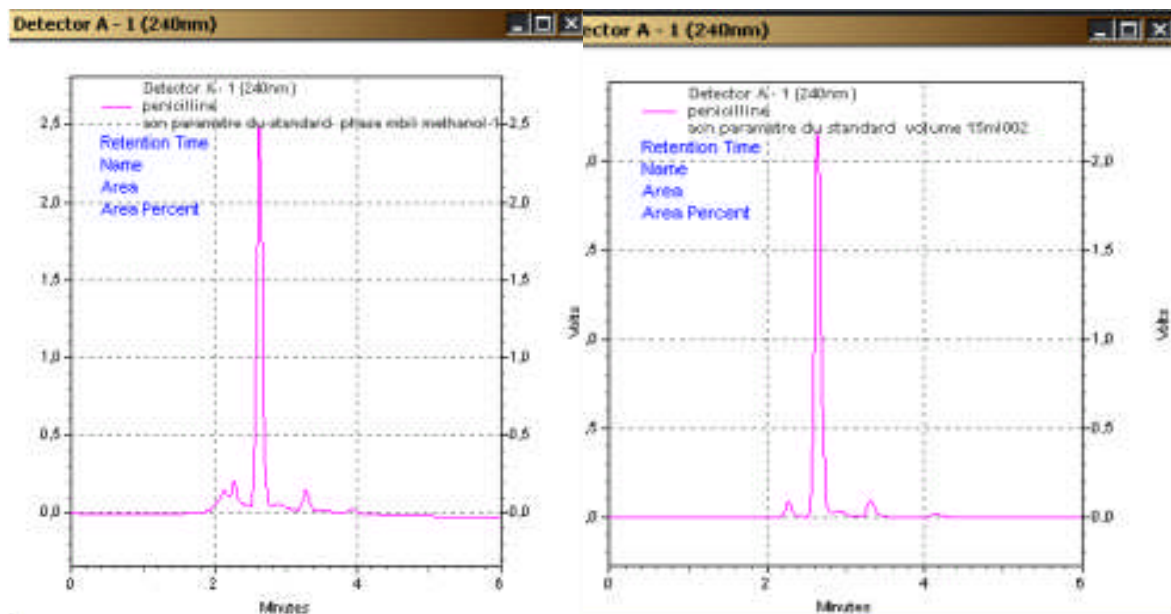


Figure n° 38: Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation de la phase mobile.

A droite : Chromatogramme phase mobile acétonitrile.

A gauche : Chromatogramme phase mobile méthanol.

La figure 38 montre que les chromatogrammes obtenus par les deux phases mobiles (méthanol, acétonitrile) sont presque identiques donc on peut utiliser l'un des deux pour la détection et la quantification des résidus de pénicilline G dans les denrées alimentaires d'origine animales.

Gustavsson, 2003 ont adoptés comme phase mobile un mélange composé d'acétate + méthanol + acetonitrile pour la détection des résidus de pénicilline G dans le lait.

Alors que Babié et al, 2004, ils ont utilisé un mélange d'acide oxalique, méthanol et d'acetonitrile

2.3.2.1.3. Volume injecté

Pour l'optimisation de ce paramètre, (16) essais ont été effectués

Avec des volumes variables de 2 jusqu'à 20µl et les autres conditions d'analyses sont stables (tableau 24).

Tableau n°24: Conditions d'analyse pour l'optimisation du volume injecté de pénicilline G.

Phase mobile	Acétonitrile
Phase stationnaire	phase inverse (C18).
Longueur d'onde	240 nm
Débit	1 ml/min.
Quantité injectée	2-20 µl.
Durée d'analyse	6 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,15 mg/ml

Un exemple des résultats obtenus dans nos conditions d'analyse durant l'optimisation du volume est représenté par la figure 39.

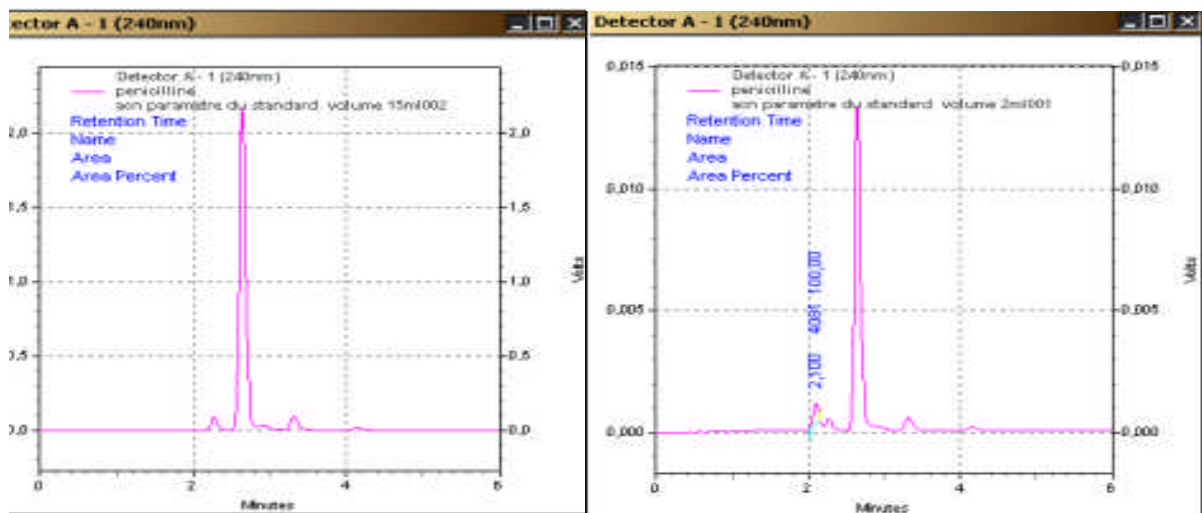


Figure n° 39 : Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du volume injecté.

A droite : Chromatogramme avec un volume injecté de 2 µl

A gauche : Chromatogramme avec un volume injecté de 15 µl

Après plusieurs essais nous avons trouvé que le volume qui donne les meilleurs pics est de 20µl.nos résultats sont en d'accord avec celles qui sont obtenus par (Babić et al, 2004), alors que Oruc et sonal, 2005 ont adopté un volume de 10 µl.

2.3.2.1.4. Débit

Pour l'optimisation de ce paramètre, (16) essais ont été effectués, au cours desquels nous avons testé différents débits (de 1 à 2 ml / min) les autres paramètres sont toujours fixés (tableau 25).

Tableau n°25: Conditions d'analyse pour l'optimisation du débit de pénicilline G.

Phase mobile	Acétonitrile
Phase stationnaire	phase inverse (C18).
Longueur d'onde	240 nm
Débit	1- 2 ml/min.
Quantité injectée	20 µl.
Durée d'analyse	6 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,15 mg/ml
Diluant	Acétonitrile

Deux exemples du chromatogramme obtenus durant l'optimisation du débit sont illustrés dans la figure 40 :

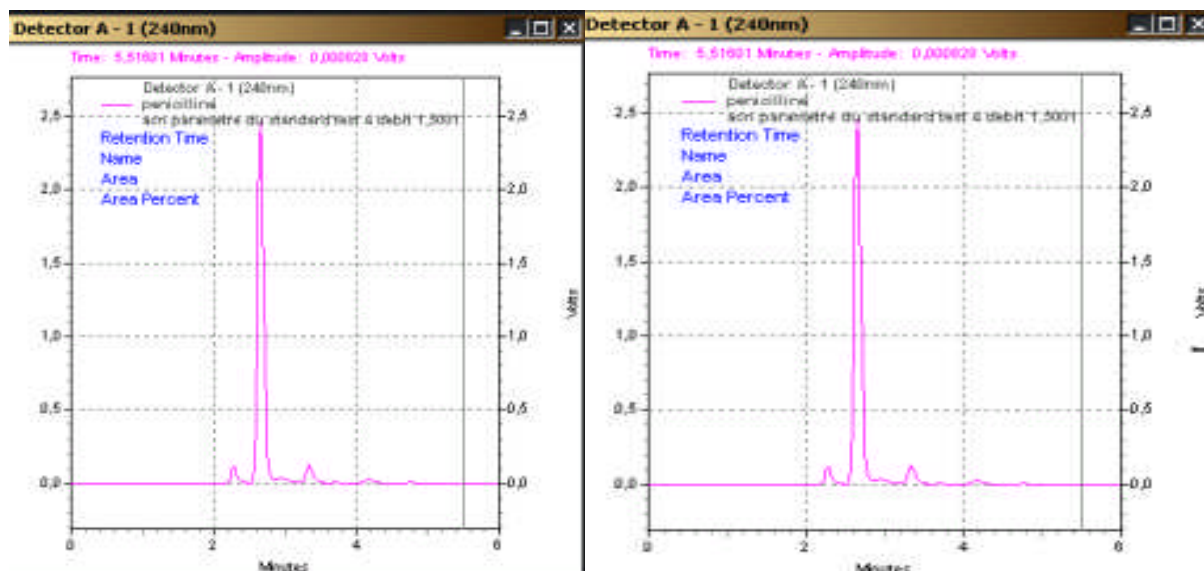


Figure n°40 : Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du débit.

A droite : Chromatogramme avec un débit de 1ml/min

A gauche : Chromatogramme avec un début de 1.5 ml/min

La figure 40 montre qu'il n'y a pas une grande différence entre les deux pics donc on prend le débit le plus bas (1ml/min).

Oruc et sonal, 2005 ont adopté le débit 1 ml/min, alors que Babić et al, 2004 ont fixé un débit de 1 à 0.8ml/mn.

2.3.2.1.5. Spectre d'absorption

Plusieurs longueurs d'ondes ont été testées (de 220 nm jusqu'au 250 nm), les conditions d'analyses sont représentées dans le tableau 26.

Tableau n°26: Conditions d'analyse pour l'optimisation du spectre d'absorption de pénicilline G.

Phase mobile	Acétonitrile
Phase stationnaire	phase inverse (C18).
Longueur d'onde	220- 250nm
Débit	1 ml/min.
Quantité injectée	2-20 µl.
Durée d'analyse	6 minutes.
Concentration de l'échantillon	0,15 mg/ml
Diluant	Acétonitrile

La figure 41 nous montre deux chromatogrammes qui ont été enregistrés durant l'optimisation du Spectre d'absorption.

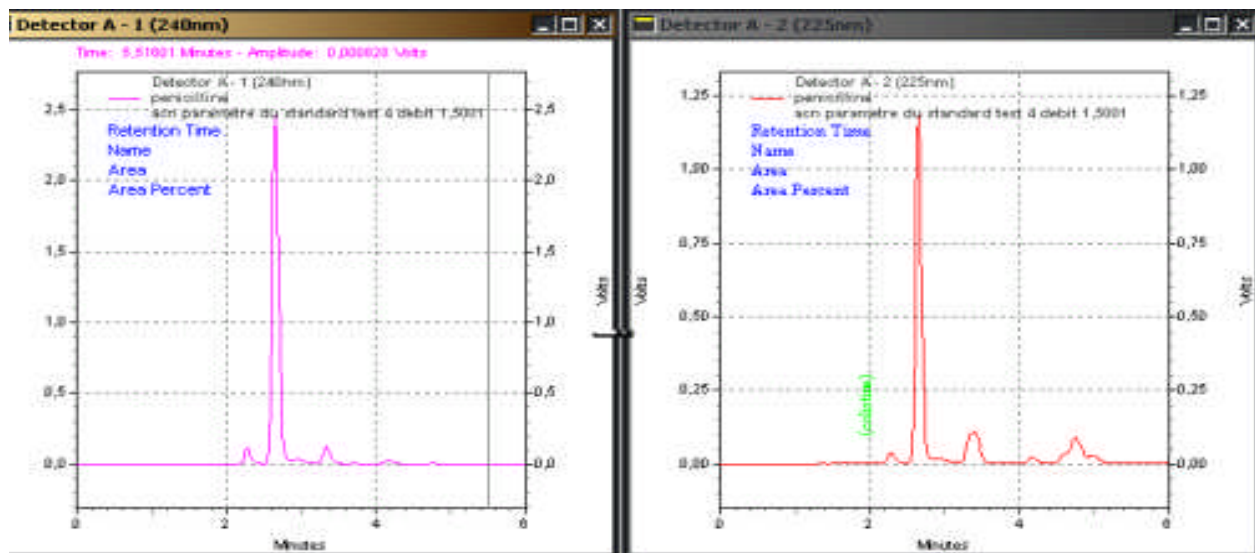


Figure n° 41 : Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du Spectre d'absorption.

A droite : Chromatogramme avec une longueur d'onde 225

A gauche : Chromatogrammes avec une longueur d'onde 240

Les essais réalisés nous ont permis de fixer le spectre d'absorption de pénicilline G est de l'ordre de 220 à 250 nm, les longueurs d'ondes qui permet d'obtenir des meilleurs Chromatogramme (figure 46)

Oruc et Sonal, 2005 ; ont utilisé une longueur d'onde 210 nm. Alors que Babić et al, 2004 ont adopté un spectre d'absorption de 280 nm et Gustavsson, 2003 ont fixé une longueur d'onde de 323 nm pour la détection des résidus de pénicilline G dans le lait.

2.3.2.1.6. Le diluant

Pour l'optimisation de ce paramètre, 6 essais ont été effectués: deux dilution ont été utilisées ; l'une d'elle est constituée de méthanol (3essais), et l'autre d'acétonitrile (3essais) les conditions d'analyses sont représentées dans le tableau 27.

Tableau n°27: Conditions d'analyse pour l'optimisation du diluant de pénicilline G.

Phase mobile	Acétonitrile
Phase stationnaire	phase inverse (C18)
Longueur d'onde	240 nm
Débit	1- 2 ml/min
Quantité injectée	20 µl
Durée d'analyse	6 minutes
Concentration de l'échantillon	0,15 mg/ml
diluant	- Acétonitrile - Méthanol

Deux exemples des chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du diluant sont illustrés dans la figure 42 :

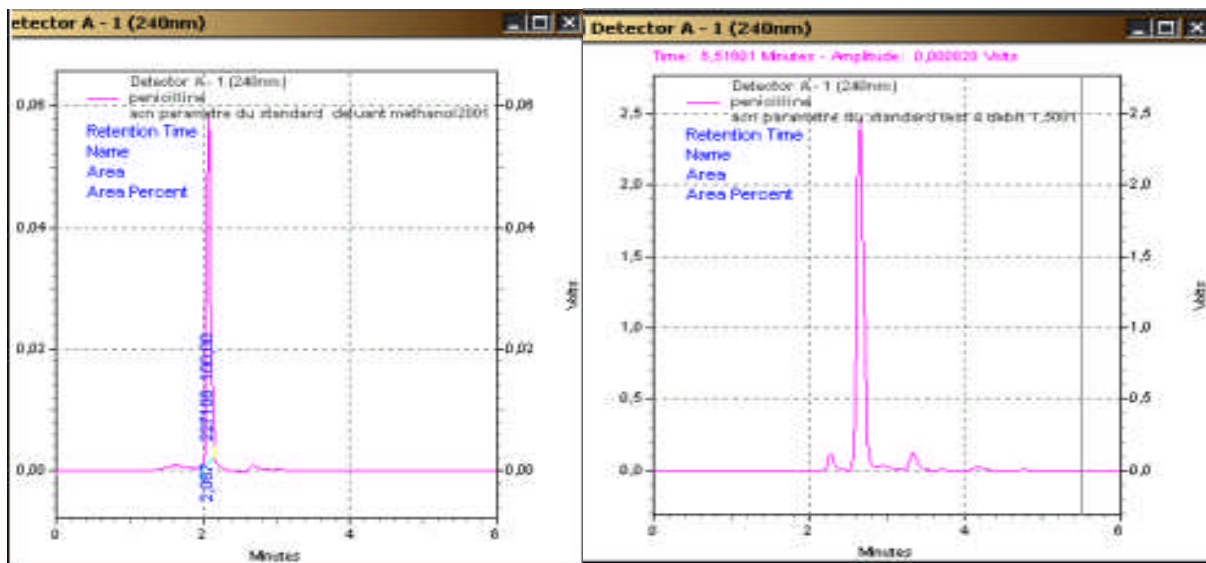


Figure n° 42: Chromatogrammes obtenus durant l'optimisation du diluant

A droite : Chromatogramme obtenus avec un diluant acétonitrile

A gauche : Chromatogramme obtenu avec un diluant méthanol.

La figure 42 montre que les pics obtenus par les deux diluants (méthanol, acétonitrile) sont identiques donc on peut choisir l'un des deux pour la détection et la quantification des résidus de pénicilline G dans les denrées alimentaires d'origine animales.

2.3.2.2. Analyse statistique

2.3.2.2.1. La répétabilité

Pour la vérification de la répétabilité de la méthode nous avons effectué 3 séries, chaque série contient 6 tests et nous avons calculé la moyenne, l'écart type, l'intervalle de confiance et le coefficient de variation des séries.

Les résultats obtenus pour la vérification de la répétabilité de la pénicilline G sont figurés dans le tableau 3 (annexes).

L'analyse statistique a été réalisée à partir de ces moyennes logarithmiques par l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% (tableau 28).

Tableau n°28: l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% pour la vérification de la répétabilité de la pénicilline G

Séries	(1-2)	(2-3)	(1-3)
t calculé	0,49	0,32	0,81
t table au 5%	63587,9	63390,99	64754,15
t table au 1%	83568,67	83309,88	85101,3
NS /S	NS	NS	NS

L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois séries, cela signifie que nos tests sont répétables.

Les essais de répétabilité réalisés dans le même jour ont conduit à des coefficients de variation variant entre 1,55 – 1,58%.

2.3.2.2.2. La reproductibilité

Pour la vérification de la reproductibilité de la méthode nous avons effectué 3 séries, chaque série contient 20 tests et nous avons calculé la moyenne, l'écart type, et l'intervalle de confiance entre ces séries.

Les résultats obtenus pour la vérification de reproductibilité de la pénicilline G sont figurés dans le tableau 4 (annexes).

L'analyse statistique a été réalisée à partir de ces moyennes logarithmiques par l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1% (tableau 29).

Tableau n°29: l'application du test de comparaison des moyennes des surfaces des séries au seuil du risque de 5% et 1%.

Séries	(1-2)	(2-3)	(1-3)
t calculé	0,00420	1,660	1,829
t table au 5%	100269,53	116773,943	84979,433
t table au 1%	131776,507	153466,96	111681,90
NS /S	NS	NS	NS

L'analyse statistique montre qu'il n'y pas différence significative entre les trois séries, cela signifie que nos tests sont reproductible.

Des essais de reproductibilité réalisée sur 3 jours sur la même concentration ont conduit à des coefficients de variation de 1,91%- 2,66%.

2.3.2.2.3. L'établissement d'une courbe de calibration pour la pénicilline G

Pour l'établissement d'une courbe de calibration nous avons effectué quatre injection des concentrations croissante partir de la solution mère de pénicilline G (tableau 27).

Tableau n°30: délutions issus de la solution mère de pénicilline G avec les surfaces correspondantes.

Le niveau	Les dilutions (mg/ml)	Les surfaces ()
1	10	1844509
2	20	3908384
3	30	5584842
4	40	7043885

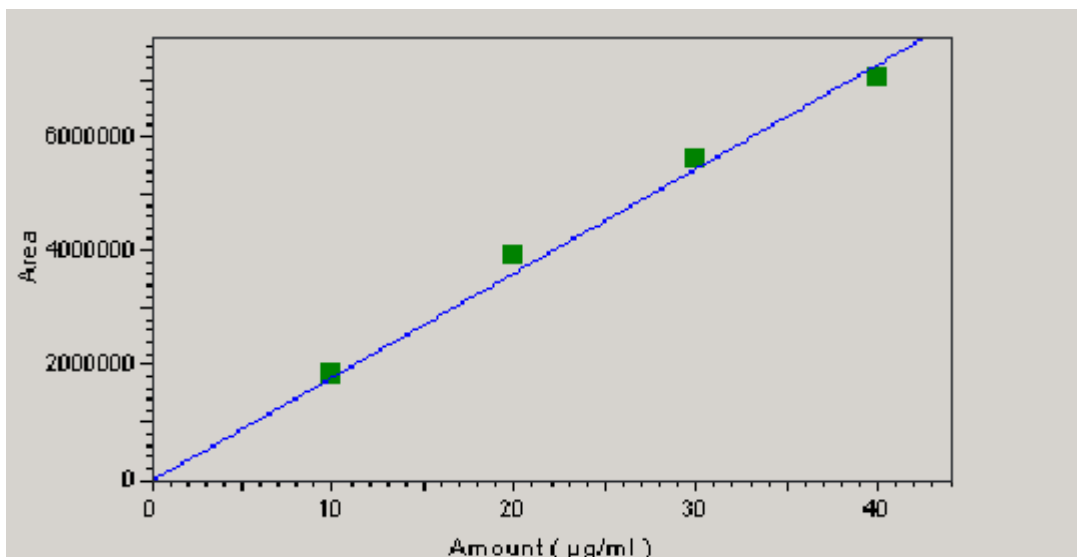


Figure n°43: Courbe de calibration de pénicilline G.

2.3.2.2.4. Le calcul du coefficient linéaire de pénicilline G

Le coefficient linéaire = $a x + b$, $a=181971$, $b=0$

c.l (r^2) = 0,990411

L'équation du modèle linéaire postulé est $y = 181971 x + 0$.

2.4. LES PARAMETRES RETENUS

Pour la suite de notre travail on va adopter les paramètres suivants pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline (tableau 32) et de pénicilline G (tableau 33).

Tableau n°31 : les paramètres à retenir pour la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline.

Phase mobile	Acétonitrile
Phase stationnaire	Phase inverse (C18)
Longueur d'onde	325 et 344 nm
Débit	1.5 ml/min.
Quantité injectée	11µl.
Durée d'analyse	8 minutes.
Diluant	Méthanol

Tableau n°32 : Paramètres à retenir pour la détection et la quantification de la pénicilline G

Phase mobile	Acétonitrile.
Phase stationnaire	Phase inverse (C18)
Longueur d'onde	220 et 250 nm
Débit	1 ml/min.
Quantité injectée	20µl.
Durée d'analyse	6 minutes.
Diluant	Acétonitrile ou méthanol.

CONCLUSION

Nous avons procédé à des investigations (plus de 675 tests) afin de détecter et de quantifier les résidus d'oxytétracycline et de pénicilline G par la chromatographie liquide haute performance.

Nos investigations expérimentales faites sur plusieurs analyses nous ont permis de fixer les paramètres suivants:

- la phase stationnaire utilisée, est la phase inverse C18 pour deux antibiotiques
- la phase mobile est constituée d'acétonitrile pour l'oxytétracycline, et d'acétonitrile ou de méthanol pour la pénicilline G.
- le débit est de 1,5 ml/min pour l'oxytétracycline et de 1 ml / min pour la pénicilline G.
- le spectre d'absorption est de 325 à 344 nm pour l'oxytétracycline, et de 220 à 250 nm pour la pénicilline G.
- le volume injecté est de 11µl pour la première molécule, et de 20 µl pour la deuxième.

Nous allons utiliser ces paramètres pour entamer la détection et de quantification des résidus de ces deux antibiotiques dans la viande rouge par la chromatographie liquide haute performance ceci sera le travail de notre doctorat.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Andremont A, Tancrede C, Marang B , Baume D et Hill C (1989)

Antibiotic treatment and intestinal colonization by Pseudomonas aeruginosa in cancer patients . Antimicrob agents Chemother.,33, p1400-1402.

2. Anonyme 1 (2001)

Spectrométrie de masse organique et bio-organique

<http://www.icsn.cnrs-gif.fr/IMG/pdf/chapitre1.pdf>

Date de consultation le 01/11/2008

3. Anonyme 2 (2005)

Aide publique et développement de l'élevage en Algérie contribution a une analyse d'impact (2000-2005)

<http://www.gredaal.com/ddurable/agricolevage/obselevages/publications/autres/Elevage-Algerie-2005.pdf>

Date de consultation 15/04/2008.

4. Anonyme 3 (2005)

Cours de chromatographie liquide

<http://eaduniv-angers.fr/Page2/COURS/6CoursDEUST/CHROMATOGRAPHIE>,

Date de consultation le 11/11/2007.

5. Anonyme 4 (2005)

Devie P, Divol A, Olivon M, Gilbert G, Petit. J, Laurent S et Le Goaziou A
Les antibiotiques dans l'alimentation animale, p 13,14.

<http://www.univ-brest.fr/esmisab/sitesc/Prod-Anim/antibio.pdf>

Date de consultation 30/10/2008

6. Anonyme 5 (2006)

Cours de chimie organique, minérale et structurale

www.ac-nancy-metz.fr/enseign/Physique/CHIM/Jumber/Default.htm - 17k -

Date de consultation le 01/11/2008

7. Anonyme 6 (2006)

Méthodes de séparation analytique

Cours Bachelor 5ème semestre

http://lepa.epfl.ch/ICP3_lecture_notes/Separation_Methods/Cours_2005/1_chroma-intro.pdf

Date de consultation le 01/11/2008

8. Anonyme 7 (2006)

Résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires "De l'étable à la table..."

Service de Protection de la Consommation journées scientifique.

etat.geneve.ch/des/SilverpeasWebFileServer/reference_4.pdf?ComponentId=kmelia704&SourceFile=1166702119710...4.pdf

Date de consultation 30/10/2008

9. Anonyme 8 (2007)

Xiaolang X, Jing Z, Jinqiang D, Chen R

Sample preparation and quantification of tetracycline antibiotic residues in jelly royal by LC/MS. P 1-4.

http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_1811.pdf

Date de consultation 01/11/2008.

10. Anonyme 9 (2007)

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Viande>

Date de consultation le 25/11/2007

11. Anonyme 10 (2008)

Limite Maximale de Résidus.

<http://fr.wikipedia.org/wiki/LMR>

Date de consultation 30/10/2008.

12. Anonyme 11 (2008)

Recherche des résidus d'antibiotiques dans la viande :

De nouvelles méthodes pour de nouveaux besoins

http://www.dsm.com/nl_NL/downloads/premitest/publicatie9.pdf

Date de consultation 30/10/2008

13. Anonyme 12 (2008)

http://www.gredaal.com/ddurable/agricolevage/obselevages/lait_vrouges/Vrouges/viandes_rouges_algerie_020105.htm.

Date de consultation 05/01/2008.

14. Anonyme 13 (2008)

<http://crdp.acclermont.fr/etabliss/bpambert/elevs/medicaments/antibiotiques.htm>

Date de consultation 05/01/2008.

15. Anonyme 14 (2008)

<http://www.sunriseag.net/resources/mastitis.pdf>

Date de consultation 10/04/2008.

16. Anonyme 15 (2008)

<http://ead.univangers.fr/%7Ejaspard/Page2/COURS/6CoursDEUST/CHROMATOGRAPHIE/1Cho>

Date de consultation 30/10/2008.

17. Anonyme 16(2008)

http://www.gredaal.com/ddurable/agricolevage/obselevages/lait_vrouges/Vrouges/viandes_rouges_algerie_020105.htm

Date de consultation 03/04/2008

18. Anonyme 17 (2008)

www.adaoa.ulg.ac.be/cours/tppc2doc/TPPC2D.pdf - maitrise de la qualité (analyse)

Date de consultation le 21/05/2008

19. Audigié CL, Dupont G, Zonszain F (1995)

Principes des méthode d'analyse biochimiques, Doin Editeurs Paris tome 1, p 44.

20. Eugénie B.B et Brogard J .M (1999)

Bases biologiques de l'antibiothérapie. Edition MASSON, p 67,72, 73.

21. Babić S, Mutavdžić D, Ašperger D, Horvat A.J.M et Kaštelan-Macan.M (2004)

Solid phase extraction and hplc determination of veterinary pharmaceuticals in waste water.

Laboratory of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb, Croatia. P 4.

<http://www.cid.csic.es/emco/pdf%20oral/Babic.pdf>

22. Baumeister M, Stlla G K et Muller Fresenius O.A (1993)

Journal of Analytique Chemistry. Volume 317, Number 5/Septembre ; 2005, office des publications universitaires.

23. Bendall J. R (1973)

Post mortem changes in muscles.

Dans: G.H. Bourne (Ed), The Structure and Function of Muscle, 2nd Ed. Academic Press, New York. p 243-309.

24. Beverley S et Sharman M (2001)

Improvement to the screening of antimicrobial drug residues in food by the use of Premi®Test. Veterinary Science: Vol. 70 - Avril 2001.

25. Burgot G et Burgot J-L (2002)

Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications.

Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales

Éditions TEC & DOC p 26, 27.

26. Carman R .J 1, Vantassel R. L et Wilklins T. D (1993)

Interaction between dietary compounds and the colonic microflora. In : science for the food industrie of the 21 st century. M . Yalpani (ed), ATL press, Chigaco IL, p 313-342.

27. Carman R .J 2, Vantassel R. L et Wilklins T .D (1993)

The normal intestinal micrflora : ecology, variability and stability. Vet. Human Toxicol., 35 : Suppl 1, p11-14.

28. Cartier P (2007)

Le point sur...La qualité des carcasses et des viandes de gros bovins
Compte rendu final n° 17 05 32 022
Institut de l'Élevage épartement Techniques d'Eleavage et Qualité
Service Qualité des Viandes p 67.

29. Charoenraks T, chuanuwatanakul S, Honda k, Yamaguchi Yet Chailpakul O (2005)

Analysis of tetracycline antibiotics using HPLC with pulsed amper ometric detection Analytical sciences March vol.21 p 241-245

30. Chibat El (2007)

Cours de statistique appliqués aux sciences vétérinaires cours polycopie de post graduation année 2006-2007 institut vétérinaire d'Elkhroub université de Constantine

31. Châtaigner B et Stevens A (2003)

Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées a DAKAR, Institut Pasteur de DAKAR, Projet PACEPA
p 12.

32. Chéret R (2005)

Effet des hautes pressions sur les indicateurs de maturation de la viande et d'altération du muscle de poisson.

Thèse de doctorat école doctorale mécanique, thermique et génie civil de Nantes, N° édition 0367-192, p34 - 41.

33. Christensen M.L, Larsen L.M, Ertbjerg P et Purslow P.P (2003)

Effect of proteolytic enzyme activity and heating on mechanical properties of bovine single muscle fibres. Meat Science. 66 (2), p 361-369

34. Clément M C, Demaria M, Petit M et Thevenot C. (1978)

Résidus de cloxacilline et de neomycine dans le lait après leur administration ; en association, par voie galactophore.

Rec.Méd.Vet, 154 (11), p 951-956.

35. Clinquart A, Fabry J et Casteels M (1999)

La viande (eds). Chapitre la viande et les produits de viande dans notre alimentation, p 76

36. Corpet D.E. Lumeau .S, et Corpet.F(1989)

Minimum antibiotic levels for selecting a resistance plasmid in a gnotobiotic animal model. antibiotic agents chmother./33:4, p 535-540.

37. Craplet .C (1965)

La viande de bovins

tome VIII, livre 1, Vigot frères éditeurs, Paris VI, p188, 196,197, 234

38. Dominique, (1983)

Les résidus des antibiotiques dans la viande de veau.

Thèse de doctorat vétérinaire Ecole vétérinaire d'Alfort, p 10, 11.

39. Drieux. H, Ferrando. R, Jacquot.R (1962)

Caractéristiques alimentaires de la viande de boucherie, Vigot frères éditeurs, Paris VI, p 9, 143.

40. Dumont B.L. et VALIN .C (1982)

Basse biochimique de l'hétérogénéité du tissu musculaire et des viandes ; Hygiène et technologique de la viande fraîche. Edition C.N.R.S, p77, 80.

41. Fabre J.M, Petit C et Bosquet G (2006)

Comprendre et prévenir Les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Edition Lavoisier, p 4.

42. Fabre- pradal M et traduit par Chenzi D (1989)

Produire de la viande bovine aujourd'hui, 2^{eme} édition Tec et Doc
Technologie et documentation – Lavoisier, p 66.

43. Fontaine M. (1998)

Vade mecum du vétérinaire 1^{ere} formulaire vétérinaire de la pharmacologie de
thérapeutique 18^{eme} édition, p 588.

44. Gorbash S L (1993)

Perturbation of intestinal microflora Vet. Human Toxicol., Suppl 1, p15-23.

45. Gustavsson E (2003)

SPR Biosensor Analysis of –Lactam Antibiotics in Milk .Doctoral thesis .Swedish
University of Agricultural Sciences p 118.

46. Hellali AK (1999)

Pharmacologie fondamentale et clinique a l'usage des étudiant en médecine.
Edition ENAG, p 135.

47. Holmberg S D (1987)

Antimicrobial resistance: a review of health and economic impacts. APUA,
Newsletter, V4, p1-8.

48. Jenster G, Van der kor put J.A et Trapman J, Brinkmana.O (1992)

Functional domains of the human androgen receptor. J.
Steroid. Biochem. Mol. Biol., 41, 671-675.
Ministère de la Santé

49. Jolliet P, Fontaine M, Herlin B, Chambraud E (1998)

Pharmacologie, Antibiotiques et antituberculeux.
Edition MASSON, p55 – 65.

50. Keck G 1 (1978)

Métabolisme des médicaments et des toxiques.1-L'absorptions.

Le point vétérinaire, volume 7, n 35 septembre 1987.

51. Keck G 2 (1978)

Métabolisme des médicaments et des toxiques 2-La distribution.

Le point vétérinaire, volume 7, n 35 septembre 1987.

52. Keck G 3 (1978)

Métabolisme des médicaments et des toxiques 3-La biotransformations.

Le point vétérinaire, volume 7, n 35 septembre 1987.

53. Keck G 4 (1978)

Métabolisme des médicaments et des toxiques 4-L'élimination.

Le point vétérinaire, volume 7, n 35 septembre 1987.

54. Kölbener P, Diserens J M, Känzig A, Jaus A, Hochstrasser K, Kaufmann A, Doering T, Reber S, Edder P, Kaufmann T, Leuenberger U , Noser J, zehringer M, Gremaud G (2005)

Résidus de médicaments vétérinaires, 1ere édition, p 2.

55. Korsrud G.O (1998)

Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial Veterinary Drug Residues in Slaughtered Animals ». Journal of AOAC International 81, 1, 21-24.

56. Lagier G (1998)

Pharmacologie fondamentale et clinique, 7eme Ed, p769.

57. Laurence C (2003)

Spectrométrie de masse

Centre régional de spectrométrie de masse de Marseille

Faculté des sciences et techniques de saint Jérôme-Aix-MarseilleIII p 2

<http://www.spectropole.u-3mrs.fr/pdf/Spectropole->

[la_spectrometrie_de_masse_a_votre_service-ce_que_vous_pouvez_en_attendre.pdf](http://www.spectropole.u-3mrs.fr/pdf/Spectropole-la_spectrometrie_de_masse_a_votre_service-ce_que_vous_pouvez_en_attendre.pdf)

Date de consultation le 01/11/2008.

58. Laurent C (1974)

Conservation des produits d'origine animale en pays chauds.
2ème édition .Ed .presses universitaires de France, paris, p154.

59. Le chat P. (1975)

Abrégés de pharmacologie médicale.
2eme Edition MASSON ET Cie p 85, 86.

60. Le chat P (2007)

Pharmacologie, Service de pharmacologie Université Paris-VI.
Edition DCEM, p307.

61. Lenges J et Demeyer D (1999)

La viande (eds), p 97.

62. Lopry JR, Carret G et Flandrois JP(1992)

Maintenance requirement of Escherchia coli ATCC -25922 in the presence of sub-inhibitory concentration of various antibiotic. J. Antimicrob.che – mother:.,29:2,p121-127

63. Maghuin-Rogister G (2001)

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse I. Evolution de la stratégie de contrôle Ann. Méd. Vét., 2005, 149, p183-187.

64. Maghuin-rogister G, Janosi A , Helbo V, Van peteghem C, Sanders E, Van eekhout N, Cornelis M et Jouret M (2001)

Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances Antimicrobiennes dans les denrées alimentaires

Services scientifiques du premier Ministre Affaires scientifiques, techniques et culturelles

(SSTC) Rapport Final SSTC v10.doc p (3-4, 64-66)

65. Maghuin M (2002)

Hormones, substances anabolisantes et résidus de traitements vétérinaires en relation avec la sécurité alimentaire In: Sécurité alimentaire du consommateur, 2ème.Ed. TEC & DOC, Lavoisier. p 65-91.

66. Maghuin-Rogister G (2005)

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse I. Evolution de la stratégie de contrôle Ann. Méd. Vét., 2005, 149, p183-187.

67. Mikami M, Whiting A.H, Taylor A.J, Maciewicz R .A et Carpenter Z L (1987)

Degradation of myofibrils from rabbit, chicken and beef by cathepsin L and lysosomal lysates.

Meat Science. 21, p 81-97.

68. Milhaud G, (1978)

L'utilisation rationnelle des médicaments vétérinaire et le temps d'attente.

Rec.Méd.Vet, Tome 154/N° 02, p177-185.

69. Mirand P (2008)

Valeur nutritionnelle et santé, Unité nutrition et métabolisme protéique.

INRA et CRNH de Clermont-Ferrand, p 1.

70. Mircovich C, Bozec A. (2004)

Résidus dans la viande de porc Résultats des plans français de 2001 à 2004

Sciences et technique, Viandes Prod. Carnés Vol 25 (1) p 4.

71. Oruç H et Sonal S (2005)

Determination of oxytetracycline, penicillin G and sulphadimidine residues in Cow Milks in Bursa.

Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med. 24 (2005), 1-2-3-4: 11-13

72. Ouali A, Obled A, Cottin P, Merdaci N, Ducastaing A et Valin C (1983)

Comparative effects of post-mortem storage and low-calcium-requiring neutral proteinase on bovine and rabbit myofibrillar proteins.

Journal of the Science of Food and Agriculture. 34 (5), p 466-476.

73. Ouali A (1990)

Meat tenderization: possible causes and mechanisms.

A review. Journal of Muscle Foods, p129 -165.

74. Ouali A (1992)

Proteolytic and physiological mechanisms involved in meat texture development. Biochimie. 74, p 251-265.

75. Pantaleon G et Chevrier L (1969)

L'utilisation des antibiotiques et thérapeutique.-cah.

Med Vet, Nov -Dec. 1996, 6, p 227-234.

76. Puyt . J-D, Guérin-Faubleé . V (2006)

Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie.

Edition 2006, page 1-27.

77. Rahal K (2005)

Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire a l'échelle nationale, 3eme edition, p 7.

78. Ruckebusch Y et Toutaain PL (1982)

Le médicament vétérinaire, Les aminosides ou aminoglycosides.

Edition MASSON, p53.

79. Salghi R (2003)

Cours d'analyses physico-chimiques des denrées alimentaires II, GPEE, ENSA Agadir.

Ecole Nationale des Sciences Appliquées d'Agadir p 7

80. Saux MC (2006)

Pharmacocinétique et modalité d'administration des antibiotiques.

Laboratoire de Pharmacocinétique et de Pharmacie Clinique EA 525

Université V. Segalen Bordeaux 2 et Pharmacie centrale hôpital Haut-

Lévêque CHU de Bordeaux. 7èmes JNI 08.06.06, p3.

<http://www.infectiologie.com/site/medias/JNI/JNI06/IDE/ati1-Saux.pdf>

81. Scippo M.-L., Maghuin-rogister G (2006)

Résidus et contaminants des denrées alimentaires :

25 ans de progrès dans leur analyse (méthodes biologiques de dépistage)

Ann. Méd. Vét., 150, p 125-130

82. Scippo M L (2008)

Introduction à la qualité et la sécurité des aliments

Technologie, sécurité et qualité des aliments, introduction à la qualité et la sécurité des Aliments : aspects chimiques, 1er Master Méd. Vét. VETE1023-1, Faculté de médecine vétérinaire, université de Liège.p 8- 32.

83. Senyuva H, Ozden T, Sarica D Y (2000)

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Oxytetracycline

Residue in Cured

Meat Products, Turk J Chem24 (2000), p 395- 400.

84. Tancrede C (1992)

Role of human microflora in health and disease . Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11, p 1012-1015.

85. Taylor R.G, Geesink G.H, Thompson V.F, Koohmaraie M et Goll D.E (1995)

Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?

Journal of Animal Science. 73, p1351-1367.

86. Truchot E (1979)

Principales sources de protéines alimentaire et procédés d'obtention n°23 Ed.

APRIA, Paris, p194.

87. Vanderwaaij D (1992)

History of recognition and measurement of colinization resistance of the digestive tract as an introduction to selective gastrointestinal decontamination. Epidemiol. Infect., 109: 3, 315-326.

88. Vollaard E J, Clasener H A L et Jansson A J H M (1990)

Influence of amoxicillin on microbial colonization resistance in healthy volunteers. A methological study. J. Antimicr . Chemother, 25, p861-871.

89. Wiedemann B (1993)

Monitoring of resistant organisms in man and identification of their origin. Vet Microbiol., 35, p 275- 284.

90. Yahi (1997)

L'antibiothérapie spécifique adaptée.

Editions BERTIS, p 9.

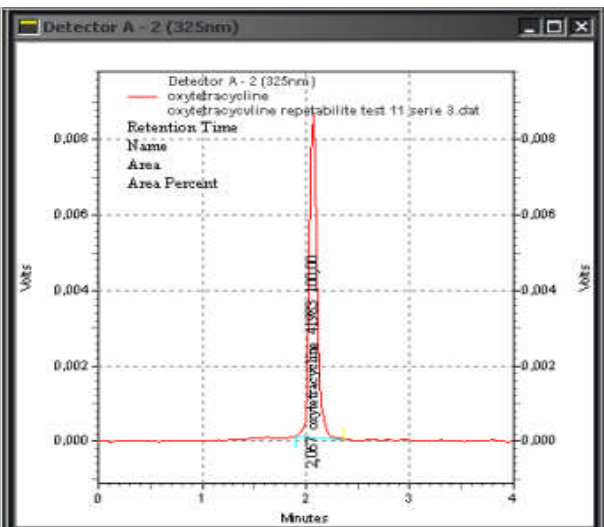
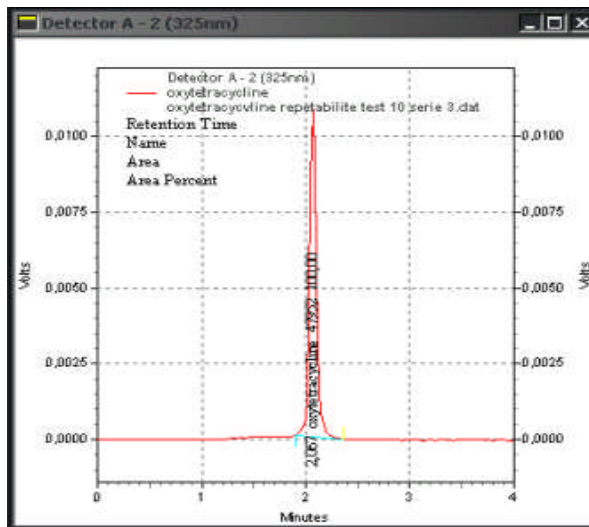
91. Yala D, Merad A.S, Mohamedi D et Ouar korich M.N (2001)

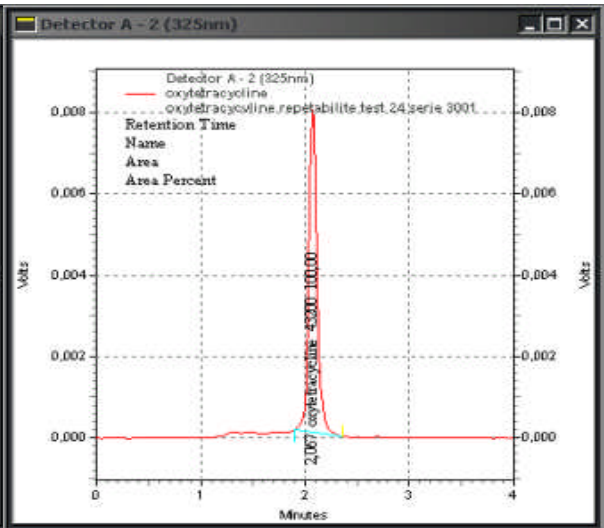
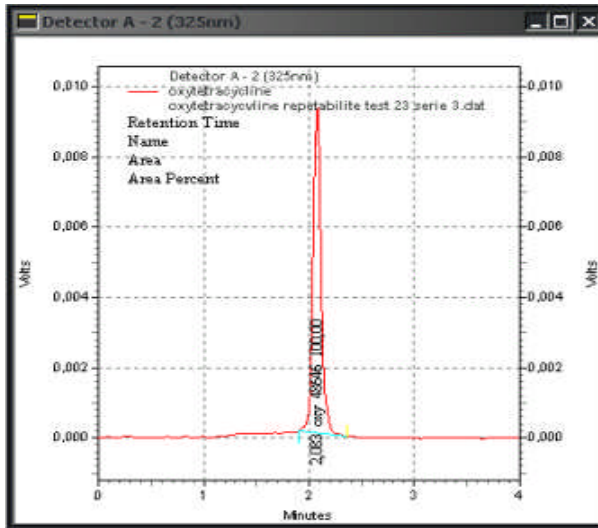
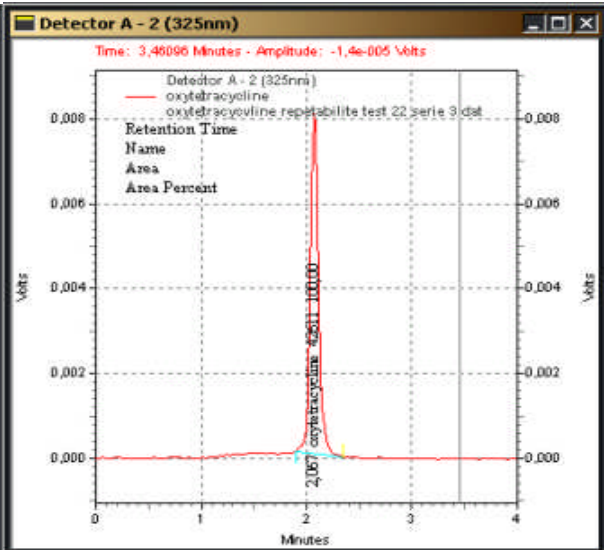
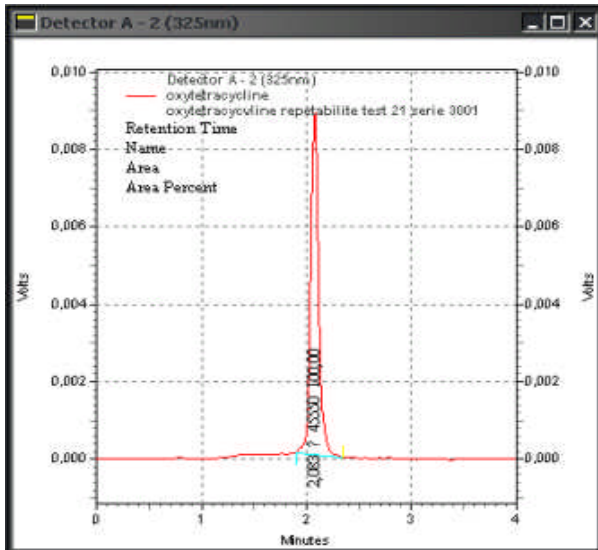
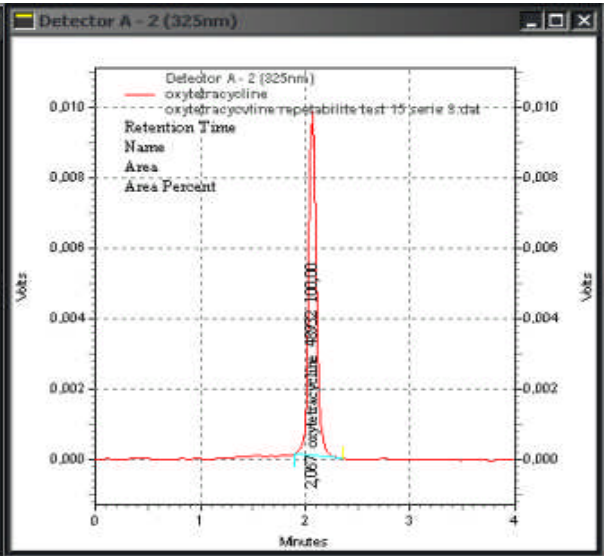
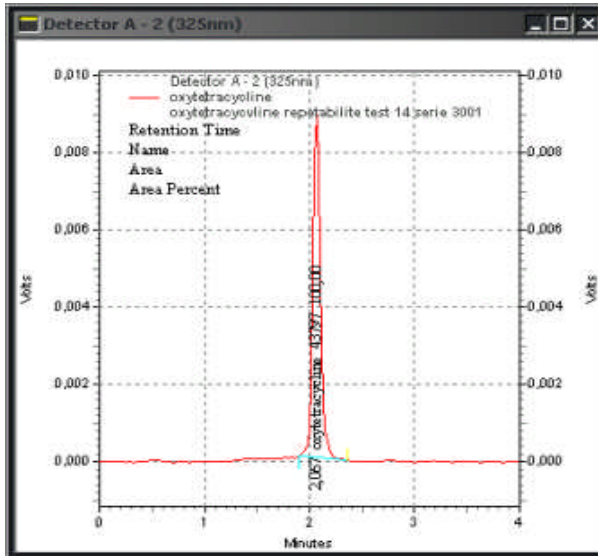
Classification et mode d'action des antibiotiques.

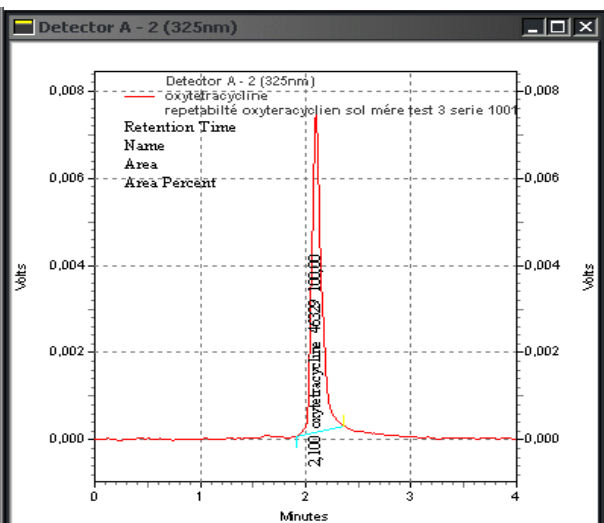
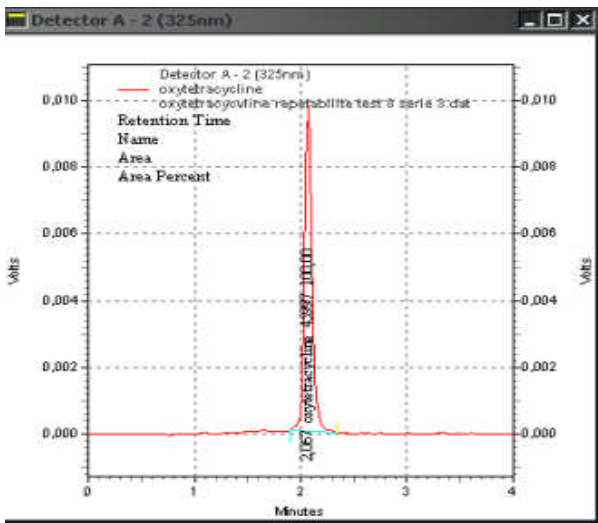
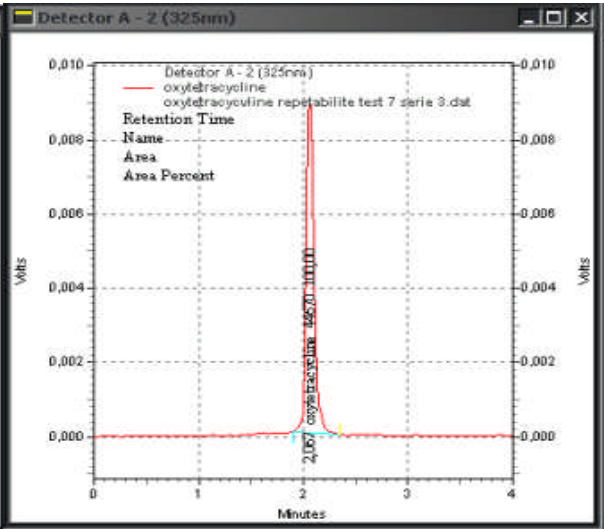
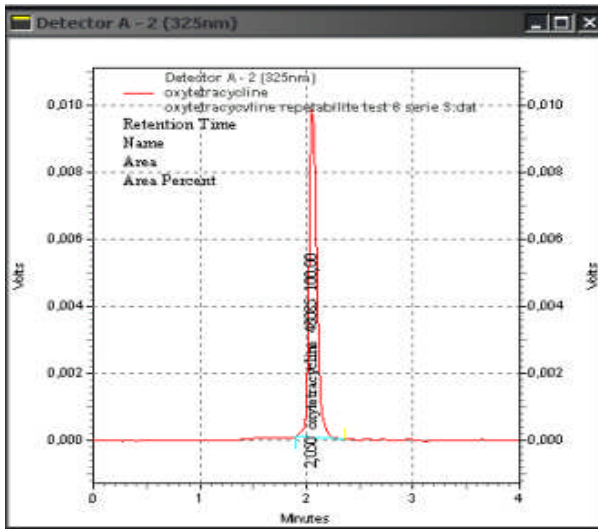
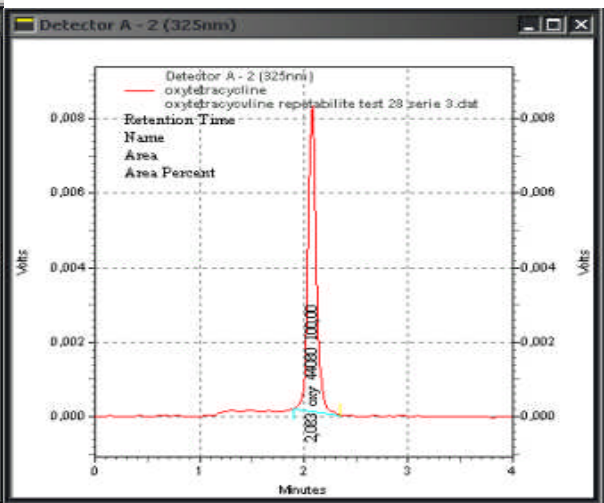
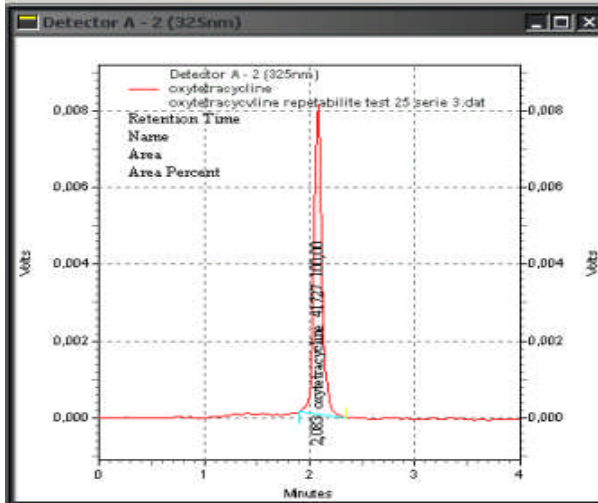
Revue Médecine du Maghreb n°9, p5-12.

Tableau n° 1: la répétabilité de l'oxytétracycline.

Numéro du test	Série n ° 01	Série n ° 02	Série n ° 03
1	47952	48646	45997
2	41963	43200	46329
3	43797	41727	48879
4	48932	44080	41555
5	45550	48085	44253
6	42611	44570	45982
Moyenne	45134,16	45051,33	45982
Ecart-type	2854,72	2748,76	2810,46
Coeff. de variation	6,32	6,10	5,35







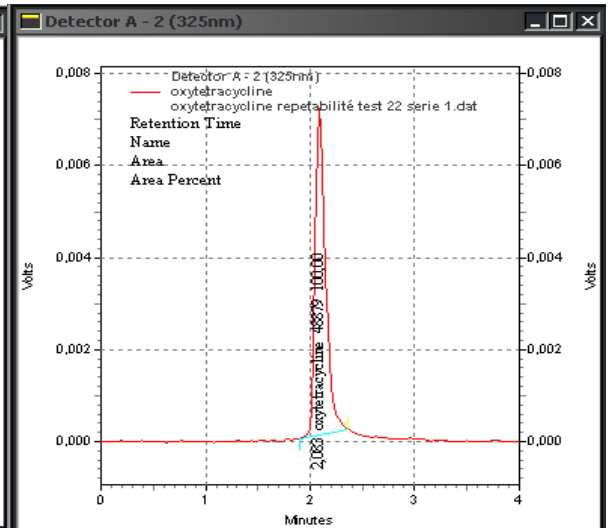
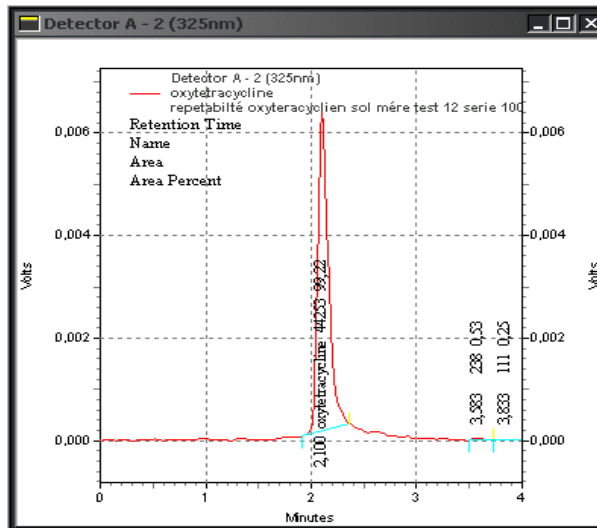
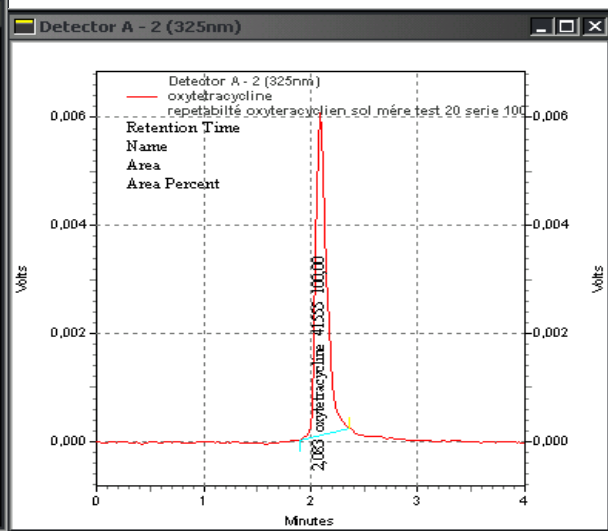
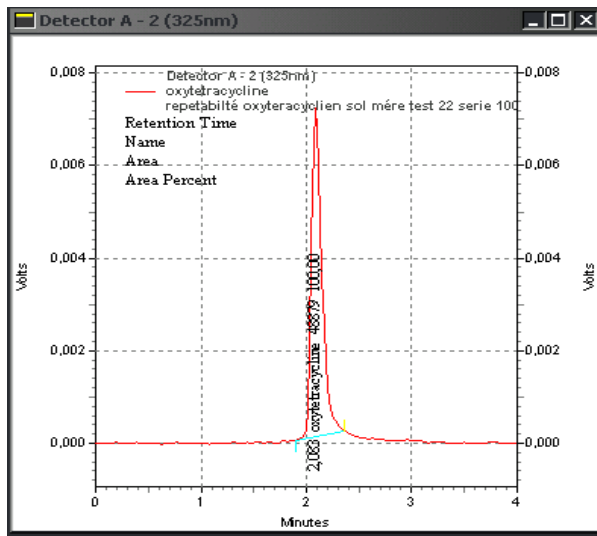
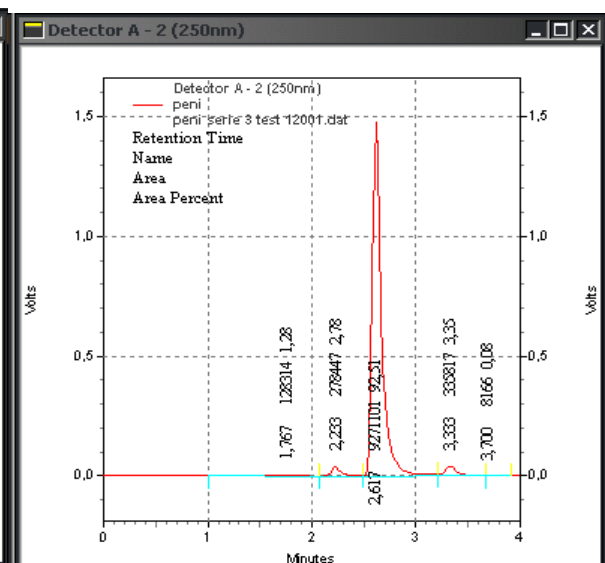
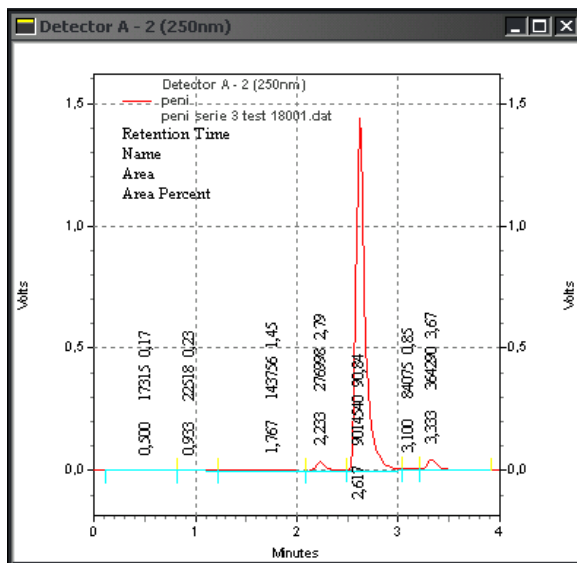
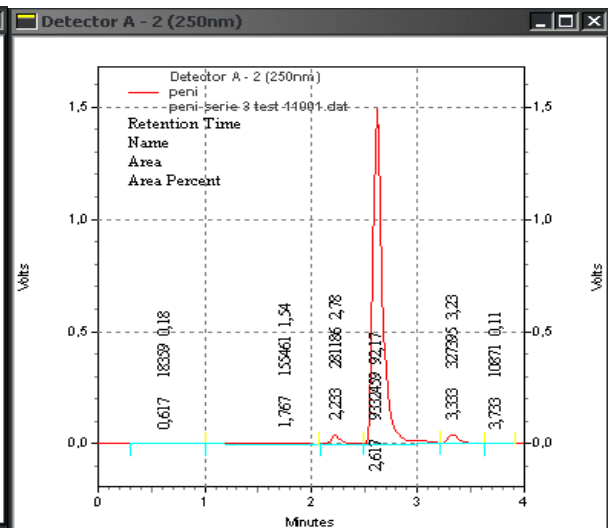
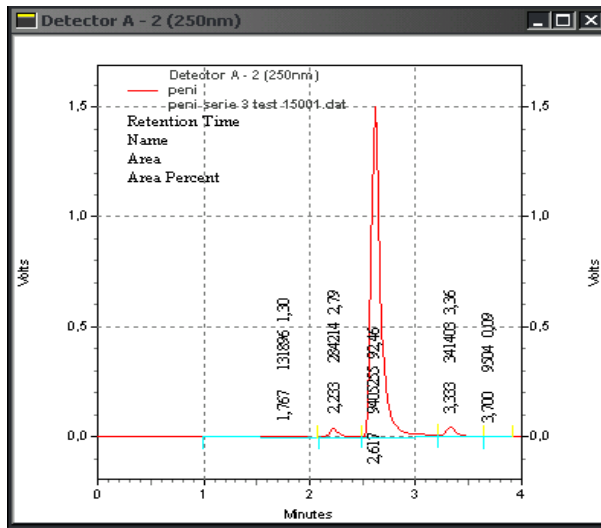
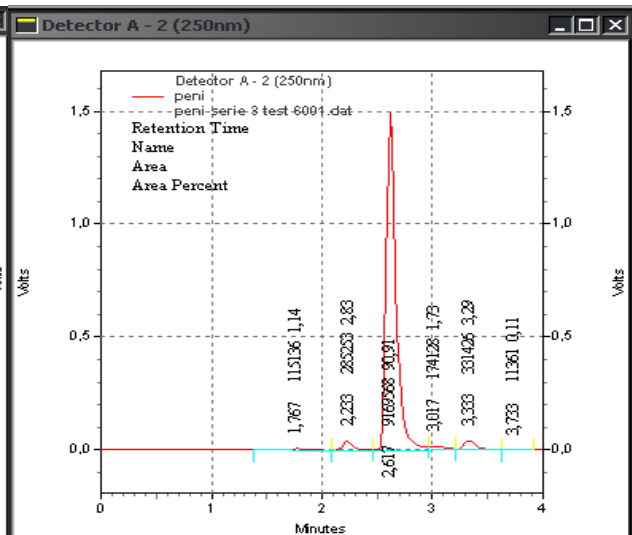
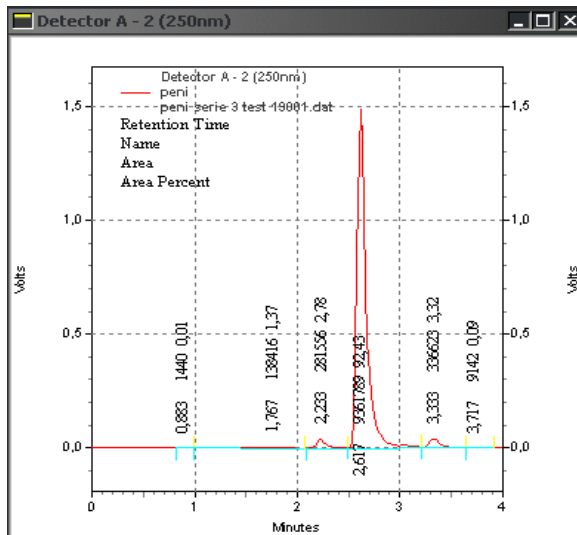


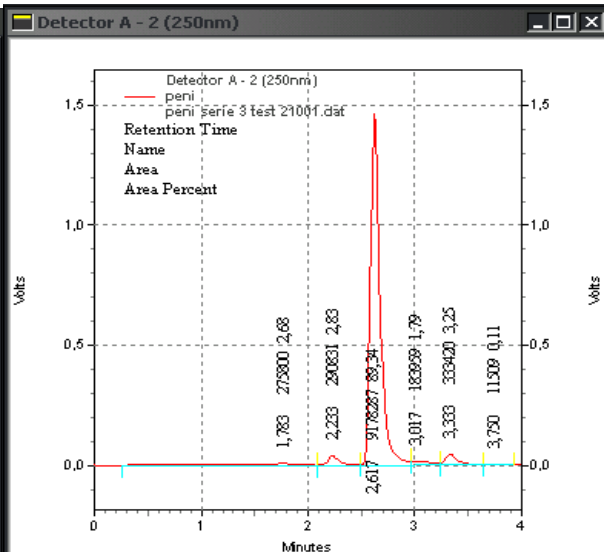
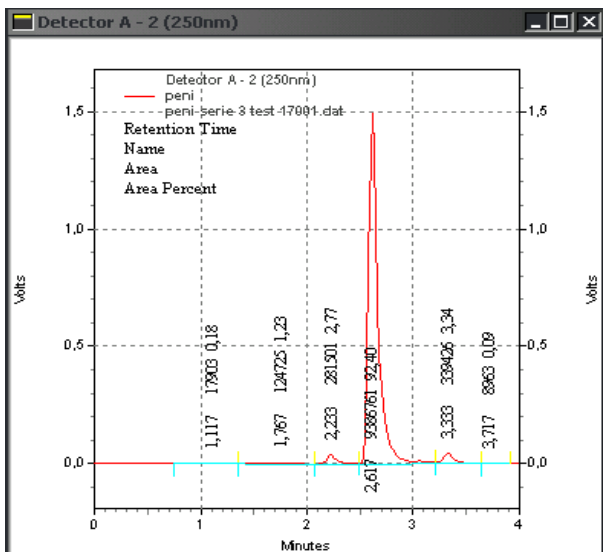
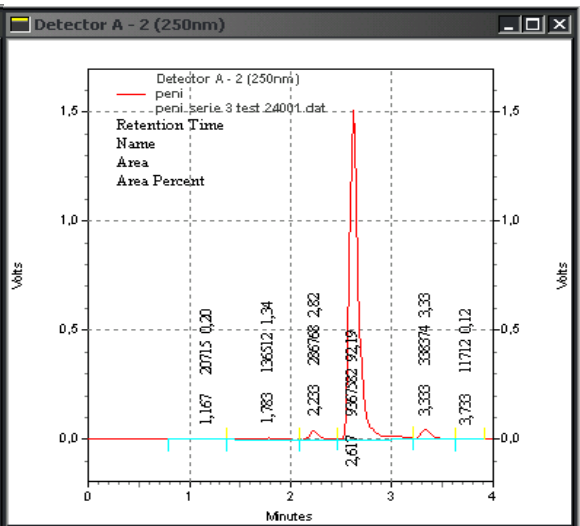
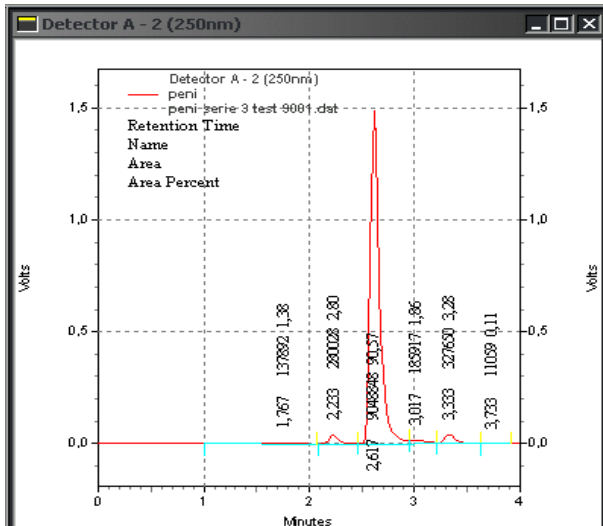
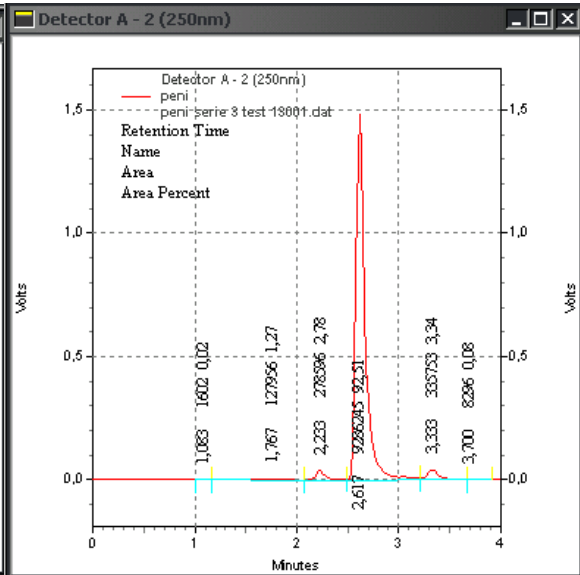
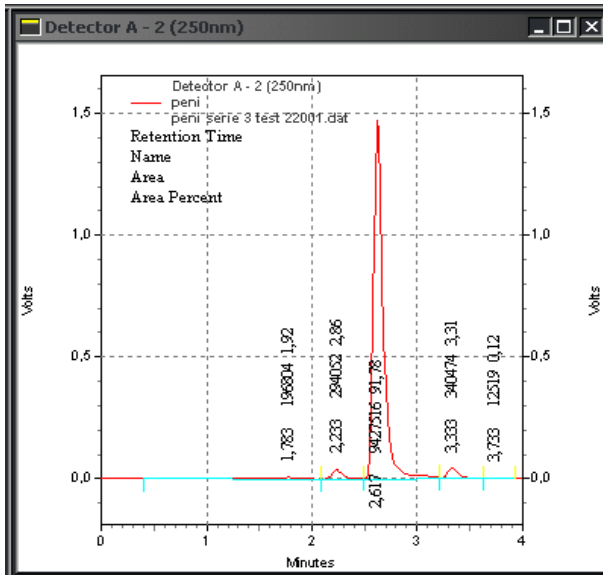
Tableau n°2: La reproductibilité de l'oxytétracycline.

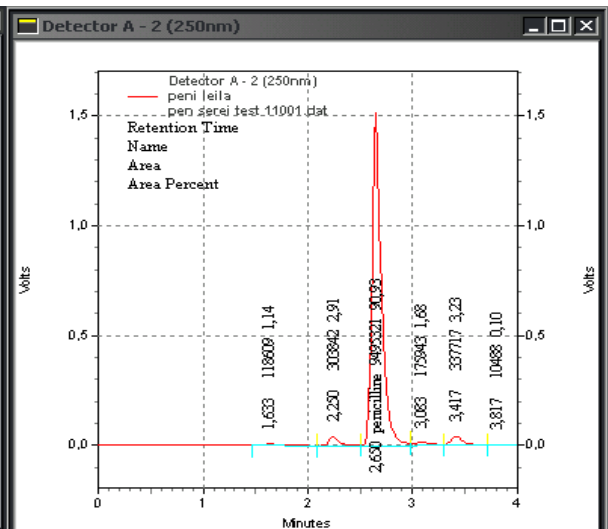
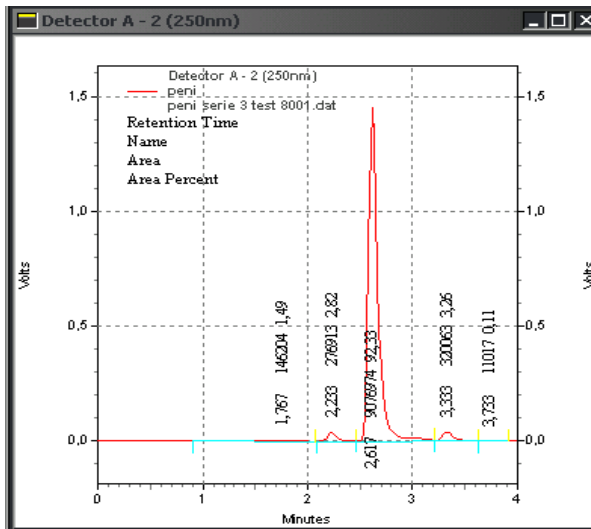
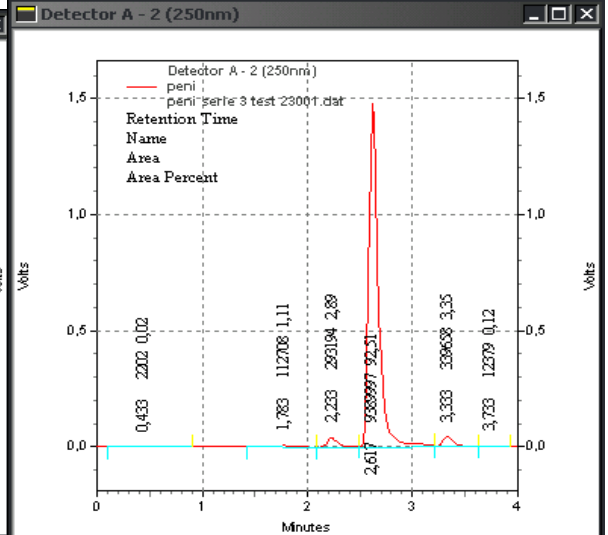
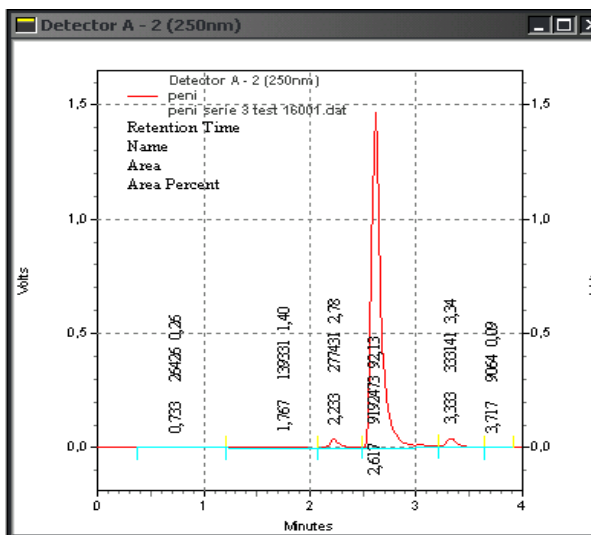
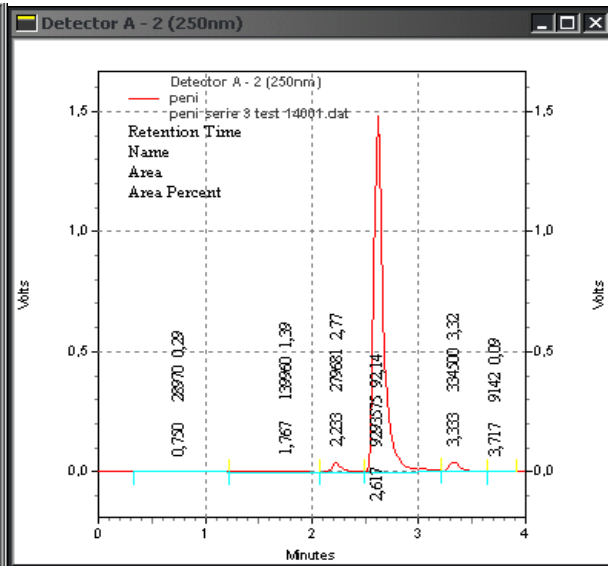
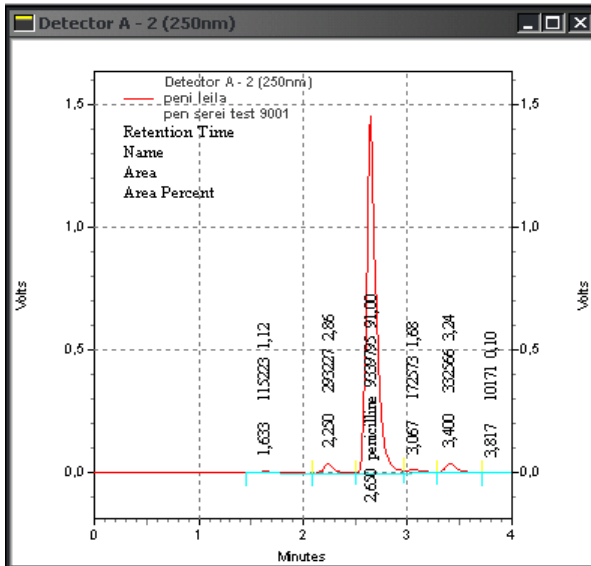
Tests n°	Série n ° 01	Série n ° 02	Série n ° 03
01	40010	47829	40012
02	41230	41030	41254
03	41555	46447	40521
04	42216	41241	42658
05	42827	42151	48987
06	44253	40245	43657
07	43879	42141	42611
08	41458	40141	43200
09	40145	40154	43797
10	43147	41412	45587
11	42184	41441	42518
12	41214	40555	43986
13	46121	41417	41658
14	43154	45142	43265
15	42154	42554	43265
16	41547	40218	42845
17	44544	42754	43652
18	48147	40741	42897
19	46447	48254	41658
20	45245	42512	47326
Total	861477	848379	865354
Moyenne	43073,85	42418,95	43267,7
Ecart type	2174,41	2510,13	2111,64
Coef. de variation	5,04	5,91	4,88

Tableau n°3 : La répétabilité de la pénicilline G

Numéro du test	Série n ° 01	Série n ° 02	Série n ° 03
1	9332459	9286245	9339795
2	9169568	9427516	9293575
3	9405255	9048848	9192473
4	9014540	9367582	9389997
5	9361789	9386761	9076974
6	9271101	9178287	9495321
moyenne	9259118,67	9282539,83	9298022,5
Ecart-type	145091,318	144642,017	147752,404
Coeff. De variation	1,56	1,55	1,58



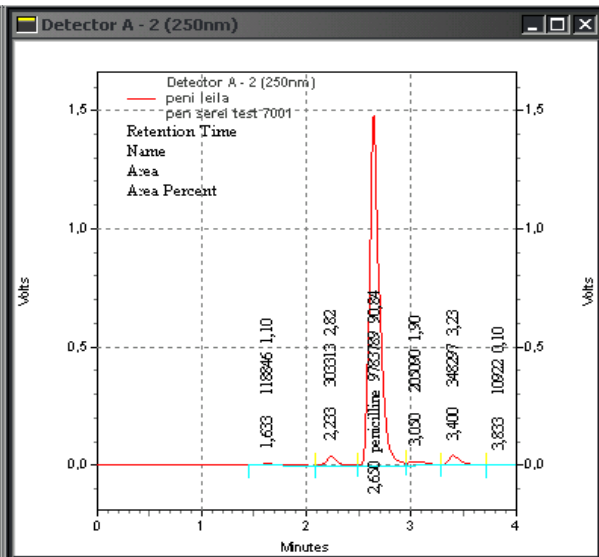
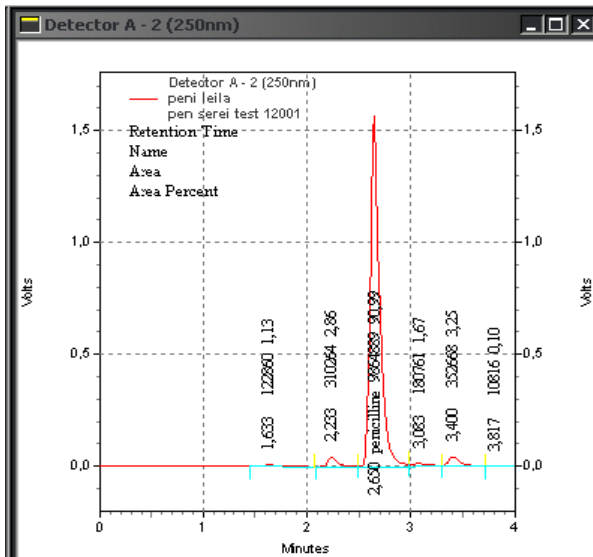
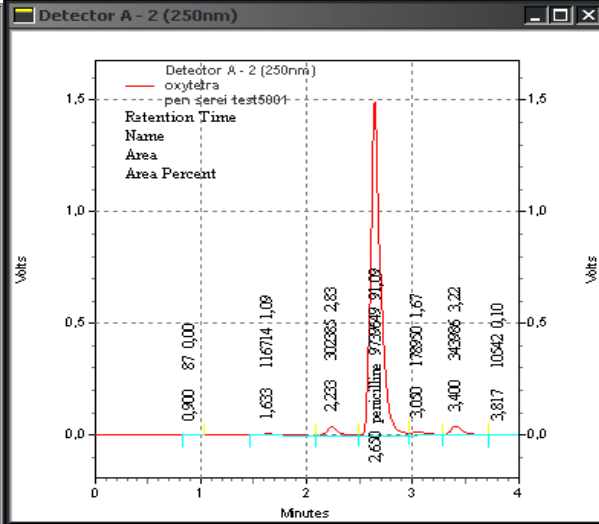
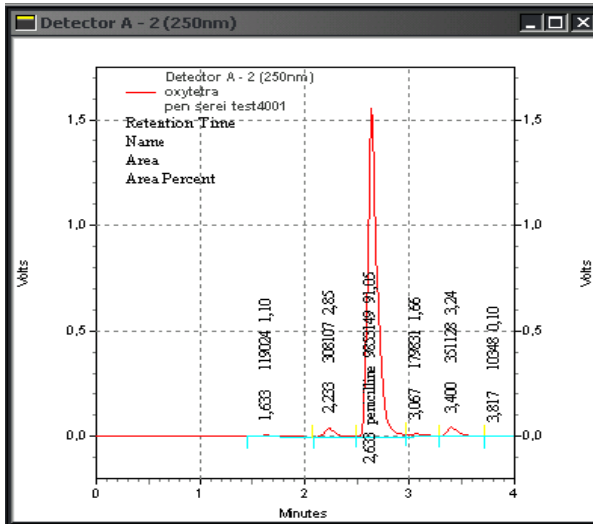
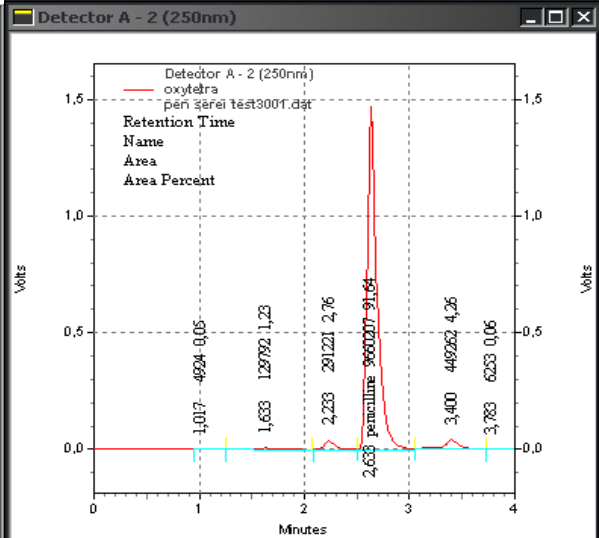
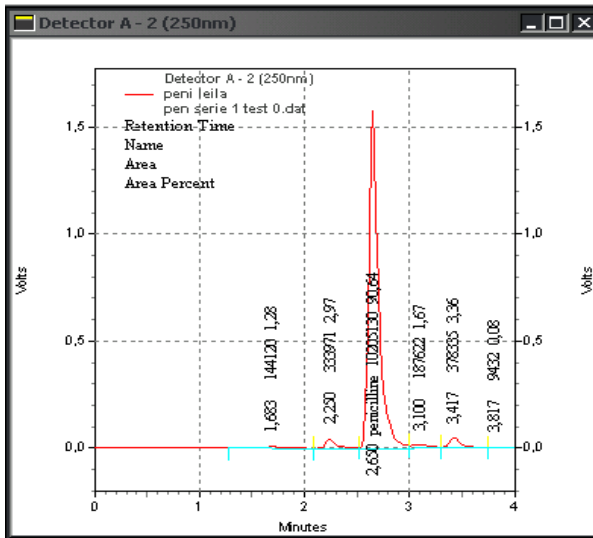


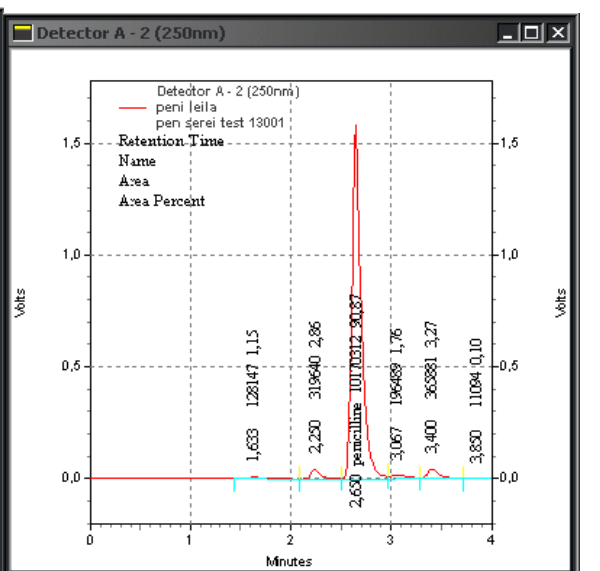
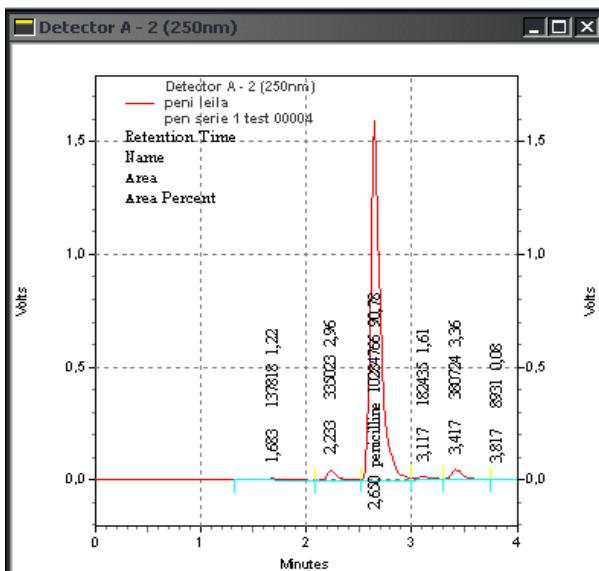
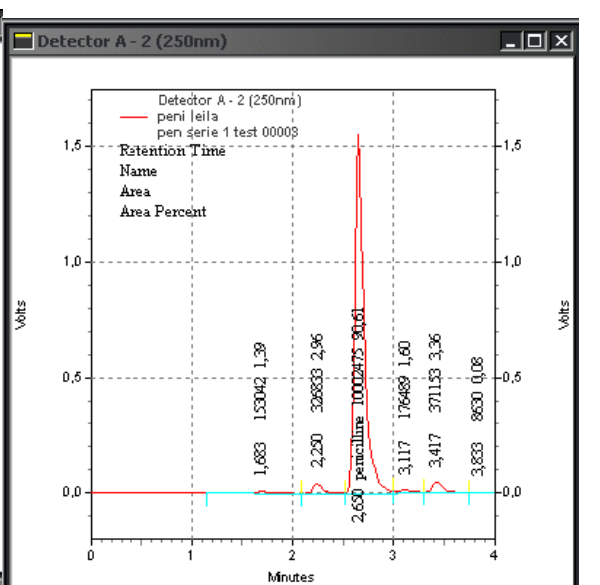
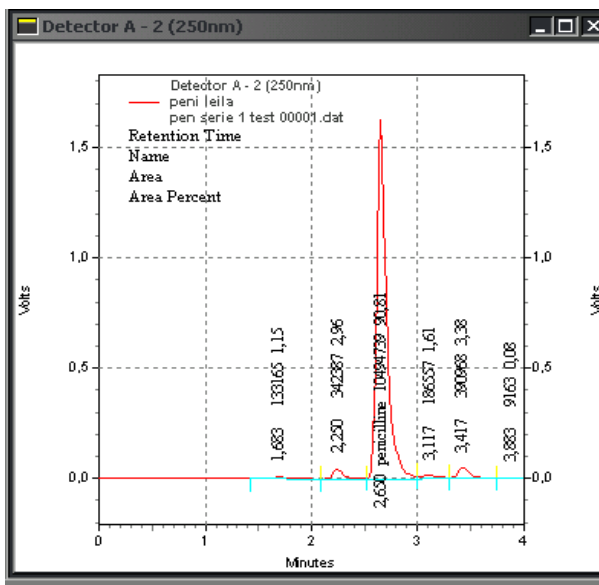
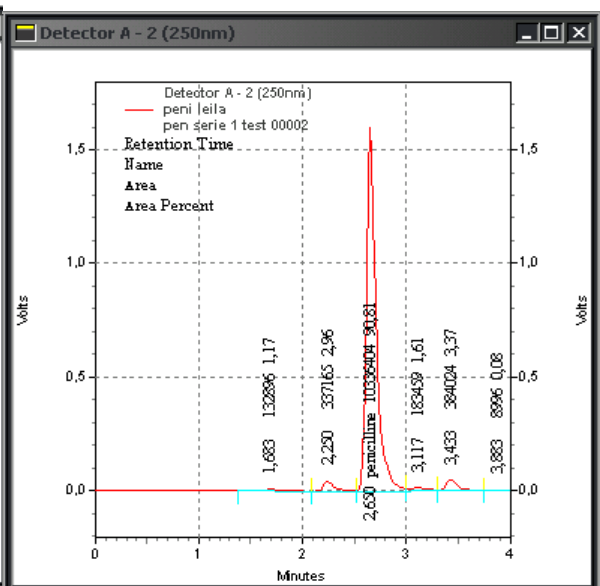
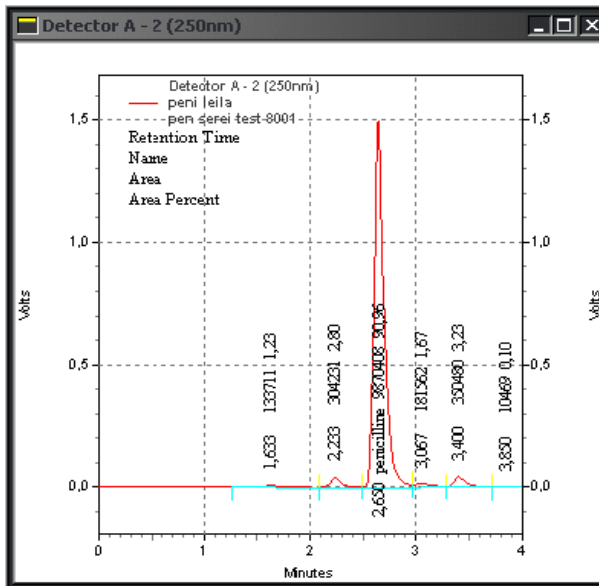


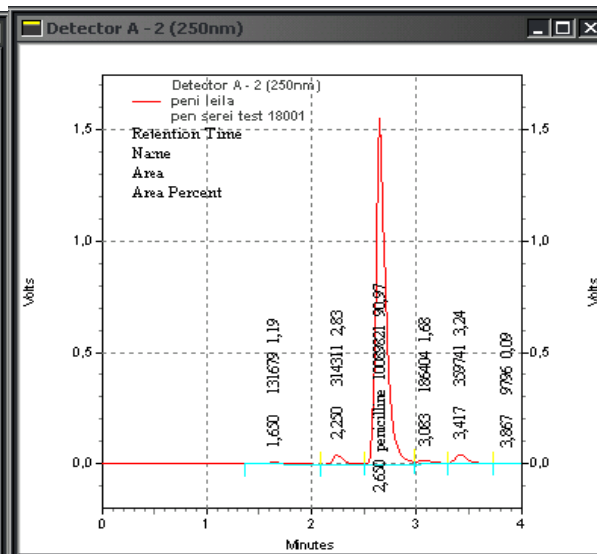
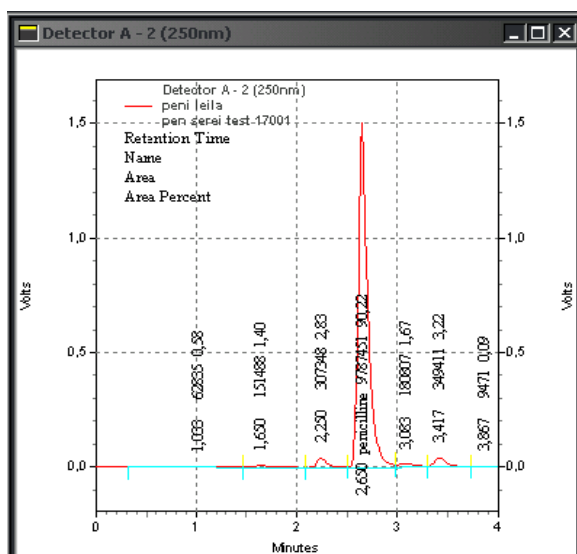
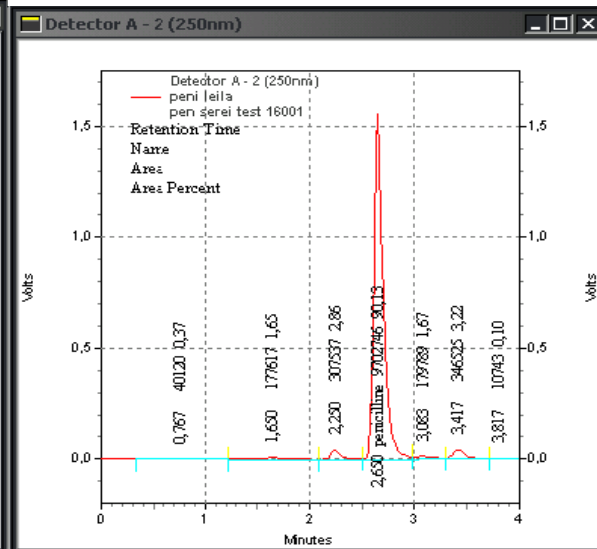
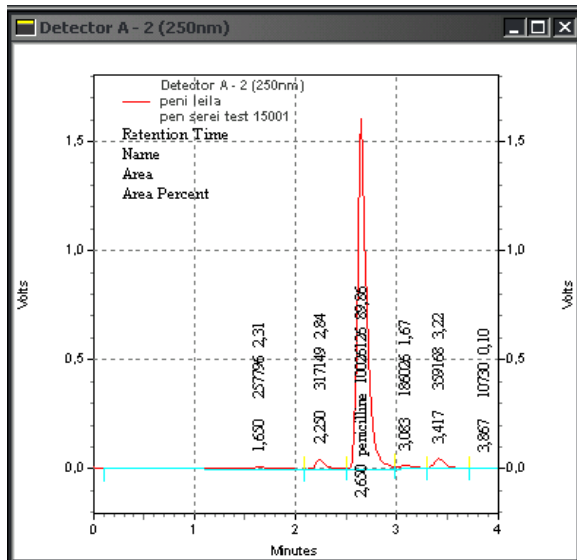
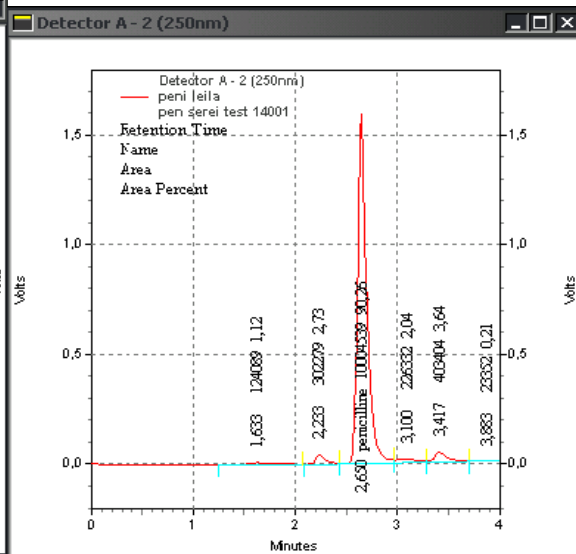
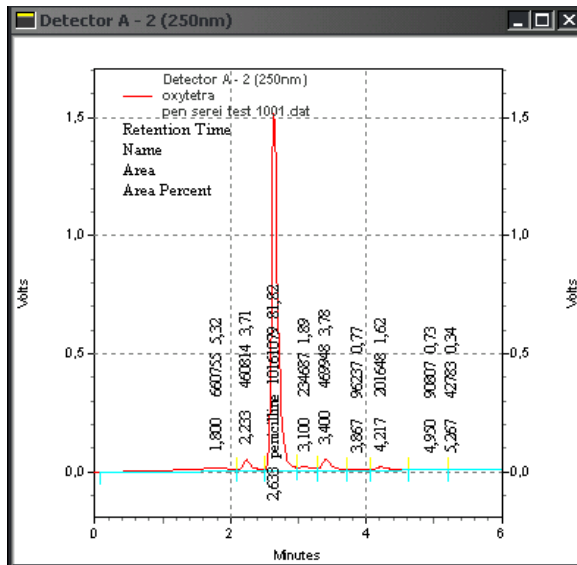
Tableaux n° 4: La reproductibilité de la pénicilline G

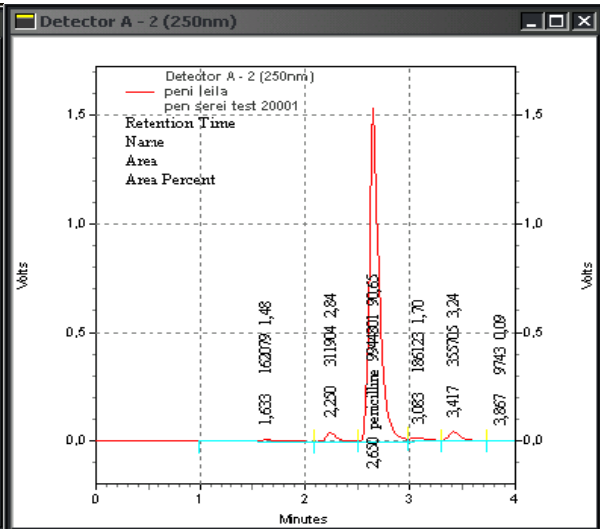
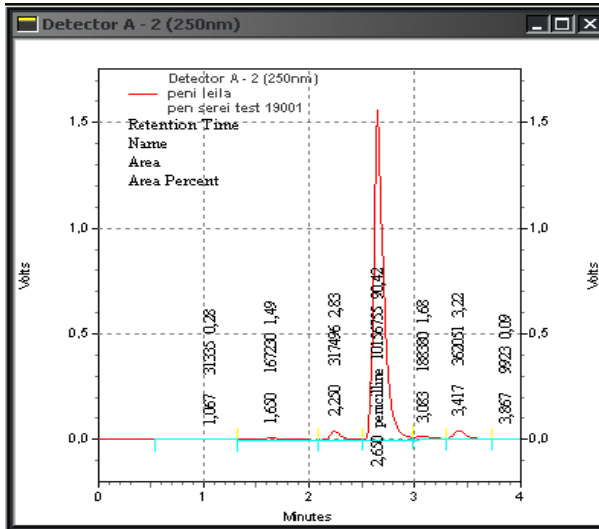
Tests n°	Série n ° 01	Série n ° 02	Série n ° 03
01	10205130	10374658	10168927
02	9660207	10161586	9981255
03	9853149	10030079	10255930
04	9739649	9307094	10066631
05	9864889	9601060	9932386
06	9783789	10078478	9972777
07	9870408	10123474	10140675
08	10336404	9600665	10006193
09	10497739	10072211	10303377
10	10002475	10169161	10274773
11	10284766	10203522	9893210
12	10170312	9866754	10189295
13	10161079	10335469	10519289
14	10004539	9764580	10308347
15	10026126	10014782	9867414
16	9702766	10098349	10162931
17	9787451	10047901	10140926
18	10089821	9976610	10239559
19	10156755	10025758	9789798
20	9944801	10296845	10446157
Total	200142255	200149036	202659850
Moyenne	10007112,8	10007451,8	10132992,5
Ecart type	228789,406	266448,216	193901,307
Coef de variation	2,28627%	2.6625%	1,91356%

Série 1

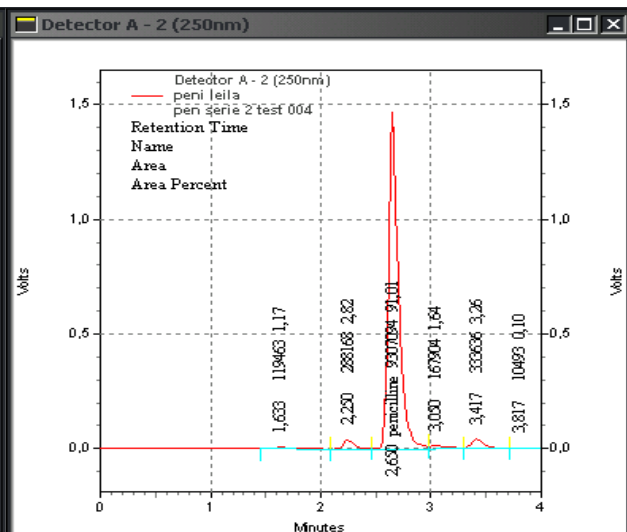
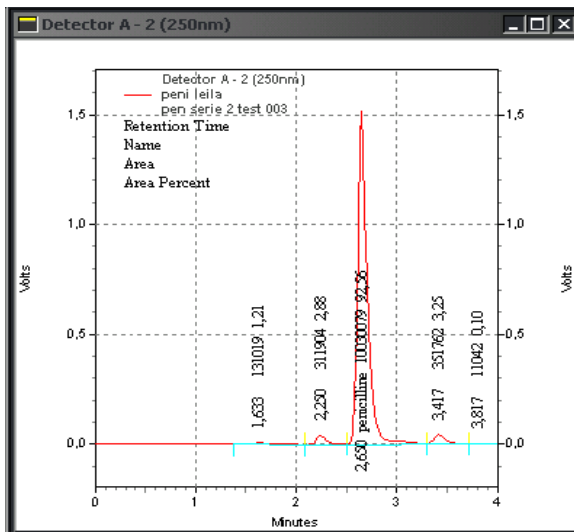
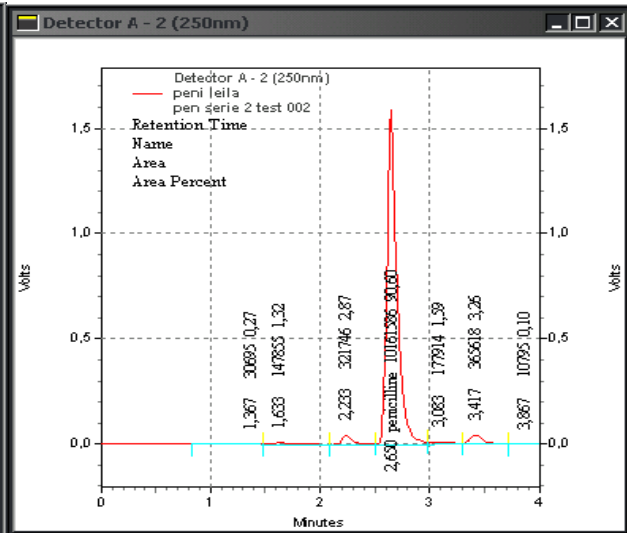
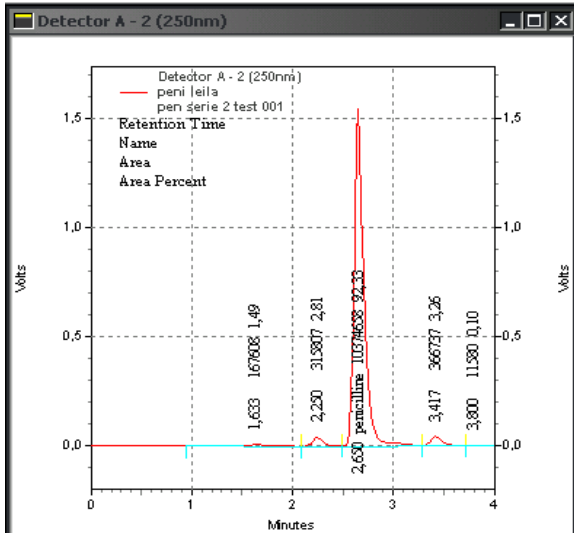


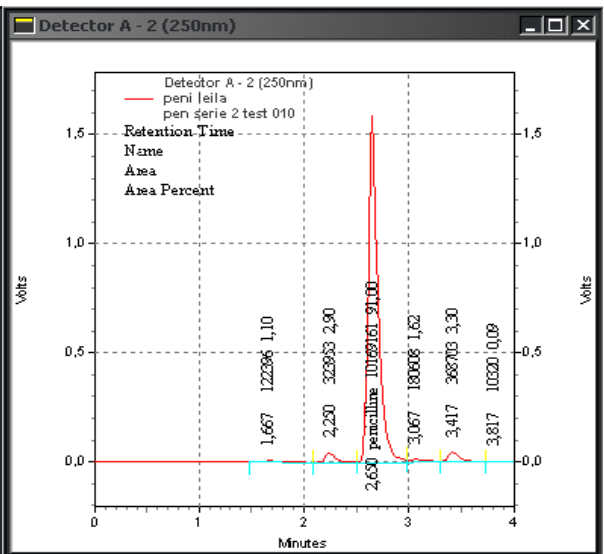
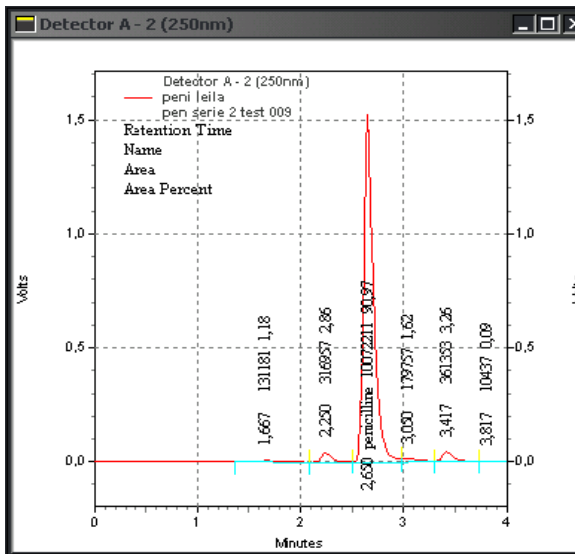
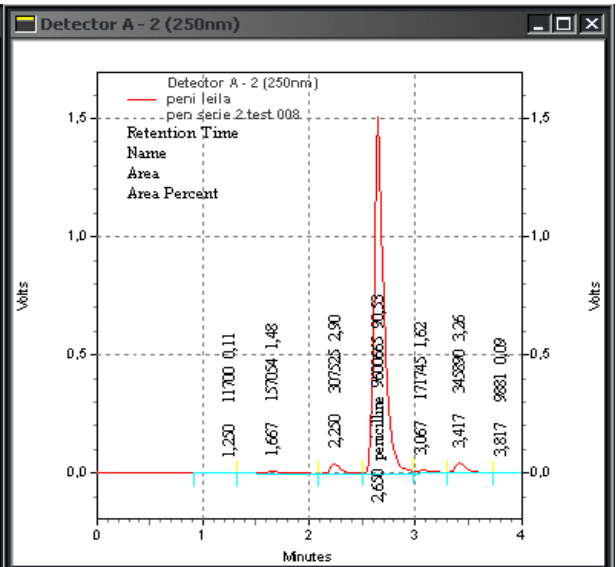
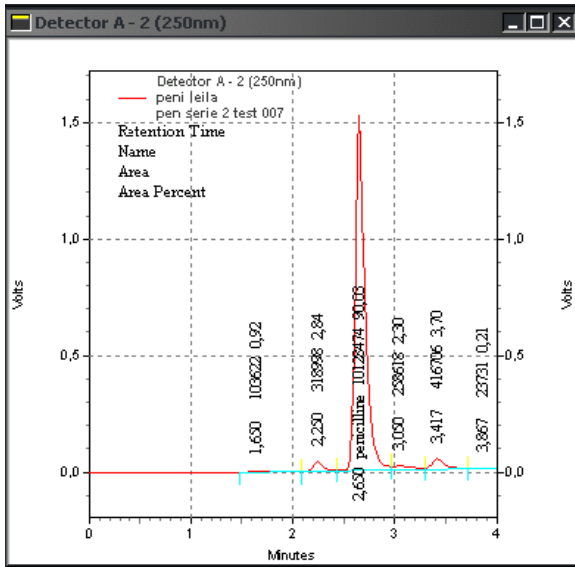
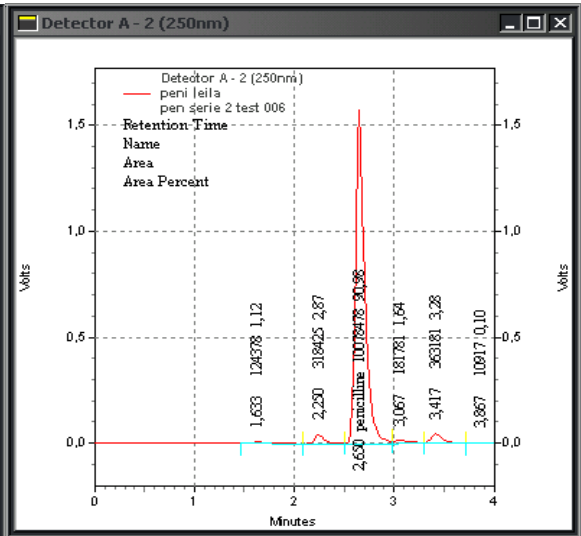
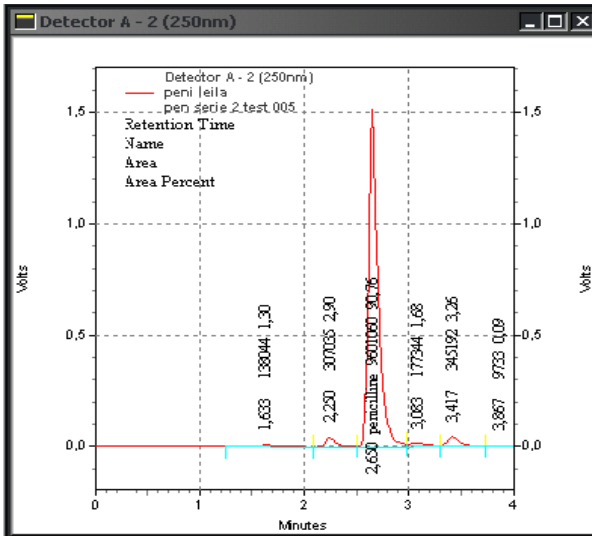


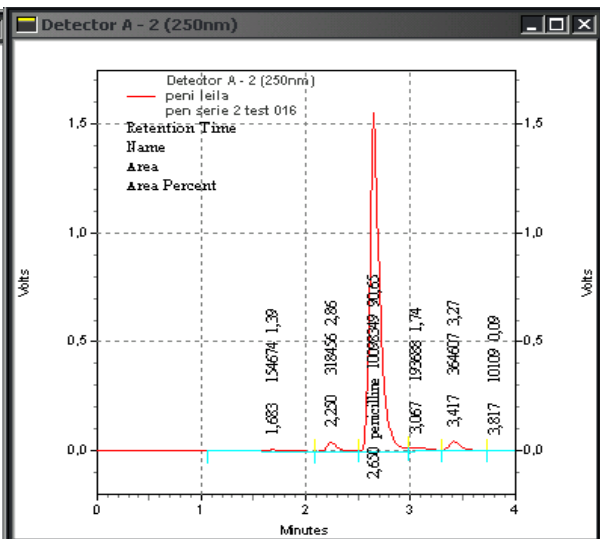
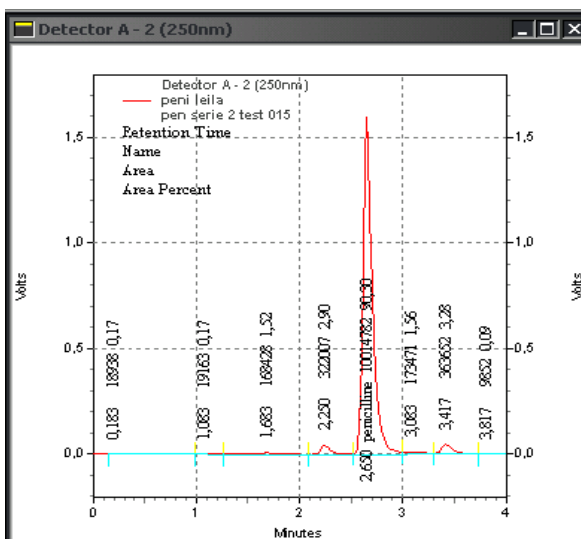
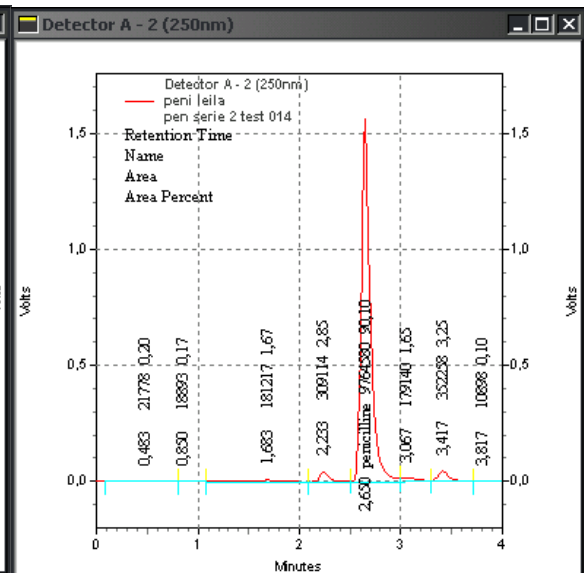
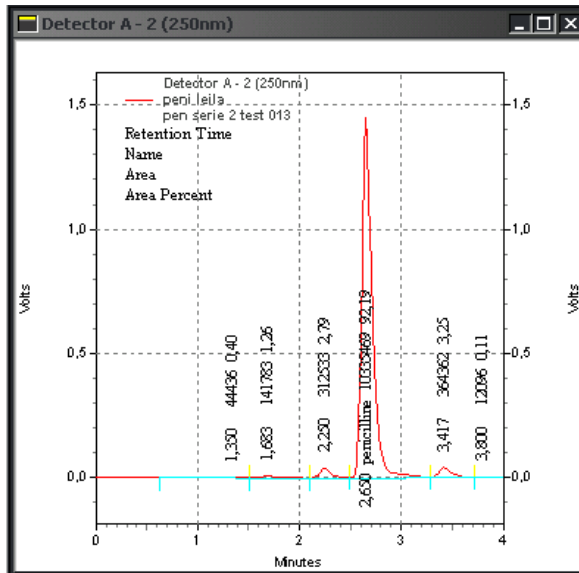
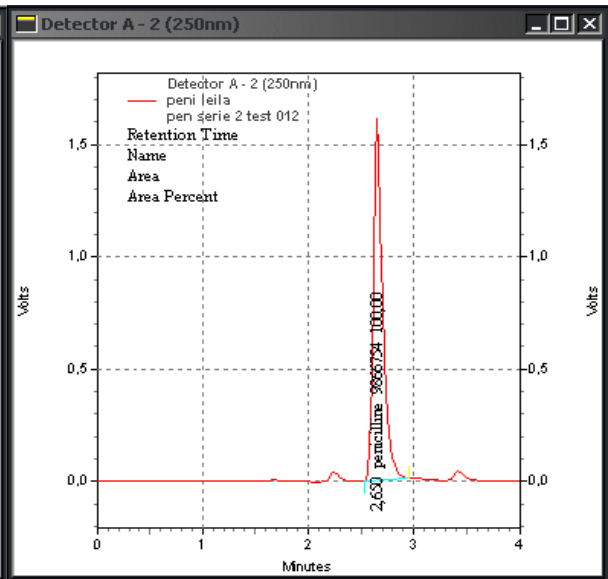
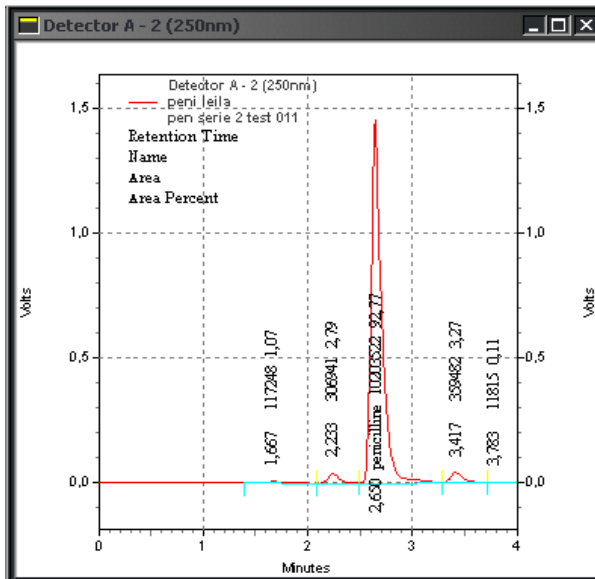


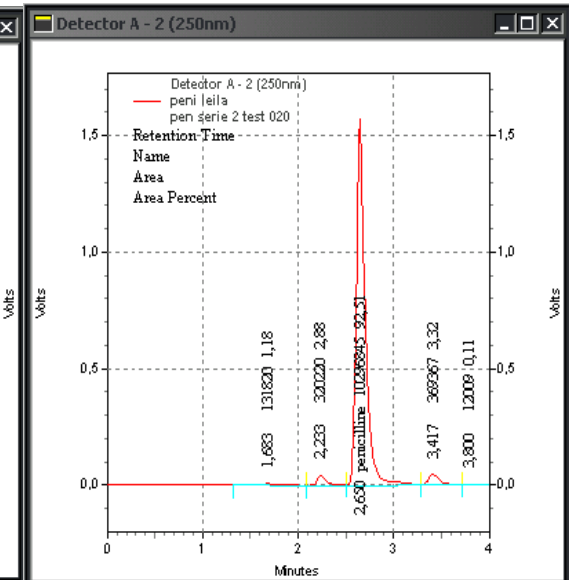
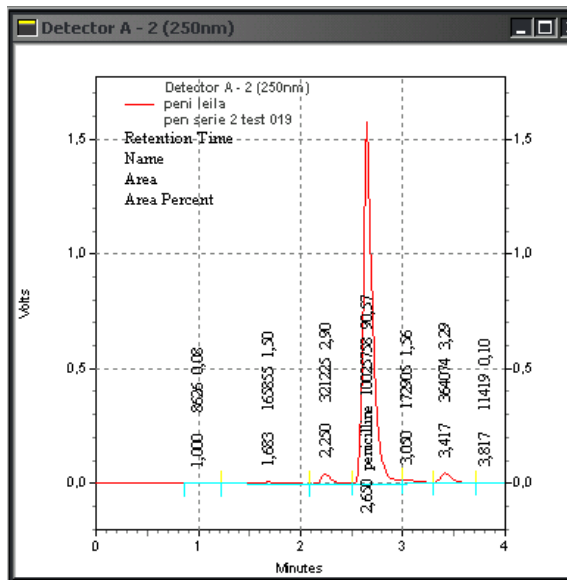
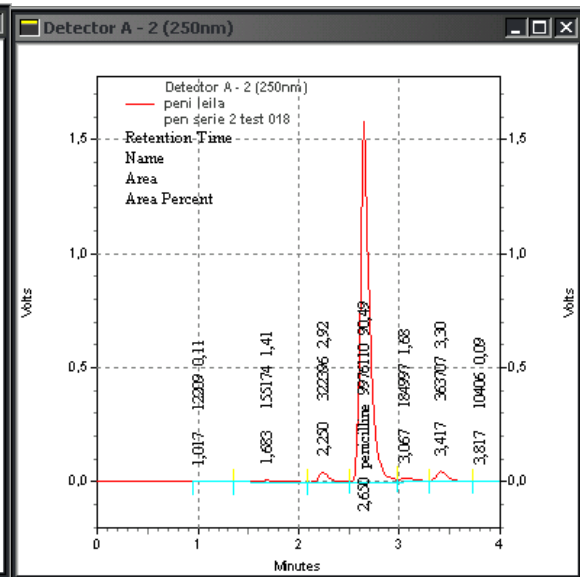
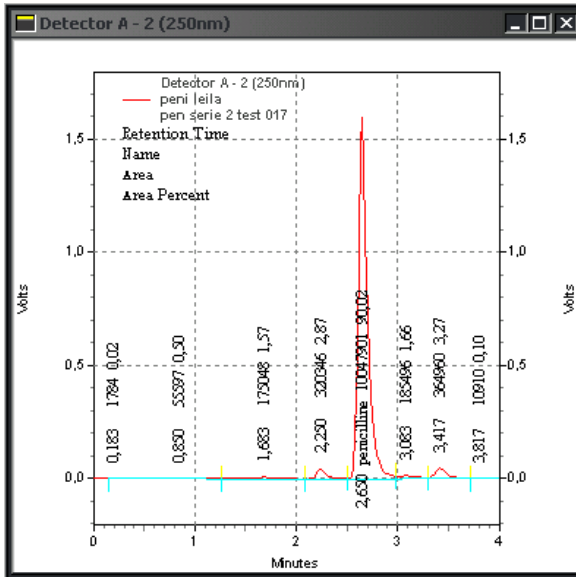


Série 2

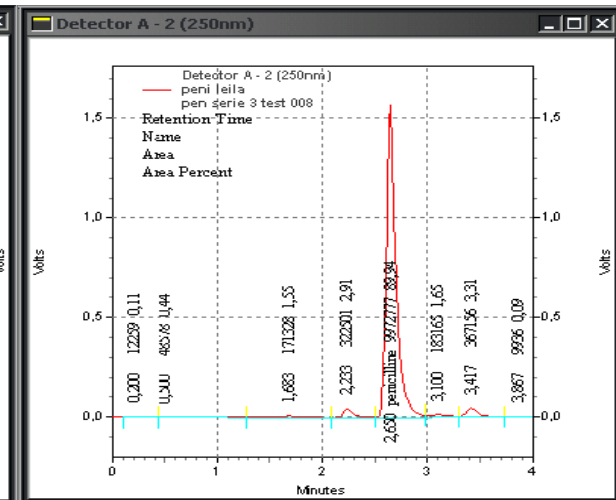
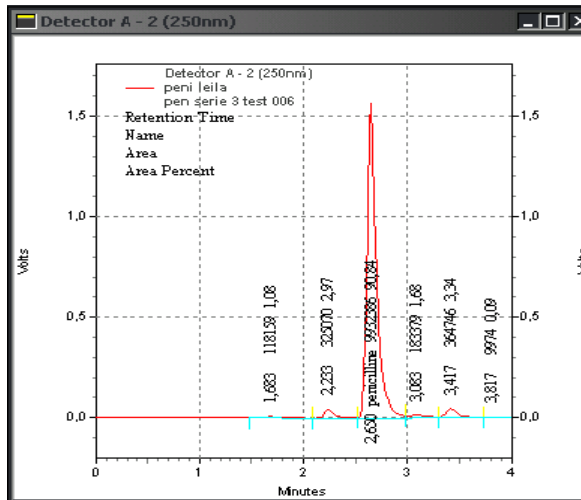
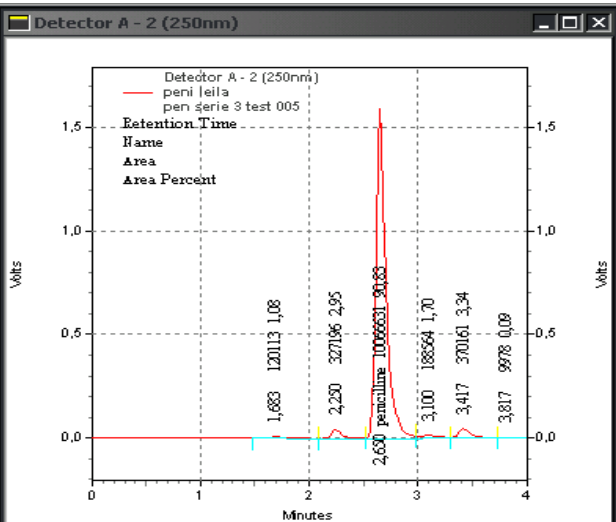
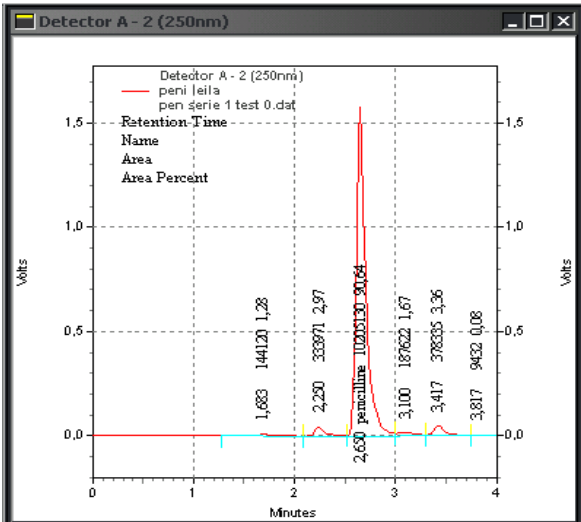
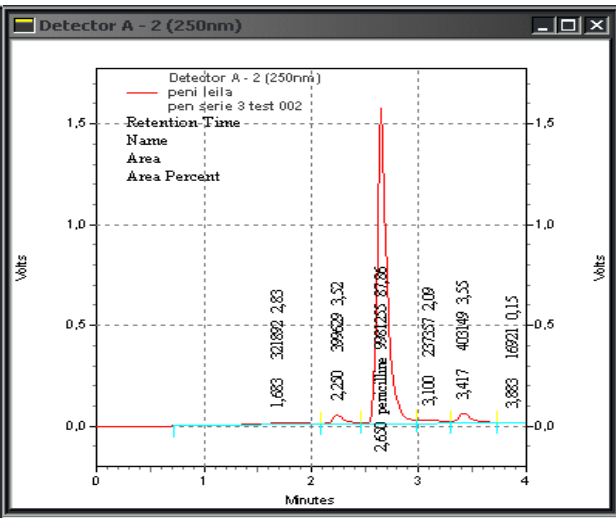
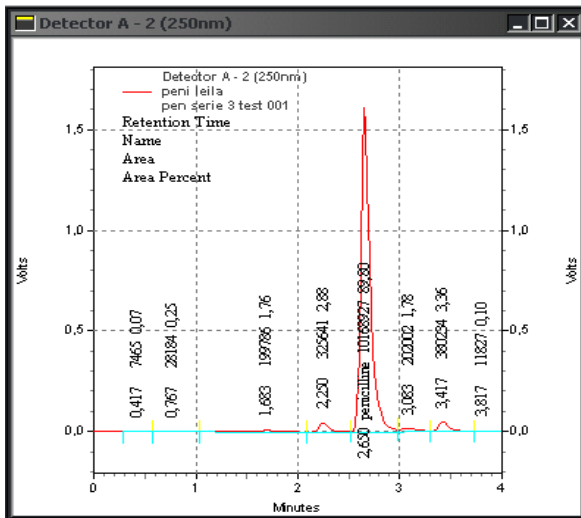


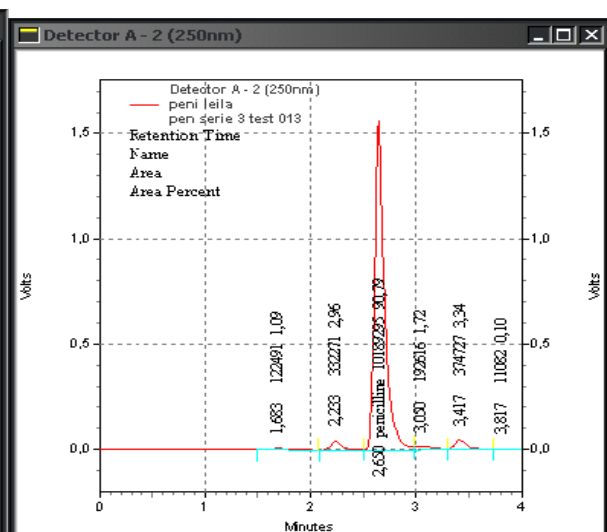
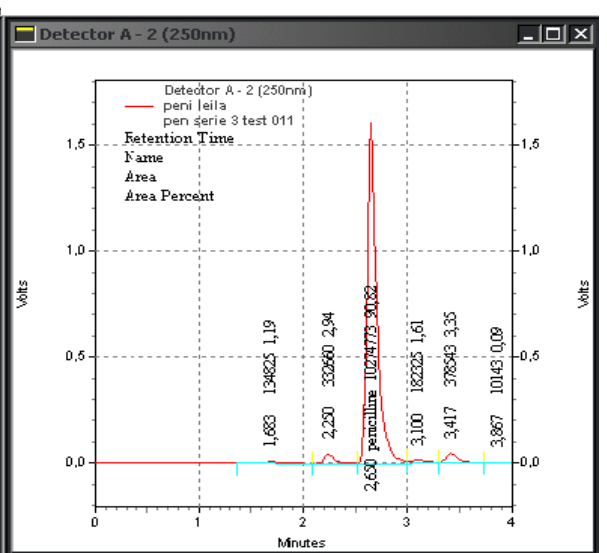
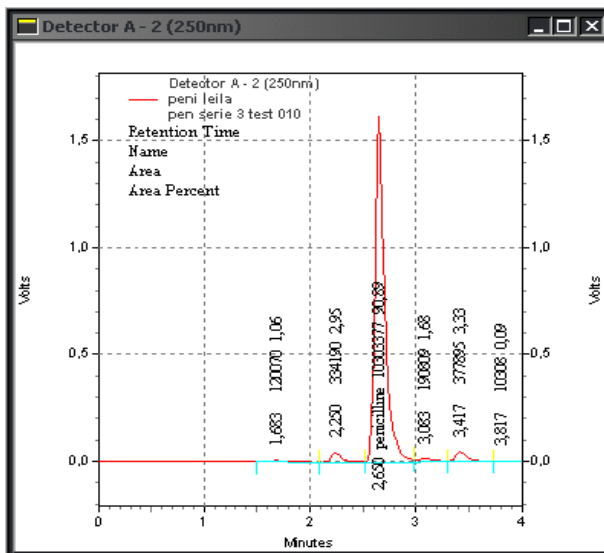
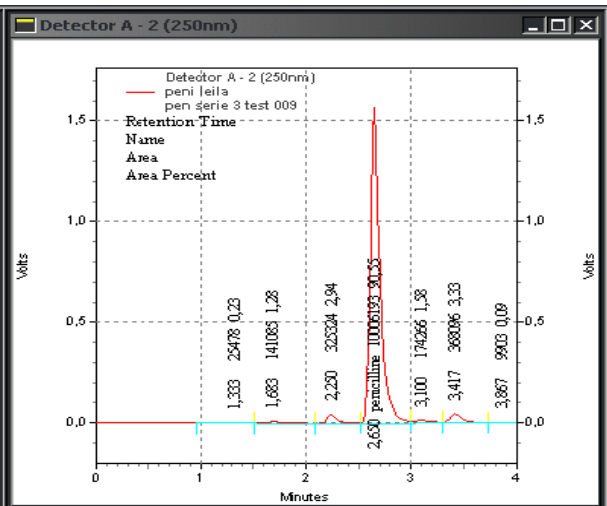
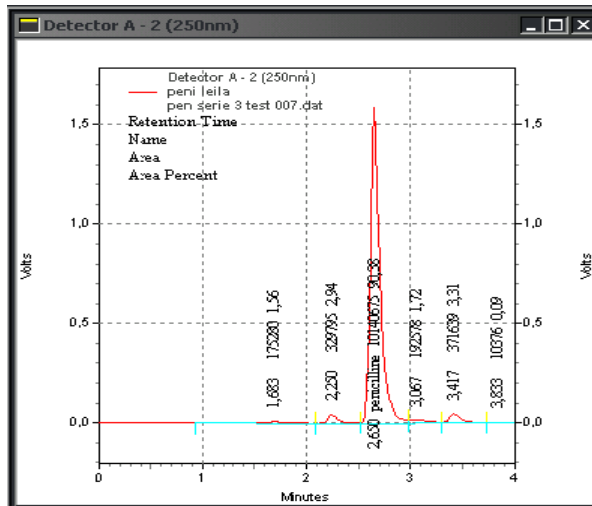


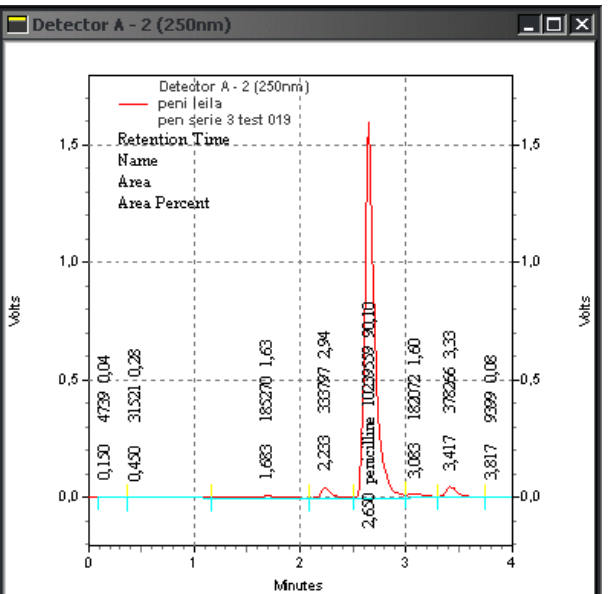
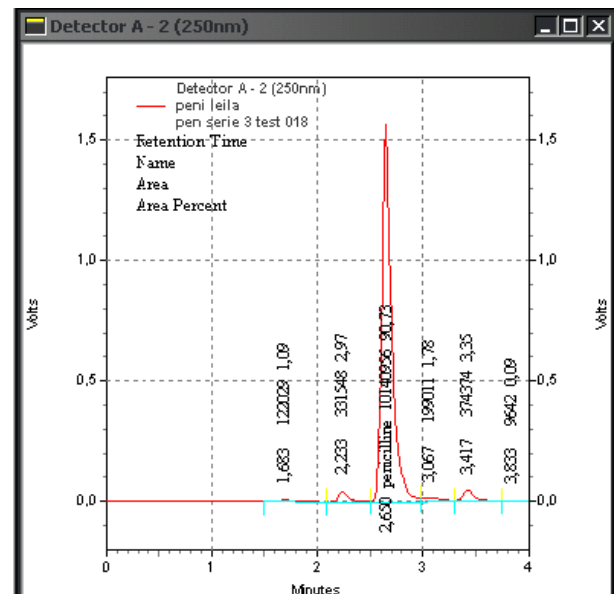
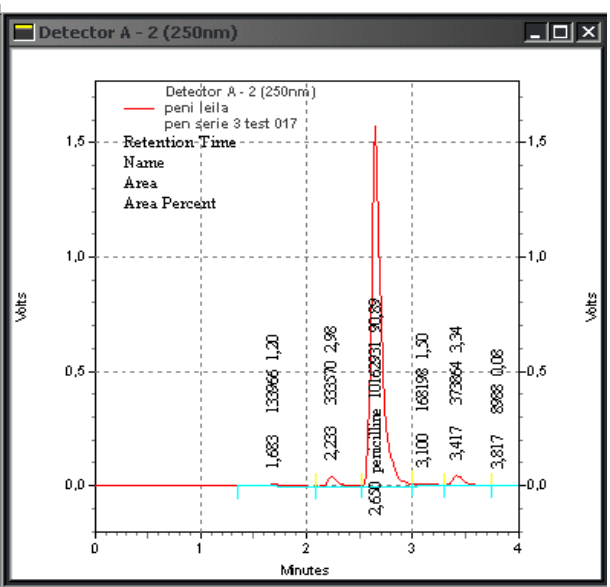
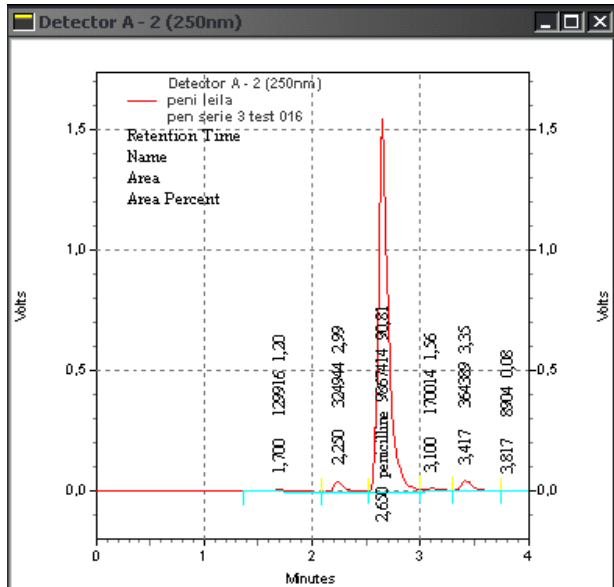
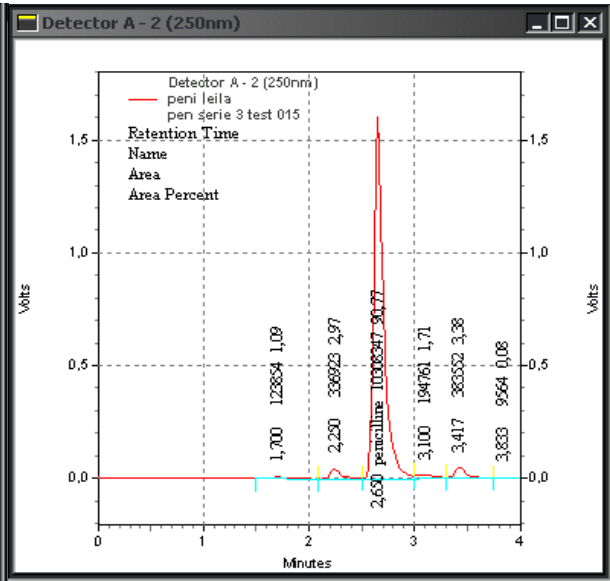
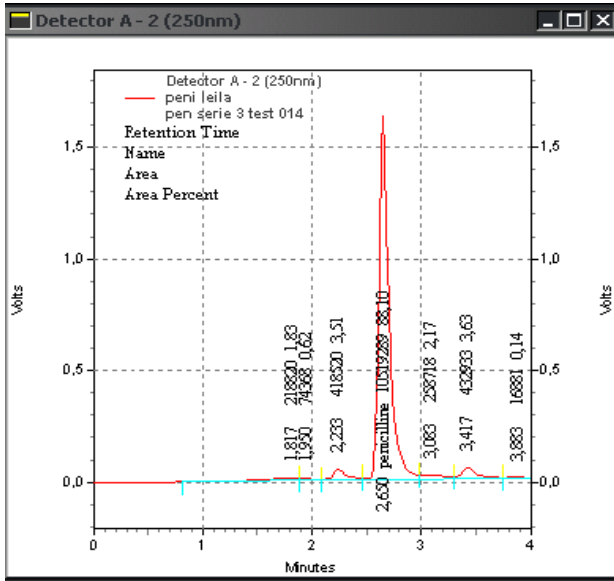


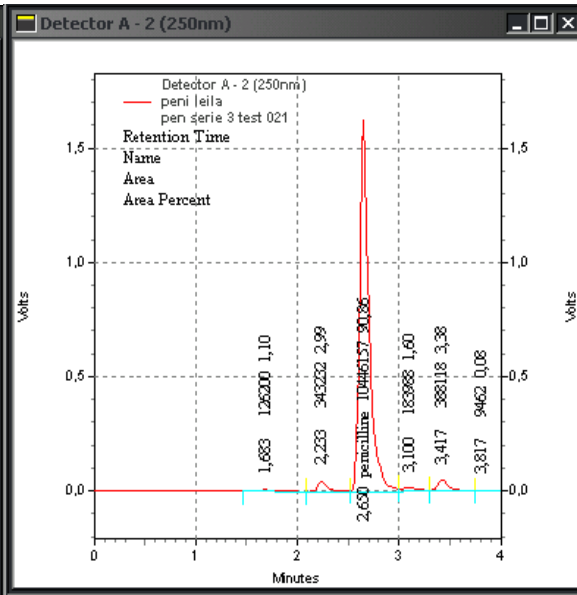
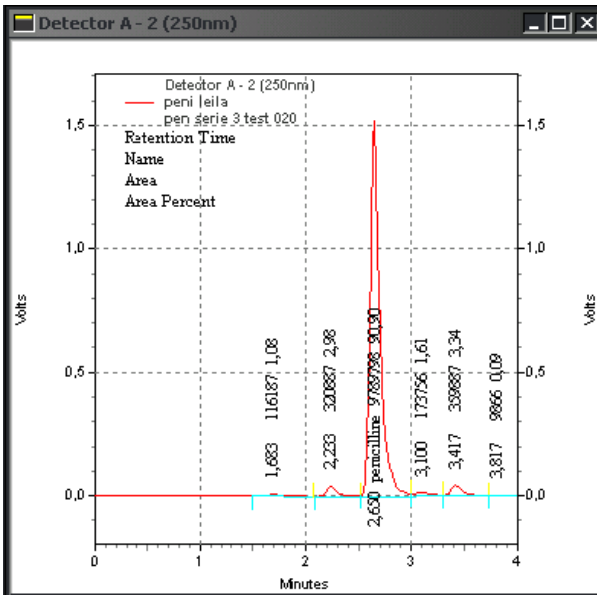


Serie 3









Résumé

L'auteur a procédé à l'optimisation des différents paramètres d'analyse chromatographique (HPLC) pour la détection et la quantification des résidus de l'oxytétracycline et la pénicilline G dans la viande rouge.

Les investigations expérimentales ont permis de retenir les paramètres suivants :

Pour l'oxytétracycline

- la phase stationnaire qui a été utilisée, est la phase inverse nommée C18.
- la phase mobile est constituée 100% d'acétonitrile.
- le débit est de 1,5 ml/min.
- l'absorption dans l'U.V. avec un maximum aux alentours de 325 à 344 nm.
- le volume injecté est de 11µl.

Pour la pénicilline G

- la phase stationnaire est la phase inverse C18.
- la phase mobile est constituée de 100% d'acétonitrile ou 100% de méthanol.
- le débit est de 1ml/min.
- le spectre d'absorption est de 220 à 250 nm.
- le volume injecté est de 20 µl.

Mots clés : HPLC, oxytétracycline, pénicilline G, viande rouge, résidus.

المخلص

ذهب الكاتب الى التوسع في مختلف معايير التحليل الكروماتوغرافي لاكتشاف وتقدير حجم بقايا الاكسيتيتراسيكلين والبنسلين ز في اللحوم الحمراء

التحقيقات التجريبية أسفرت عن اختيار المعايير التالية بالنسبة للاكسيتيتراسيكلين

- الطور الثابت : هو المرحلة المعكوسة ج 18
- الطور المتحرك : يتكون 100% من الاسيتونيتريل
- التدفق : يقدر ب 1,5 مل / ثا
- الامتصاص في الاشعة فوق البنفسجية : مع حد أقصى حوالي 325 إلى 344 نانومتر.
- الحجم المحقون : هو 11 ميكروليتر.

بالنسبة للبنسلين ز :

- الطور الثابت : هو المرحلة المعكوسة ج 18
- الطور المتحرك : يتكون 100% من الاسيتونيتريل او 100% من الميثانول
- التدفق : يقدر ب 1 مل / ثا
- الامتصاص في الاشعة فوق البنفسجية : مقدر ب 220 إلى 250 نانومتر.
- الحجم المحقون : هو 20 ميكروليتر.

الكلمات المفتاحية : الكروماتوغرافيا السائلة عالية الفعالية – الاكسيتيتراسيكلين - والبنسلين ز - اللحوم الحمراء - بقايا.

Abstrat

The perpetrator made to optimize the parameters of chromatographic analysis (HPLC) for the detection and quantification of residues of oxytetracycline and penicillin G in red meat.

The experimental investigations have resulted in the selection of the following parameters:

For oxytetracycline

- The stationary phase was used, is reverse phase C18.
- The mobile phase is 100% acetonitrile.
- The rate is 1.5 ml / min.
- Absorption in the U. V. with a maximum around 325 to 344 nm.
- The volume is injected 11µl.

For penicillin G

- The stationary phase is the phase inverse C18.
- The mobile phase consists of 100% to acetonitrile or methanol.
- The rate is 1ml/min.
- The absorption spectrum is 220 to 250 nm.
- Injected volume is 20 µl.

Key words: HPLC, oxytetracycline, penicillin G, red meat residue.

