

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTER DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE MUSTAPHA BENBOULAIID

-BATNA 2-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie des

Organismes



Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT TROISIEME CYCLE

Filière

Sciences Biologiques

Option

Biologie Cellulaire et Physiotoxicologie

Présentée par:

BOUTRID Safinez

Thème

**Recherche des résidus de médicaments vétérinaires dans
les denrées alimentaires d'origine animale**

Soutenue publiquement le : 16/12/2019

Jury :

Président : Mr. KASSAH-LAOUAR Ahmed
Rapporteur : Mr. TEBBANI Abdelhamid Yacine
Examineur : Mr. MELIZI Mohamed
Examineur : Mr. KEBIECHE Mohamed
Examineur : Mr. BERTELLA Nabil

Grade et Université :

Professeur Univ. de Batna2
M. C. A. Univ. de Batna1
Professeur Univ. de Batna1
Professeur Univ. de Batna2
M. C. A. Univ. de Batna2

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

Je tiens à remercier vivement :

Le Docteur Abdelhamid Yacine Tebbani, mon directeur de thèse, pour son aide, ses précieux conseils, son professionnalisme, sa disponibilité ..., malgré ses innombrables préoccupations scientifiques.

Le Professeur Kassab-Laouar Ahmed de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance et lui exprimer toute ma gratitude pour ses pertinentes remarques.

Ainsi que les membres du jury en l'occurrence : le Professeur Melizi Mohamed, le Professeur Kebieche Mohamed et le Docteur Bertella Nabil pour leur lecture attentive de ma thèse et l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie de ce jury.

Monsieur le doyen de la faculté, le Professeur Chafaa Smail, pour l'aide précieuse qu'il m'avait apporté sans retenue.

Le Dr. Abd Ed Daim et le Dr. L'kbir de l'université de Batna 01, le Dr. Chougui, le Dr. Bendamen et le Dr. Timagout de l'université de Constantine, ainsi que les laborantines pour toute l'aide qu'ils m'avaient apportées.

Tous mes professeurs du département de Biologie enseignants et responsables qui ont tous contribué à ma réussite.

Dédicace

A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien, leur omniprésence dans ma vie et pour avoir toujours été présents pour moi, m'aidant à avancer dans la vie. Qu'ils reçoivent à travers ce travail l'expression de mon éternelle gratitude.

A mes frères et sœurs Khaled, Med Lamine, Hanane, Hichem et mes belles sœurs Naaima et Wafa qui ont été pour moi des exemples de persévérance, de réussite et de générosité.

Sans oublier ma nièce et mon neveu Anaïsse et Adriane qui sont notre source de joie et de bonheur à tous.

A tous mes amis qui m'ont soutenu et encouragé durant mon parcours.

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Listes des annexes	
Liste des abréviations	
Introduction générale	

PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ÉVOLUTION DE L'AVICULTURE EN ALGÉRIE

I- Place et structuration de la filière avicole en Algérie	1
II- Performance de la filière avicole en Algérie	3
III- Alimentation en aviculture en Algérie.....	3

CHAPITRE II : GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIBIOTIQUES

I. Définition et origine des antibiotiques	5
II. Pharmacocinétique des principes actifs	5
1.Absorption.....	5
2. Distribution.....	6
3. Métabolisme et biotransformations	6
4.Elimination.....	7
III. Mode d'action des antibiotiques.....	7
1.Antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne	8
2.Antibiotiques actifs sur les membranes	8
3.Antibiotiques actifs sur la synthèse protéique.....	8
4.Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques.....	9

5. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique	9
IV. Consommation des antibiotiques dans le monde	10
V. Résistance bactérienne aux antibiotiques	11

CHAPITRE III : RÉSIDUS ANTIBIOTIQUES

I- Généralités sur les résidus d'antibiotiques	13
1. Notion de « résidu médicamenteux »	13
2. Origine des résidus antibiotiques.....	13
2-1. Utilisation à titre thérapeutique curatif.....	13
2-2. Utilisation en métaphylaxie.....	14
2-3. Utilisation en antibioprévention.....	14
2-4. Utilisation en tant qu'additifs alimentaire	14
3. Mode d'action des antibiotiques facteurs de croissance	15
3-1. Diminution de la prévalence des infections.....	15
3-2. Réduction de la production de métabolites toxiques	15
3-3. Augmentation de la disponibilité de nutriments pour l'hôte.....	15
3-4. Amélioration de l'absorption intestinale	15
3-5. Inhibition de la réponse inflammatoire	16
II. Risques sanitaires causés par les résidus d'antibiotiques	16
1. Risque de toxicité directe	16
2. Risque allergique.....	17
3. Risque cancérigène	17
4. Risque de perturbation de la flore digestive du consommateur	18
5. Risques d'antibiorésistance.....	19
III. Réglementation sur les résidus de médicaments vétérinaires	19
1. Limite maximale de résidu (LMR)	19
2. La dose journalière acceptable (DJA)	20
3. Le délai d'attente	20

CHAPITRE IV : MÉTHODES DE DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

I. Méthodes de dépistage	21
1.Méthodes microbiologiques.....	21
1-1.La méthode de référence : méthode des 4 boîtes	21
1-2.Méthode alternative : PremiTest	22
2.Méthodes biochimiques	22
2-1.Méthode enzymatique : PenzymTest.....	22
2-2.Méthode sur tiges : le test β -STAR.....	23
3.Méthodes immunologiques.....	23
3-1.La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).....	23
3-2.RIA (Radio Immuno Assay) et RRA (Radio Receptor Assay)	24
II. Méthodes de confirmation	24
1.Méthodes chromatographiques.....	24
1-1.Techniques d'extraction.....	24
1-1.La chromatographie liquide haute performance (HPLC)	25
1-2.Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	27
1-3.Chromatographie sur couche mince (CCM).....	27
2.Méthode spectrométrique : spectrométrie de masse (SM).....	27
3.Couplage CPG-SM et couplage HPLC-SM	28

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel	29
1.Echantillonnage	29
2. réactifs et produits chimiques	32
2-1.Etalons analytiques	32

2-2.Eluants et diluants	34
2-3.Autres produits chimiques	34
3.Appareillage	34
II. Méthodes	37
1.Préparation de la solution d'extraction d'OTC.....	37
2. Préparation du tampon phosphate salin	37
3. Procédure d'extraction et de précipitation	37
4.Détection microbiologique	41
5.Confirmation chromatographique	43
5-1.Conditions chromatographiques	43
5-2.Tests de nettoyage.....	45
5-3.Préparation des solutions standards	45
5-4.Préparation des solutions étalon ou des solutions filles	45
5-5.Filtration.....	45
5-6.Quantification	46
6.Traitement thermique et congélation des échantillons positifs	46
7. Echantillons enrichis	47
8. Paramètres de validation de la méthode	48
9.Analyse statistique	49

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats	50
1.Détection microbiologique	50
2. Confirmation chromatographique	52
2-1.Clibrage de l'appareil.....	52
2-2.Paramètres de validation de la méthode	54
2-3.Résultats de l'analyse chromatographique	56
3.Effet du traitement thermique et de la congélation sur les résidus d'ATB.....	68
3-1.Ebullition.....	61
3-2.Friture	62
3-3.Congélation	63
II. Discussion	65

Conclusion générale et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des figures

Figure 01. Modalité d'action des antibiotiques.....	9
Figure 02. Niveau de consommation mondiale des antibiotiques	10
Figure 03. Les différents mécanismes d'antibiorésistance.....	12
Figure 04. Zone d'inhibition	21
Figure 05. Schéma représentant l'appareillage de l'HPLC	26
Figure 06. Présentation d'un pic	26
Figure 07. Elevage de volaille	29
Figure 08. Prélèvement des échantillons	31
Figure 09. Echantillons à analyser.....	31
Figure 10. Structure chimique d'Oxytétracycline	32
Figure 11. Structure chimique de colistine.....	33
Figure 12. Structure chimique d'Ampicilline.....	33
Figure 13. Appareil HPLC	34
Figure 14. Extraction et précipitation d'OTC	38
Figure 15. Extraction et précipitation de Colistine	39
Figure 16. Extraction et précipitation d'Ampicilline	40
Figure 17. Application des disques dans une boîte de pétri de 90 mm de diamètre	42
Figure 18. Zone d'inhibition	50
Figure 19. Moyennes des zone d'inhibition au niveau du foie, du rein et du muscle chez le poulet de chair	52
Figure 20. Chromatogramme obtenu lors du calibrage de l'appareil	53
Figure 21. Courbe d'étalonnage d'OTC	55
Figure 22. Courbe d'étalonnage de colistine.....	55
Figure 23. Courbe d'étalonnage d'Ampicilline	56

Figure 24. Chromatogramme d'OTC	57
Figure 25. Chromatogramme de colistine	57
Figure 26. Chromatogramme d'Ampicilline	58
Figure 27. Concentration des résidus d'ATB au niveau du foie, du rein et du muscle pectoral chez le poulet de chair (moyenne \pm SEM en $\mu\text{g}/\text{kg}$) (* $p \leq 0.05$).....	60
Figure 28. Effet de l'ébullition à 100 °C pendant 30 minutes sur la concentration des résidus d'ATB (moyenne \pm SEM en $\mu\text{g}/\text{kg}$) (* $p \leq 0.05$).....	62
Figure 29. Effet de la friture à 200 °C pendant 10 minutes sur la concentration des résidus d'ATB (moyenne \pm SEM en $\mu\text{g}/\text{kg}$) (** $p \leq 0.01$).....	63
Figure 30. Effet de la congélation à -20 °C durant un mois sur la concentration des résidus d'ATB (moyenne \pm SEM en $\mu\text{g}/\text{kg}$) (* $p \leq 0.05$).....	64

Liste des annexes

Annexe 01 : Anti-infectieux dont l'usage est interdit pour le traitement des animaux dont les productions sont destinées à la consommation.

Annexe 02 : Limites maximales résiduelles (LMR) des antibiotiques exprimés en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Annexe 03 : Molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire.

Annexe 04 : Les principales familles d'antibiotiques.

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxy Nucléique.

AFCs : Antibiotiques Facteurs de Croissance.

Ala : Alanine.

ARF : Antibiotique Régulateur de Flore.

ARN : Acide Ribo Nucléique.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CEE : Communauté Economique Européenne.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CTC : ChloroTétraCycline.

DC : DoxyCycline.

DJA : Dose Journalière Acceptable.

DSE : Dose Sans Effet.

E.coli : Escherichia coli.

EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid.

ELISA : Enzyme Linled Immuno Sorbent Assay.

g: Gramme.

GC-MS : Gaz Chromatography Mass Spectrometry.

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance.

J : Jour.

Kg : KiloGramme.

l : Litre.

LC-MS : Liquid Chromatography Mass Spectrometry.

LLE : Extraction Liquide-Liquide.

LMR : Limite Maximale de Résidu.

LOD : Limite de Détection.

LOQ : Limite de Quantification.

m : Masse.

M : Molaire.

mg : MilliGramme.

min : Minute.

ml : MilliLitre.

mm : MilliMètre.

mM : MilliMolaire.

Na₂EDTA : Dihydrate d'Ethylène Diamine Tétracétate DiSodique.

Na₂HPO₄: HydrogénoPhosphate de Sodium.

OMS : Organisation de la Santé Mondiale.

ONAB : Office National des Aliments du Bétail.

OTC : OxyTétracycline.

PBS : Tampon Phosphate Salin.

PenG : Pénicilline G.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PIB : Produit International Brut.

r : Coefficient de corrélation.

RIA : Radio Immuno Assay.

rpm : Rotation Par Minute.

RRA : Radio Receptor Assay.

S : Sverdberg.

SEM : Standard Error Of the Mean.

SM : Spectrométrie de Masse.

TCs : Tétracyclines.

UE : Union Européenne.

UI : Unité Internationale.

UV : Ultra-Violet.

z : Charge.

°C : Degré Celsius.

µg : MicroGramme.

µl : MicroLitre.

µm : MicroMètre.

Résumé

Notre travail a été élaboré en vue de déterminer les résidus d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline dans les tissus comestibles chez le poulet de chair, ainsi que d'évaluer l'effet du traitement thermique sur la persistance de ces résidus antibactériens. Au total 600 échantillons de foie, de rein et de muscle (200 échantillons chacun) ont été prélevés à partir de poulets de chair pris au hasard auprès de plusieurs fermes au niveau de la commune de Ain Touta (Batna, Algérie). En première partie, les échantillons ont été analysés en utilisant une méthode microbiologique comme méthode de dépistage basée sur l'inhibition de la croissance bactérienne. Les échantillons révélés positifs par test de dépistage ont été soumis à un test de confirmation par chromatographie liquide à haute performance et ont révélé une concentration moyenne d'oxytétracycline estimée de 958.81 ± 4.9 , 626.35 ± 7.94 et 194.17 ± 0.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au niveau des tissus hépatiques, rénaux et musculaires, respectivement, une concentration résiduelle moyenne de colistine estimée de 141.17 ± 5.98 , 136.59 ± 1.74 et 108.62 ± 3.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au niveau du foie, des reins et du muscle, respectivement, et une concentration moyenne d'ampicilline estimée de 73.14 ± 0.59 , 68.54 ± 1.42 et 63.09 ± 0.77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au niveau des tissus hépatiques, rénaux et musculaires, respectivement. Les résultats de cette analyse chromatographique démontrent que la concentration d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline au niveau du foie était significativement plus élevée que sa concentration au niveau du rein et du muscle. En second partie, les échantillons confirmés positifs ont été soumis à un traitement thermique par ébullition, friture et congélation. Les résultats de cette analyse ont révélé que l'ébullition et la congélation induisaient une diminution significative des concentrations résiduelles des antibiotiques. D'autre part, la friture des échantillons positifs induit une diminution très significative de la concentration résiduelle moyenne de ces antibiotiques. Ainsi, les méthodes de cuisson (ébullition et friture) et de congélation induisent une destruction partielle des résidus d'antibiotiques et ne peuvent être utilisées comme des méthodes fiables pour éliminer les résidus. Le seul moyen pour mieux se protéger est de prolonger le délai d'attente.

Mots clés : Oxytétracycline ; Colistine ; Ampicilline ; *Bacillus Subtilis* ; *Bacillus Cereus* ; *Micrococcus luteus* ; HPLC-UV.

Abstract

Our work has been developed to determine residues of oxytetracycline, colistin and ampicillin in edible tissues in broiler chickens, as well as to evaluate the effect of heat treatment on the persistence of these residues. A total of 600 liver, kidney and muscle samples (200 samples of each organ) were taken from random broilers from several farms in Ain Touta (Batna, Algeria). In the first part, the samples were analyzed using a microbiological method as a screening method based on the inhibition of bacterial growth. Samples tested positive were subjected to a confirmatory high performance liquid chromatography test and revealed an average concentration of oxytetracycline estimated of 958.81 ± 4.9 , 626.35 ± 7.94 and 194.17 ± 0.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in liver, kidney and muscle tissues, respectively, a mean concentration of 141.17 ± 5.98 , 136.59 ± 1.74 and 108.62 ± 3.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of colistin in the liver, kidneys and muscle, respectively, and an average concentration of 73.14 ± 0.59 , 68.54 ± 1.42 and 63.09 ± 0.77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of ampicillin in hepatic, renal and muscular tissues, respectively. The results of this chromatographic analysis demonstrate that the concentration of oxytetracycline, colistin and ampicillin in the liver was significantly higher than its concentration in kidney and muscle. In the second part, the positive confirmed samples were subjected to a heat treatment by boiling, frying and freezing. The results of this analysis revealed that boiling and freezing of the positive samples induced a significant decrease in the residual concentrations of oxytetracycline, colistin and ampicillin. On the other hand, frying positive samples induces a very significant decrease in the average residual concentration of these antibiotics. Thus, cooking (boiling and frying) and freezing methods induce partial destruction of antibiotic residues. Therefore, these methods can not be used as reliable methods to remove antibiotic residues in broiler meat and the only way to better protect ourselves is to prolong the waiting time.

Keywords: Oxytétracycline ; Colistine ; Ampicilline ; *Bacillus Subtilis* ; *Bacillus Cereus* ; *Micrococcus luteus* ; HPLC-UV.

ملخص

قد تم تطوير عملنا لتحديد بقايا الأوكسيتترا سيكلين، الكوليستين والأمبيسلين في الأنسجة الصالحة للأكل في الدجاج ولتقييم تأثير المعالجة الحرارية على استمرار تواجد مخلفات هذه المضادات الحيوية. تم أخذ 600 عينة من الكبد، الكلى والعضلات (200 عينة من كل عضو) من الدجاج عشوائياً من عدة مزارع في مدينة عين التوتة (باتنة، الجزائر). في الجزء الأول، تم تحليل العينات باستخدام طريقة ميكروبيولوجية كطريقة فحص، تعتمد على تثبيط نمو البكتيريا. ثم تعريض العينات الإيجابية لاختبار تأكيد بواسطة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء وكشفت أن متوسط تركيز الأوكسيتترا سيكلين قدر بـ 4.9 ± 958.81 ، 7.94 ± 626.35 و 0.61 ± 194.17 ميكروغرام/كغ في أنسجة الكبد، الكلى والعضلات، على التوالي. قدر متوسط تركيز مخلفات الكوليستين بـ 5.98 ± 141.17 ، 1.74 ± 108.62 و 3.51 ± 108.62 ميكروغرام/كغ في الكبد، الكلى والعضلات، على التوالي. في حين تبين أن التركيز المتوسط للأمبيسلين قدر بـ 0.59 ± 73.14 ، 1.42 ± 68.54 و 0.77 ± 63.09 ميكروغرام/كغ في الأنسجة الكبدية، الكلوية والعضلية، على التوالي. نتائج هذا التحليل الكروماتوغرافي أظهر أن تركيز الأوكسيتترا سيكلين، الكوليستين والأمبيسلين في الكبد كان أعلى بكثير من تركيزه في الكلى والعضلات. في الجزء الثاني، تم إخضاع العينات المؤكدة ايجابية لمعالجة حرارية بالغليان، القلي والتجمد. أظهرت نتائج هذا التحليل أن غلي وتجميد العينات الموجبة تسبب في انخفاض كبير في تركيزات مخلفات الأوكسيتترا سيكلين، الكوليستين والأمبيسلين. من ناحية أخرى، تظهر العينات الإيجابية المعرضة للقلي انخفاضاً كبيراً في متوسط التركيز مخلفات هذه المضادات الحيوية. وبالتالي، الغليان والقلي وطرق التجميد تؤدي إلى تدمير جزئي فقط لمخلفات المضادات الحيوية. لذلك، لا يمكن استخدام هذه الطرق كطرق موثوق بها لإزالة مخلفات المضادات الحيوية في لحم الدجاج، والطريقة الوحيدة لحماية أنفسنا بشكل أفضل هو تمديد فترة الانتظار.

كلمات المفتاح: الأوكسيتترا سيكلين ؛ الكوليستين ؛ الأمبيسلين ؛ *Bacillus Subtilis* ؛ *Bacillus* ؛ *Cereus* ؛ *Microecccus luteus* ؛ HPLC-UV.

Introduction générale

Introduction générale

1. Contexte général

Face à la demande croissante en protéines animales des populations urbaines en Afrique du nord, l'élevage intensif des volailles s'est développé ces dernières années dans plusieurs pays. C'est le cas par exemple de la filière avicole algérienne qui a connu un essor spectaculaire en production animale.

L'engouement des algériens pour les viandes blanches et particulièrement le poulet de chair est devenu important pour des raisons nutritionnelles et économiques. L'effort en viande blanche est passé de 95 000 à près de 350 000 tonnes entre 1980 et 2011 (*Alloui, 2011*).

Cependant, le faible niveau d'hygiène, l'insuffisance de planification de la zone d'élevage, le manque de gestion par l'État et de stratégies de développement entraînent de nouveaux problèmes, tels que la pollution de l'environnement, ainsi que des maladies épidémiques fréquentes et non contrôlées. Pour surmonter certains de ces problèmes, les agriculteurs considèrent les antibiotiques comme une solution pour lutter contre les maladies et améliorer la productivité animale (*Kaci, 2015*).

En effet, la productivité et la rentabilité de l'élevage avicole a contraint l'utilisation d'une alimentation industrielle de qualité qui puisse répondre à deux exigences principales, à savoir la couverture suffisante des animaux et un effet bénéfique sur la santé animale. Cette insuffisance alimentaire a également conduit à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance. Les antibiotiques comptent parmi les additifs les plus utilisés pour améliorer l'indice de consommation, la vitesse de croissance et augmentent ainsi la productivité et la rentabilité des élevages avicoles (*Dolliver et al., 2008*).

Les antibiotiques sont utilisés non seulement en traitement thérapeutique, mais aussi comme agents prophylactiques, promoteurs de croissance et d'efficacité d'absorption de la nourriture en production animale. Leur utilisation prévient plusieurs maladies chez l'animal, lui apporte un certain confort et améliore le rendement à la ferme (*Hakem et al., 2013*).

L'administration de faibles doses d'antibiotiques dans l'alimentation animale donnait des résultats surprenants. En effet, ces antibiotiques utilisés à des doses sub-thérapeutiques, modifient la flore intestinale, stimulent la croissance des animaux et réduisent le taux de mortalité et de morbidité (*Sanders et al., 2011*).

2. Problématique

Malgré la nécessité des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique et leur utilité économique, ces antibiotiques sont parfois utilisés de façon abusive, il convient donc de s'interroger sur les risques qu'encourent les consommateurs lorsque les antibiotiques sont utilisés chez des animaux producteurs de denrées alimentaires (*Delepine et al., 2002*).

En effet, l'usage intensif des antibiotiques en aviculture pourrait favoriser, en cas de non-respect du délai d'attente, l'apparition de résidus d'antibiotiques dans la chaîne alimentaire, l'émergence rapide et inquiétante de souches bactériennes résistantes et des réactions d'hypersensibilité chez le consommateur ainsi qu'une perturbation de la flore intestinale normale.

A titre d'exemple de certaines bactéries antibio-résistantes on peut citer certaines souches *Staphylococcus aureus* résistantes à plusieurs antibiotiques de la famille des β -lactamines. Les bactéries productrices de bêta-lactamase résistantes, entre autres, aux pénicillines et aux antibiotiques céphalosporines de 3^e et 4^e génération. Aussi, certaines souches *Escherichia coli* produisant des toxines entérohémorragiques ont développé de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques. Ce qui a coûté la vie de nombreuses personnes (*Johnson, 2009*).

L'utilisation de médicaments vétérinaires et en particulier d'antibiotiques dans la production animale a augmenté récemment en Algérie, ce qui fait que les antibiotiques sont les médicaments les plus souvent enregistrés (70% de tous les médicaments vétérinaires) utilisés chez les animaux (*Kaci & Cheriet, 2013*).

Les résultats d'une enquête sur 628 exploitations avicoles en Algérie de mars 2005 à août 2006 ont montré que l'utilisation irrationnelle d'antibiotiques était enregistrée dans 17,1% des exploitations. Les antibiotiques les plus utilisés étaient l'oxytétracycline (15,4%) et les pénicillines (10%). En outre, 40,1% des exploitations ne respectaient pas le délai d'attente (*Ramdane, 2015*).

Cette utilisation non méthodique, sans prescription ni surveillance vétérinaires, conduit à la persistance de résidus antibactériens dans les produits d'origine animale. Cette question a des conséquences néfastes sur la santé publique, des incidences néfastes sur l'environnement et contribue à un échec thérapeutique du fait de la présence d'agents pathogènes résistants aux antibiotiques dans la chaîne alimentaire. Ces alertes ont provoqué des avertissements auprès des autorités et ont alarmé les consommateurs (*Wang et al., 2006*).

Face à la menace croissante des bactéries résistantes aux traitements, le nombre de nouveaux antibiotiques en cours de mise au point est très insuffisant pour combattre la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. Du fait, l'OMS alerte dans un rapport publié en septembre 2017, qu'il y aurait « *un grave manque de nouveaux antibiotiques en développement* » et que « *la résistance aux antimicrobiens est une urgence sanitaire mondiale qui met sérieusement en péril les progrès de la médecine moderne* », souligne l'OMS et recommandant ainsi de « *multiplier les investissements dans la recherche et le développement pour les infections résistantes aux antibiotiques* ».

Des limites maximales de résidus (LMR) d'antimicrobiens dans les produits d'origine animale ont été fixées, ainsi qu'une stratégie de contrôle et de surveillance visant à protéger la sécurité des consommateurs basées généralement sur des méthodes sont divisées en méthodes de dépistage et de confirmation.

Les méthodes de dépistage sont généralement peu coûteuses, rapides et adaptées à l'analyse à haut débit, mais ne fournissent pas une identification univoque et ne se traduisent pas par des résultats quantitatifs précis. Les méthodes de confirmation sont plus coûteuses et prennent du temps, mais sont censés être très sélectif dans le but de fournir une identification sans équivoque. La combinaison d'un procédé de dépistage à base de matériel biologique et une méthode de confirmation instrumentale donnent des résultats très réussis dans l'analyse des résidus. Avec un dépistage rapide d'échantillons qui peut être effectués en se basant sur une activité microbiologique. Ensuite, les échantillons suspectés positives peuvent être analysés par une méthode de confirmation plus élaborée en se basant sur des propriétés chimiques du composé.

3. Objectifs

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, montrent la nécessité de faire un état des lieux sur les pratiques d'utilisation des antibiotiques particulièrement en aviculture afin d'obtenir à long terme une meilleure utilisation des antibiotiques et de protéger la santé des consommateurs.

C'est dans ce cadre que se situe notre étude dont l'objectif général est d'analyser l'utilisation des antibiotiques : Oxytétracycline, colistine et ampicilline, dans l'élevage avicole et les risques associés pour la santé du consommateur en Algérie et plus particulièrement dans la wilaya de Batna. Ainsi que d'évaluer l'effet du traitement thermique et de la congélation sur la persistance de ces résidus dans les denrées alimentaires.

4. Organisation de mémoire

Pour répondre à la problématique posée, nous avons organisé notre travail en deux parties :

- Une première partie consacrée à la revue bibliographique composée de quatre chapitres retraçant l'évolution et la place de l'aviculture en Algérie avec ses répercussions socio-économiques au vu de l'engouement des algériens pour les viandes blanches. On doit avoir un aperçu sur l'utilisation des antibiotiques comme facteur de croissance en élevage aviaire et son impact sur la santé du consommateur. Et finalement une étude des différentes méthodes employées afin de détecter et de quantifier les résidus d'antibiotiques.

- Une deuxième partie consacrée à l'étude expérimentale portée sur la détection et la quantification des résidus d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline dans les tissus comestibles chez le poulet de chair (foie, rein et muscle) par chromatographie liquide à haute performance avec détection aux rayons ultraviolet (HPLC-UV) et l'étude de l'effet du traitement thermique sur la persistance des résidus de ces antibiotiques.

Première partie :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Evolution de l'aviculture en Algérie

Face à la demande croissante en protéines animales des populations urbaines, l'aviculture algérienne a connu un développement remarquable qui a permis l'obtention d'une ration alimentaire mieux équilibrée du point de vue protéique. Ce secteur connaît un véritable essor en Algérie où un accent particulier a été mis sur l'aviculture moderne semi-industrielle. Cette dernière occupe aujourd'hui une place de choix à cause de son cycle de production court (environ 45 jours pour le poulet de chair), de la richesse en protéines du produit et de son coût relativement faible par rapport au pouvoir d'achat du consommateur moyen. L'évolution et les performances de la production avicole en Algérie ainsi que l'alimentation en aviculture ont été analysés dans le présent rapport.

I- Place et structuration de la filière avicole en Algérie

L'aviculture nationale est caractérisée par trois étapes distinctes :

● La première étape de 1960 jusqu'à 1970 :

Il convient de rappeler que l'élevage en Algérie en général et l'aviculture en particulier n'ont pas connu un développement notable pendant l'époque coloniale, le modèle dominant était l'aviculture fermière de type familial (*Beloum, 2000*). L'aviculture ne participait que faiblement à la production, en 1960 sa production s'élevait à 1700 tonnes de viande blanche. Cette faible production est due essentiellement à la colonisation qui n'a pas permis aux agriculteurs d'investir dans l'aviculture (*Rahmani, 2006*).

Au lendemain de l'indépendance, de 1962 jusqu'à 1970, l'élevage était essentiellement fermier sans organisation particulière, les produits d'origine animales et particulièrement avicoles occupaient une place très modeste dans la structure de la ration alimentaire en Algérie (*Ramdane, 2015*).

● La deuxième étape de 1970 jusqu'à 1990 :

A partir de 1970, la production de viande blanche a connu une croissance considérable pour atteindre 269 000 tonnes, avec une consommation de l'ordre de 11.5 Kg/habitant/an et l'aviculture n'a alors cessé de se développer (*Rahmani, 2006*).

L'enquête nationale de 1966-1967 a fait apparaître que la ration contenait 7.8 g/j de protéines animales et celle de 1979-1980 était estimée de 13.40 g/j en protéines animales dans la ration. Cette augmentation de l'apport protéique d'origine animale dans la ration est due essentiellement à l'intérêt accordé au développement de l'aviculture (*Ramdane, 2015*).

Cette époque a vu naître une grande entreprise publique : l'Office National des Aliments du Bétail (ONAB) chargée entre autres du développement de l'aviculture. Plusieurs complexes modernes ont été réalisés dans le cadre des différents plans de développement nationaux. Durant cette période la gestion des facteurs de production, relevait des structures publiques tandis que la production de produits finis (œufs de consommation et poulets) relevait du secteur privé. Cette étape est marquée par un effort exceptionnel consenti par l'ONAB pour la formation de techniciens et d'ingénieurs qui, à leur tour, ont assuré la vulgarisation des techniques d'élevage et l'encadrement en général de l'activité (*Alloui, 2011*).

● **La troisième étape de 1990 à nos jours :**

Cette période faisait suite à la suppression du monopole de l'état et a été marquée par de grandes réalisations au niveau du secteur privé et l'arrêt quasi-total des investissements dans la filière du secteur public (*Alloui, 2011*).

La période 1990-2000 fut caractérisée par la mise en œuvre de réformes économiques dans le sens du passage d'une économie planifiée à une économie du marché. Au plan des structures la filière avicole a connu, depuis 1997, une restructuration profonde dans le sens de l'émergence d'entreprises et de groupes intégrés (aliments de bétail, reproduction du matériel biologique, abattage) (*Ferrah, 2004*).

Pendant la période 1991-1999 la production nationale de viande blanche a connu des fluctuations d'une année à l'autre (*Ferrah, 2004*).

En 2000 la production avicole, était estimée de 169 182 tonnes de viandes blanches. Puis nous avons assisté à une augmentation considérable en 2003 où la production nationale en volaille était de 320 646 tonnes et en 2010 de 475 000 tonnes (*Mezouane, 2010*).

La production de viande de volaille a subi une chute et est estimée à 350 000 tonnes en 2011 (*Alloui, 2011*).

La filière avicole algérienne a atteint un stade de développement qui lui confère désormais une place de choix dans l'économie nationale en général (1.1% du PIB national) et dans l'économie agricole en particulier (12% du produit agricole brut) (*Kaci et Cheriet, 2013*).

Tableau I. Evolution de la production de viandes blanches en Algérie (*Alloui, 2011 ; Ministère de l'agriculture, 2018*).

Période :	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2014	2015	2016	2017
Production :	198	150	170	241	306	475	463	460	515	529

Unité : 10³ Tonnes

II- Performances de la filière avicole en Algérie

Le principal moteur de l'augmentation de la productivité du poulet standard a été la progression du potentiel génétique de croissance (choix des souches). La réduction concomitante de l'âge à l'abattage a été rendue possible grâce aux progrès de la nutrition (qui permettent de satisfaire les besoins des poulets à moindre cout), de la zootechnie et de la médecine vétérinaire (*Beaumont et al., 2004*).

Lorsqu'on compare les performances enregistrées dans la production de poulet de chair, dans les pays industrialisés avec celles de la norme des souches de poulet de chair utilisées, on constate qu'il n'y-a pas de différence notable (*Ramdane, 2015*).

III- Alimentation en aviculture en Algérie

En Algérie, les rations destinées à la volaille sont essentiellement composées de tourteau de soja et de maïs, matières premières totalement importées. Selon l'office national du bétail. En 2003, ces importations ont été de l'ordre de 516 072 tonnes de maïs et 175 015 tonnes de tourteau de soja (*Boudouma et Tefiel, 2012*).

Cette situation entraine un cout élevé des aliments pour la substitution partielle du tourteau de soja et du maïs. Dans cette optique, le son de blé est devenu un des composants classiques des rations destinées à la volaille (*CNIS, 2011*).

La flore digestive peut être modifiée par le type de céréales. En particulier la présence de polysaccharides non amylacés hydrosolubles, ou par leur mode de présentation. Ainsi, **Mathalouti et al. (2002)** observent une augmentation des populations bactériennes anaérobies facultatives, dont les lactobacilles et les coliformes, avec un régime à base de blé et d'orge au lieu de maïs (**Ramdane, 2015**).

La consommation d'un régime contenant du blé sous forme de graines entières par rapport à du blé broyé entraîne une modification de la flore. La granulation de l'aliment, entrainerait une augmentation des coliformes et des entérocoques dans l'iléon, ainsi qu'une baisse de *Clostridium perfringens* et des lactobacilles en fin du tube digestif (Caeca et rectum). De même, l'origine des matières grasses, de l'amidon ou des protéines peut modifier la flore. Les minéraux et les vitamines peuvent avoir un effet sur la flore (**Ramdane, 2015**).

Chapitre II

Généralité sur les antibiotiques

I. Définition et origine des antibiotiques

Les antibiotiques (du grec *anti* : contre et *bios* : vie) se définissent comme des substances chimiques élaborées par des micro-organismes ou représentants des produits de synthèse, qui à très faibles doses et d'une manière spécifique, ont le pouvoir d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (*Kapoor et al., 2017*).

En 1897, Ernest Duchesne met en évidence les propriétés de certaines moisissures (*Penicillium glaucum*). Mais ce n'est qu'en 1928 qu'Alexandre Fleming découvre officiellement la pénicilline, et ce n'est qu'en 1943, qu'elle sera produite industriellement. Depuis, le développement de nouveaux antibiotiques est devenu un pôle important de la recherche médicale (*Aminov, 2010*).

L'importance des antibiotiques est considérable en raison de leur efficacité pour combattre les infections bactériennes humaines ou animales associées en général à une faible toxicité. Les antimicrobiens constitue la première classe de médicaments utilisés, ils ont révolutionné le pronostic d'un certain nombre de maladies autrefois incurables (tuberculose, brucellose, etc.) et largement contribué à l'essor de l'élevage (*Martínez, 2008*).

II. Pharmacocinétique des principes actifs

Pour éradiquer une infection, l'antibiotique doit parvenir au site d'action. Pour ceci l'antibiotique fait l'objet de processus pharmacocinétiques qui se déroulent simultanément, à savoir l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion :

1. Absorption

L'absorption correspond à la phase de dissolution du médicament et à l'apparition du principe actif dans le sang. Cette phase représente les phénomènes régissant le passage du principe actif de son site d'administration à la circulation générale. Ce processus concerne toutes les voies d'administration extravasculaires et se fait par différents mécanismes dont la diffusion passive, le transport actif et la diffusion facilitée. Le processus d'absorption est régi par la solubilité de la forme posologique, de la voie d'administration et de certaines propriétés physico-chimiques de la substance médicamenteuse (*Rowland & Tozer, 2011*).

2. Distribution

La distribution consiste en la répartition de l'antibiotique depuis son entrée dans la circulation générale jusqu'à son arrivée au site d'infection. On observe deux fractions du principe actif dans le sang : *une fraction libre* qui permet au principe actif de diffuser librement et de rejoindre l'organe cible où il exercera son action et *une fraction liée aux protéines plasmatiques*, principalement l'albumine, dont la distribution et la biodisponibilité biphasique sont ainsi limitées et peuvent influencer l'élimination du médicament. Ceci dit, la liaison aux protéines est une interaction réversible. Les principes actifs dont la fixation tissulaire est la plus importante laisseront en général le plus de résidus. Par ailleurs, un antibiotique très diffusible fait apparaître des taux sériques facilement éliminés par le rein (*Morin & al., 2005*).

3. Métabolisme et biotransformations

Les médicaments subissent des changements métaboliques dans le corps qui visent principalement la formation de métabolites qui ont des propriétés physico-chimiques favorables à leur excrétion. Les produits de biotransformation sont généralement moins solubles dans les lipides et sont de nature polaire (*Jumaa et Karaman, 2015*).

La plupart de ces réactions métaboliques sont enzymatiques et se produisent principalement dans le foie, organe très vascularisé et riche en enzymes. Ceci dit, outre le foie, le métabolisme des médicaments a lieu dans le plasma sanguin et la lumière de l'intestin, où des réactions hydrolytiques et réductrices peuvent se produire, ainsi que dans d'autres tissus (*Martin, 2008*).

Le schéma général du métabolisme des médicaments est habituellement biphasique. Les réactions de biotransformation "phase I" communes comprennent l'oxydation, la réduction ou l'hydroxylation (*Martin, 2008*). Bien que ces réactions métaboliques produisent généralement des produits avec une activité réduite, certains peuvent donner lieu à des produits ayant une activité similaire ou même plus grande (*Bhattacharjee, 2016*).

Les réactions de « phase II » impliquent des réactions de synthèse comme les réactions de conjugaisons ou de combinaisons avec des substances endogènes comme l'acide glucuronique, la glycine, la cystéine, la méthionine, l'acétyle et le sulfate. Les conjugués résultants sont hydrosolubles, souvent polaires et facilitent l'élimination du médicament du corps (*Bhattacharjee, 2016*).

Les biotransformations représentent un phénomène majeur dans le processus de formation des résidus : elles conditionnent en grande partie la persistance des substances médicamenteuses dans l'organisme des animaux traités (et dans les denrées issues de ces animaux), la nature des résidus et leurs propriétés pharmacologiques et toxicologiques. Ainsi, seule une fraction des résidus présents dans les tissus des animaux, est identique à la molécule originelle, l'autre fraction correspondant à divers métabolites de cette molécule (*Rotschafer, 2016*).

4. Elimination

L'élimination est la dernière phase du devenir du médicament. Elle correspond à l'excrétion du principe actif ou de ses métabolites à l'extérieur de l'organisme. Le taux d'élimination d'un médicament est habituellement un déterminant important de la durée de l'effet pharmacologique. Bien que le rein soit de loin l'organe d'excrétion le plus important, le foie, la glande salivaire, la sueur, les glandes mammaires et les poumons constituent des voies d'excrétion non rénales. L'excrétion rénale est le principal processus d'élimination pour les médicaments qui sont principalement ionisés au pH physiologique et pour les composés à faible solubilité dans les lipides (*Dougherty & Pucci, 2012*).

III. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les mécanismes essentiels à la vie de la bactérie : réplication, transcription, synthèse protéique, métabolisme intracellulaire et maintien de l'intégrité membranaire (*voir figure 01*) (*Dockrell et al., 2004*).

1. Antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure rigide entourant et protégeant le cytoplasme de la bactérie. Certains antibiotiques agissent spécifiquement sur la paroi bactérienne et n'ont donc aucun effet sur les cellules eucaryotes ou les bactéries naturellement dépourvues de paroi (*Jehl, 2003*).

Ces antibiotiques agissent en bloquant la synthèse de la paroi par perturbation de la synthèse du peptidoglycane, empêchant ainsi la formation de nouvelles bactéries et pouvant entraîner la destruction de celles déjà existantes. On distingue : les β -lactamines, la fosfomycine, la cyclosérine, les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) et la bacitracine (*Dockrell et al., 2004*).

2. Antibiotiques actifs sur les membranes

Il peut s'agir de la membrane externe des bactéries à Gram(-) ou de la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram(+). Ce sont des antibiotiques de nature polypeptidique ayant des propriétés de surfactant qui leur permettent de s'insérer parmi les phospholipides de la membrane. Cela perturbe la perméabilité membranaire (augmentation anormale) et permet la diffusion de substances hydrosolubles hors de la bactérie, entraînant ainsi sa destruction (*Shlaes, 2010*).

Les polymyxines agissent suivant ce mode d'action. Ces antibiotiques peptidiques et cationiques ont une action spécifique sur les membranes bactériennes, en raison du fait que les cellules eucaryotes n'ont pratiquement pas de charges négatives exposées à la surface externe de la membrane, leurs phospholipides chargés négativement sont exposés à la surface interne de la membrane (*Zasloff, 2002*).

3. Antibiotiques actifs sur la synthèse protéique

L'antibiotique interfère avec la synthèse protéique bactérienne en agissant sur les ribosomes. Les ribosomes procaryotes ne sont pas constitués des mêmes protéines que les ribosomes eucaryotes, et ont d'ailleurs des coefficients de sédimentation différents. Offrant ainsi la possibilité d'avoir des substances dont l'action est très spécifique aux ribosomes des cellules procaryotes (*Nauciel & Vildé, 2005*).

Les tétracyclines et les macrolides agissent suivant ce mode d'action : les macrolides et d'autres antibiotiques (lincosamides, streptogramines, les phénicolés et l'acide fusidique) agissent au niveau de la sous-unité 50S, les tétracyclines et les aminosides agissent sur la sous-unité 30S (*Kentarchos, 2006*).

4. Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques

On distingue les antibiotiques actifs d'une part sur la synthèse de l'ADN ou de ses précurseurs et d'autre part sur la synthèse de l'ARN : Les inhibiteurs de l'ADN-gyrase regroupent les **quinolones**, tandis que les inhibiteurs de l'ARN polymérase sont représentés par la classe des **ansamycines**. Ces deux familles d'antibiotiques doivent leur spécificité d'action aux différences qui existent entre les enzymes procaryotes et eucaryotes (*Cambau & Guillard, 2012 ; Edoh & al., 2001*).

5. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique

L'acide folique intervient dans de nombreuses voies métaboliques et notamment dans la synthèse des purines et des pyrimidines incorporées dans les acides nucléiques. La synthèse de l'acide folique peut être inhibée par les sulfamides, le triméthoprime et l'acide para-amino-salicylique. Ces antibiotiques agissent en tant qu'anti-métabolites bactériens en inhibant une des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries (*Bergogne-Bérézin, 2006*).

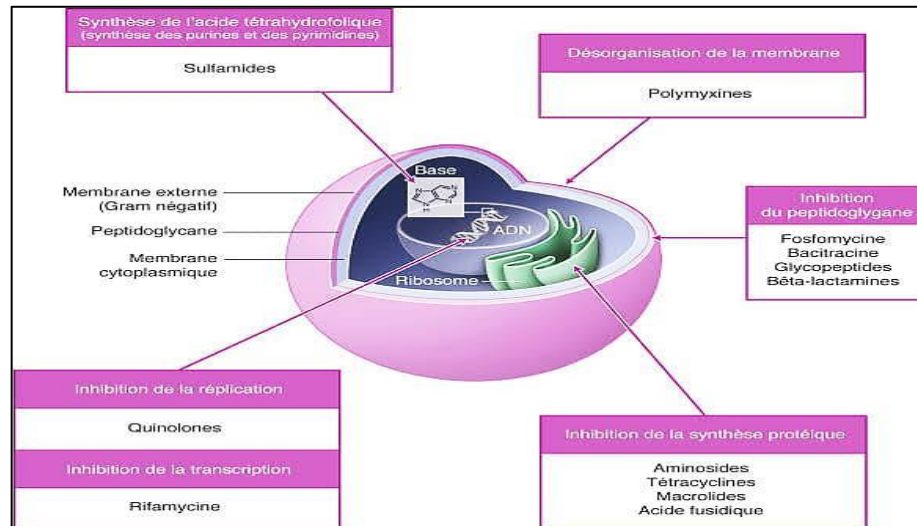


Fig. 01. Modalités d'action des antibiotiques (*Kapoor et al., 2017*)

IV- Consommation des antibiotiques dans le monde

Aux États-Unis, plus de 16 millions de kg de composés antimicrobiens sont utilisés chaque année, dont environ 70% sont utilisés à des fins non thérapeutiques ; 15,8% d'entre eux sont des tétracyclines (TCs), 2,3% des sulfonamides, 1,2% des aminoglycosides, 0,19% des fluoroquinolones. Le nombre d'antibiotiques utilisé dans l'alimentation des animaux aux États-Unis a augmenté de près de 91 000 kg en 1950 à 9,3 millions de kg en 1999, avec une consommation des TCs qui dépasse les 5,6 millions de livres par an (*Toprak et al., 2011*).

En Europe, la consommation des agents antimicrobiens en médecine vétérinaire, comme agents thérapeutiques serait de 3 494 tonnes, dont 2 294 tonnes sont des tétracyclines, 424 tonnes des macrolides, 322 tonnes des pénicillines, 154 tonnes d'aminoglycosides, 43 tonnes de fluoroquinolones et 75 tonnes d'association de sulfamides avec le triméthoprime (*Roach et al., 2015*).

Au Royaume-Uni, on trouve que les tétracyclines sont les plus largement utilisées comme composés antibactériens, suivies par les sulfamides, les bêta-lactames, les macrolides, les aminoglycosides et les fluoroquinolones (*Bonjar, 2014*).

En Afrique la consommation d'antibiotiques durant les cinq dernières années était de $14\,595 \pm 1\,457$ kg par an, distribué dans les différentes classes comme suit : $7\,975$ kg (54,65%) des tétracyclines, $3\,103,96$ kg (21,27%), des sulfamides et de $954,5$ kg (6,56%) des aminoglycosides, 905 kg (6,20%) de bêta-lactames, 94 kg (0,64%) des quinolones et 35 kg (0,24%) des macrolides (*Hasani et al., 2014*).

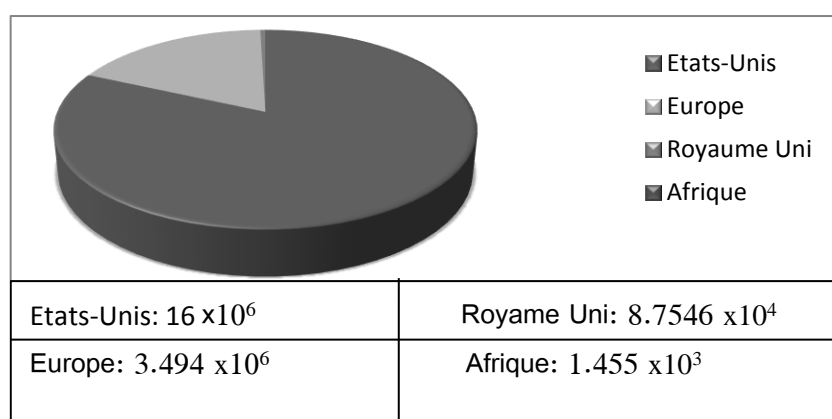


Fig 02. Niveau de consommation mondiale des antibiotiques (*Hasani et al., 2014*).

V- La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques. Les antibiotiques exercent une pression sélective dans l'environnement. Les bactéries présentant une mutation leur permettant de survivre, continuent à se reproduire, en transmettant à leur descendance leurs gènes de résistance, produisant rapidement une génération des bactéries majoritairement résistantes (*Davies, 2010*).

Parmi les facteurs qui contribuent au phénomène de la résistance, on trouve les diagnostics erronés, les prescriptions abusives et l'utilisation inappropriée d'antibiotiques par les éleveurs en complément alimentaire pour une croissance accélérée des animaux d'élevages (*Silbergeld et al., 2008*).

La résistance aux antibiotiques peut intervenir par le biais d'un ensemble de mécanismes (*Figure 03*) :

- **La mutation de la cible de l'antibiotique** : Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise dans la cellule (paroi, ribosome), la présence d'une modification consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de l'antibiotique. C'est un des mécanismes de résistance à la streptomycine, l'un des premiers antibiotiques utilisés pour traiter la tuberculose.
- **La modification de l'antibiotique** : De nombreuses souches résistantes fabriquent une enzyme qui modifie ou qui clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive. C'est le mécanisme principal de résistance aux bêta-lactamines (famille des pénicillines et des céphalosporines) qui implique les enzymes de la famille des bêta-lactamases.
- **La réduction de la perméabilité membranaire** : La bactérie ferme les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Ces pores sont normalement constitués par des protéines qui forment des canaux et que l'on appelle des porines. Les bactéries résistantes réduisent leur nombre de porines.
- **L'efflux des antibiotiques** : Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par transport actif hors de la cellule, qui recrache littéralement les composés toxiques en dehors. C'est l'un des principaux mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales (Alemayehu et Serawit, 2015).

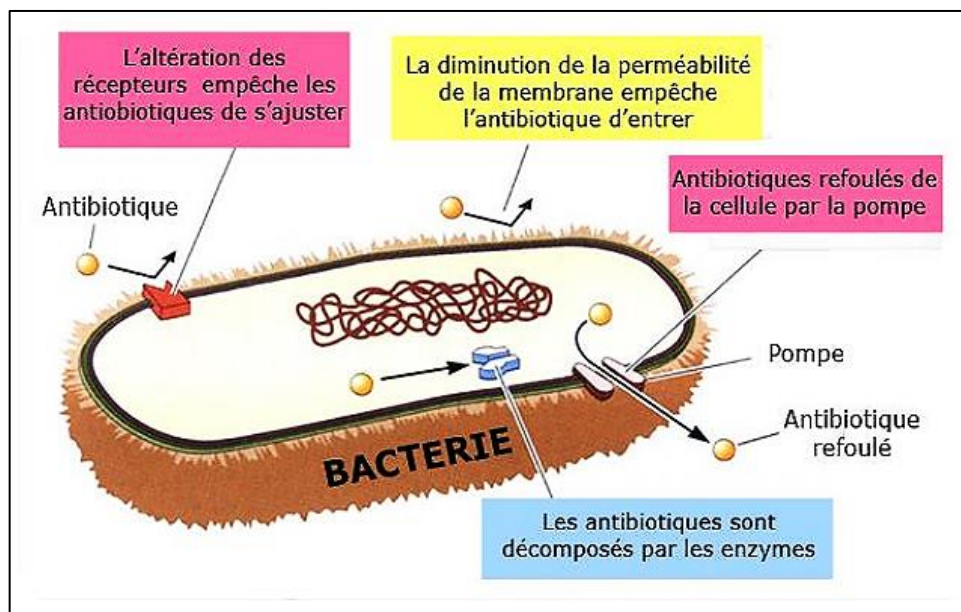


Fig. 03. Les différents mécanismes d'antibiorésistances (Alemayehu et Serawit, 2015).

Chapitre III

Résidus d'antibiotiques

L'emploi des antibiotiques chez les animaux de rente occupe une place importante dans la production. Ces médicaments qui sont utilisés en vue de garantir l'état sanitaire des animaux ou d'améliorer leurs productions se retrouvent de façon courante dans les denrées destinées aux consommateurs lorsque le délai d'attente n'est pas respecté. On parle alors de problème de résidu des médicaments vétérinaires. A travers ce chapitre, il nous sera donné de passer en revue les généralités sur les résidus des médicaments antibactériens avant de voir les problèmes qu'ils occasionnent en santé publique.

I- Généralités sur les résidus d'antibiotiques

1. Notion de « résidu médicamenteux »

Les résidus des médicaments vétérinaires sont définis comme toutes les substances pharmacologiquement actives, qu'il s'agisse de principes actifs, d'excipients ou de produits de dégradation, ainsi que leurs métabolites restant dans des denrées alimentaires obtenues à partir d'animaux auxquels le médicament vétérinaire en question a été administré. Les résidus d'antibiotiques présents dans les denrées alimentaires d'origine animale sont les traces indésirables de traitements médicamenteux antibiotiques susceptibles de nuire à la santé humaine. Il peut s'agir de composés souches, de métabolites ainsi que des impuretés associées au médicament (*Chataigner, 2004*).

2. Origine des résidus d'antibiotiques

La présence de résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale est liée à un traitement médicamenteux antibiotique reçu par l'animal de son vivant. Les antibiotiques peuvent être utilisés chez les animaux de production comme traitement curatif, préventif, métaphylactique ou encore en tant qu'additifs alimentaires (*Hsieh & al., 2011*).

2-1. Utilisation à titre thérapeutique curatif

Il s'agit de traiter des animaux déjà infectés. L'objectif majeur est d'obtenir la guérison des animaux cliniquement malades et d'éviter la mortalité. Le traitement a aussi pour effet de restaurer la production (lait, œuf). En plus de la guérison des animaux infectés, le traitement curatif peut même éviter la contamination humaine (*Sérieys, 2004*).

2-2. Utilisation en métaphylaxie

La métaphylaxie est une mesure mise en place lorsqu'une infection collective très contagieuse s'est déclarée dans un élevage et qu'une proportion importante d'animaux est malade avec suffisamment d'éléments concordants pour incriminer des bactéries, l'ensemble du groupe d'animaux est traité. Les sujets qui sont exposés mais ne présentent pas encore de signes cliniques font donc l'objet d'un traitement en même temps que ceux qui sont déjà malades, car on s'attend à ce qu'ils développent eux aussi les symptômes à cause du contact étroit avec les animaux malades (*Millemann, 2002*).

2-3. Utilisation en antibioprévention

Ce type d'antibiothérapie part du principe de prescrire un traitement antibiotique avant qu'une infection ne se déclare chez des sujets se trouvant dans des situations les exposant à un important risque d'infection. Il s'agit notamment de périodes associées à un stress comme les vaccinations, le transport et le mélange d'animaux ou encore en cas d'intervention chirurgicale pour prévenir les infections bactériennes. La principale différence entre la métaphylaxie et la prophylaxie est que lors d'une prophylaxie il n'y a pas encore de germe impliqué mais seulement un facteur de risque (*Maillard, 2002*).

2-4. Utilisation en tant qu'additifs alimentaires

Les antibiotiques régulateurs de flore (ARF) ou les antibiotiques facteurs de croissance (AFCs) sont des antibiotiques qui, administrés à faibles doses dans l'alimentation animale ne sont ni bactéricides ni bactériostatiques, mais ont un effet régulateur au niveau de la flore intestinale entraînant une meilleure assimilation des aliments et donc une augmentation de la vitesse de croissance ainsi qu'une obtention d'un gain de poids maximal en un minimum de temps (*Sanders, 2005*).

3. Mode d'action des antibiotiques facteurs de croissance

3-1. Diminution de la prévalence des infections

L'utilisation des AFCs permettrait l'inhibition des infections et par là même réduirait les coûts métaboliques du système immunitaire. En effet, la multiplication de certaines bactéries pathogènes dans l'intestin des animaux est inhibée par les antibiotiques promoteurs de croissance. Ces bactéries ne provoqueraient pas forcément de maladie apparente, mais simplement un ralentissement de la croissance (*Fabre & al, 2000*).

3-2. Réduction de la production de métabolites toxiques

L'utilisation des AFCs permet de réduire la production microbienne de métabolites toxiques et donc les coûts énergétiques engendrés par la détoxification de l'organisme. En effet, les uréases bactériennes libèrent dans l'intestin de l'ammoniaque toxique pour les cellules de la muqueuse et pour l'organisme. Le foie détoxifie l'ammoniaque en synthétisant de l'urée. Ceci dit ce cycle est coûteux en énergie. Les antibiotiques qui à faible dose inhibent fortement les uréases bactériennes réduiraient ces coûts énergétiques et amélioreraient la croissance des animaux (*Corpet, 2000*).

3-3. Augmentation de la disponibilité de nutriments pour l'hôte

Les AFCs réduiraient l'utilisation microbienne des nutriments entraînant une proportion plus importante disponible pour l'animal. Cet effet d'épargne est particulièrement net pour les acides aminés et se traduit par une amélioration de la rétention azotée. De plus, les antibiotiques à faibles dose peuvent aussi inhiber dans l'intestin la fermentation des glucides, notamment la production d'acide lactique à partir du glucose, laissant donc plus de glucose disponible pour l'animal (*Lee et al., 2001*).

3-4. Amélioration de l'absorption intestinale :

Les AFCs entraîneraient une diminution de l'épaisseur de la paroi intestinale et amélioreraient donc l'absorption et l'utilisation des nutriments pour l'animal. Ceci serait dû à l'augmentation de la surface d'absorption intestinale, à la diminution de l'épaisseur de la muqueuse et à la diminution de la vitesse du transit digestif (*Levy et Marshall, 2004*).

Les changements d'épaisseur résulteraient de la diminution de la prolifération de la muqueuse. Le ralentissement du transit digestif serait lié à la diminution de la concentration en acide lactique dans le contenu intestinal (*Dupraz, 2004*).

3-5. Inhibition de la réponse inflammatoire :

Les AFCs seraient capables de s'accumuler dans les cellules inflammatoires entraînant une inhibition de la réponse inflammatoire. Cette inhibition entraînerait une diminution du nombre de cellules inflammatoires dans la muqueuse. Ce changement serait alors la cause de la réduction de l'épaisseur de la paroi intestinale et du ralentissement du catabolisme musculaire, permettant alors une meilleure utilisation de l'énergie fournie par les aliments (*Gourmelen & al., 2001*).

II. Risques sanitaires causés par les résidus d'antibiotiques

1. Risque de toxicité directe

Cette toxicité ne s'exprime qu'après consommation répétée de denrées alimentaires contenant des résidus du même antibiotique. La toxicité directe des antibiotiques est dans l'ensemble extrêmement limitée. Le cas de toxicité potentielle fréquemment cité est celui du Chloramphénicol qui serait impliqué comme agent causal dans plusieurs cas d'anémie aplasique chez l'homme, cet antibiotique a donné des preuves suffisantes de ses propriétés aplasiantes (*Gysi, 2006*).

Aussi, les nitrofuranes sont soupçonnés de fœtotoxicité, ainsi que certains sulfamides qui seraient tératogènes et fœtotoxiques à forte dose en cas d'exposition au début de la grossesse et se traduisent par un ralentissement fœtal ou néonatal à type d'atteinte de la croissance, ou de la maturation histologique ou de la fonction des organes en place. Ces molécules passent dans le lait maternel et sont toxiques pour les nourrissons de moins d'un mois, ils auraient des effets néfastes sur le matériel génétique et notamment l'ADN, sur la reproduction, la fertilité. Les antibiotiques seraient également responsables de neurotoxicité tel que les pénicillines dont l'effet toxique est attribué au noyau bêtalactame et à ses propriétés inhibitrices sur la transmission du système GABA (*Chataigner & Stevens, 2005*).

2. Risque allergique

Les résidus d'antibiotiques provenant des denrées alimentaires sont parfois incriminés en allergologie humaine. En effet, ils réunissent plusieurs conditions pouvant donner lieu à des manifestations de type allergique : faibles concentrations, administration par voie orale et exposition occasionnelle est discontinuée (*Khattab et al., 2010*).

Les familles d'antibiotiques qui sont souvent mises en cause sont : les β -lactamines, les tétracyclines, les quinolones, les macrolides et les sulfamides. Les principes actifs des médicaments tout comme des molécules de faible poids moléculaire (haptène) peuvent se lier de façon irréversible à des grosses molécules, très souvent protéique, appelées molécules porteuses, il se forme alors un complexe qui peut être immunogène et allergène (*Demoly et al., 2000*).

Pour qu'une allergie se déclare, il faut que l'organisme ait été en contact au moins deux fois avec l'allergène : Un premier contact sensibilisant, généralement asymptomatique, permettant à l'organisme de reconnaître l'allergène et un deuxième contact déclenchant qui va provoquer la crise allergique et ce pour des doses d'allergène même très inférieures à celles ayant provoqué la sensibilisation. Compte tenu des très faibles taux de résidus, comparés à la concentration d'antibiotique lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable que les résidus soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu, mais plutôt d'un effet déclenchant (*Spertini et al., 2012*).

Les manifestations les plus fréquentes sont : des éruptions cutanéomuqueuses diverses, des éruptions urticarienne avec fièvre, des réactions de bronchospasme, des troubles digestives et rarement des réactions plus graves tel que l'œdème de Quincke et le choc anaphylactique (*Merad, 2001*).

3. Risque cancérigène

Les résidus d'antibiotiques peuvent avoir un effet carcinogène sur le long terme, suite à une consommation régulière d'aliments contenant ces résidus. Ceci semble être associé aux résidus issus de deux familles d'antibiotiques : les nitrofuranes et les nitroimidazoles. Ces molécules sont bien connues comme carcinogènes génotoxiques (*Sanders, 2005*).

L'expérimentation animale a montré que leur utilisation prolongée pouvait être à l'origine de modification du matériel génétique et de l'apparition de tumeurs. Le pouvoir mutagène et le pouvoir carcinogène potentiels de ces composés proviennent de la nitro-réduction du médicament, conduisant à la formation de métabolites électrophiles et à leur fixation à l'ADN (*Leitner et al., 2001*).

La majeure partie des résidus de nitrofuranes dans les denrées alimentaires sont liés aux protéines, leur pouvoir cancérigène est alors annihilé. La fixation des composés génotoxiques aux protéines est un effet biologique favorable qui opère comme un mécanisme de défense en abolissant le potentiel génotoxique des composés électrophiles et ainsi de prévenir l'attaque électrophile de l'ADN. Pour éviter ces risques, les nitrofuranes et la furazolidone sont aujourd'hui interdits chez les animaux de production dans de nombreux pays (*Bernard, 2003*).

4. Risque de perturbation de la flore digestive du consommateur

Certains résidus d'antibiotiques ayant encore une activité contre les bactéries, sont potentiellement capables de modifier la microflore intestinale de l'homme. La présence de résidus de ces antibiotiques dans les denrées alimentaires peut entraîner un risque d'affaiblissement des barrières microbiologiques et de colonisation de l'intestin par des bactéries pathogènes ou opportunistes (*Fabre & al., 2000*).

L'activité des résidus d'antibiotiques peut provoquer la mort de certaines bactéries ou diminuer leur aptitude à proliférer dans l'intestin : vitesse de croissance diminuée, affinité pour un substrat nutritionnel diminuée ou adhésion diminuée. L'atteinte de certaines populations bactériennes qui font partie de la flore normale entraîne le développement d'autres populations bactériennes pouvant être pathogènes ou opportunistes. Ce phénomène est appelé « abaissement des barrières microbiologiques » ou « diminution de la résistance à la colonisation ». L'effet de barrière est ainsi défini comme l'action antagonistes exercée par la microflore envers certaines bactéries, notamment celles qui viennent de l'extérieur (*Perrin-Guyomard et al., 2005*).

5. Risques d'antibiorésistance

L'apparition de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries peut être liée à des mauvaises pratiques thérapeutiques (posologie inadaptée, fréquence d'administration, non-respect de la prescription) ou à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance, favorisant ainsi le développement rapide du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (*Chataigner & Stevens, 2005*).

L'acquisition de cette résistance bactérienne peut être due à plusieurs mécanismes :

- L'apparition d'une mutation génétique et la sélection naturelle des bactéries résistantes si celle-ci sont placées de façon répétée dans un milieu contenant des antibiotiques.
- Le transfert de plasmides entre des bactéries résistantes et sensibles. Ce transfert de plasmides peut se faire entre des bactéries d'espèces différentes, ce qui autorise alors des échanges entre les bactéries d'origine alimentaire et les bactéries du tube digestif de l'homme (*Van Den Bogaard, 2001*).

III. Réglementation sur les résidus médicamenteux

1. Limite maximale de résidu (LMR)

Les limites maximales de sécurité représentent la quantité maximale de résidu d'un médicament autorisée dans un aliment au moment de sa consommation par l'homme. La consommation d'un aliment d'origine animale qui contient une concentration de résidu médicamenteux égale ou inférieure à la LMR ne présente pas de risque pour l'homme. Si la quantité de résidu de médicament dans l'aliment est supérieure à la LMR, cet aliment est considéré falsifié et impropre à la consommation humaine (*Laurentie & Sanders, 2002*).

2. La dose journalière acceptable (DJA)

La dose journalière acceptable représente la quantité totale de substance que l'homme peut ingérer chaque jour pendant toute sa vie sans qu'il en résulte d'inconvénients pour sa santé. En tenant compte d'une répartition théorique des consommations quotidiennes des différentes denrées d'origine animale et sur la base des informations pharmacocinétiques disponibles sur le devenir des substances dans les espèces animales, les experts de l'OMS ont définie des doses journalières acceptables pour différents principes actifs (*Gysi, 2006*).

3. Délai d'attente

Le temps d'attente est défini comme le délai entre la dernière administration de l'antibiotique à l'animal et le moment où celui-ci ne présente plus de résidus dans ses tissus ou dans ses productions. Le respect de ce temps d'attente permet de commercialiser les denrées qui présentent des concentrations inférieures ou proches de la limite maximale des résidus garantissant la protection de la santé du consommateur. Selon la directive 81/851/CEE le délai d'attente est défini comme : « la durée pendant laquelle l'animal traité ne doit pas être abattu ou les denrées alimentaires produites par l'animal traité (lait, œufs, miel) ne peuvent être commercialisées en vue de la consommation humaine » (*Gysi, 2006*).

Chapitre VI

Méthodes de détection des résidus d'antibiotiques

Les méthodes mises en œuvre pour rechercher les résidus sont divisées en deux groupes : méthodes de dépistage et méthodes de confirmation.

I. Méthodes de dépistage

Les méthodes de dépistage sont des méthodes qualitatives qui ont pour but de discerner les échantillons positifs des échantillons négatifs. Les échantillons conformes sont acceptés tandis que ceux suspectés d'être non-conformes doivent être confirmés à l'aide de méthodes de confirmation. Parmi les méthodes de dépistage on distingue des méthodes microbiologiques, biochimiques et immunologiques (*Reig & Toldra, 2008*).

1. Méthodes microbiologiques

Les dosages microbiologiques des antibiotiques sont basés sur l'inhibition de la croissance bactérienne. Ils utilisent la sensibilité de certaines souches bactériennes vis-à-vis d'un ou de plusieurs antibactériens (*Myllyniemi & al., 2002*).

1-1. Méthode de référence : méthode des 4 boîtes

Cette méthode est réalisée au moyen de boîtes de Pétri contenant une gélose ensemencée avec l'une de ces deux souches : *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*. Les zones d'inhibition dépourvues de colonies bactériennes autour des points de dépôts des échantillons sont révélatrices de la présence d'antibiotiques (voir *figure 04*) (*Kirbiš, 2007*).

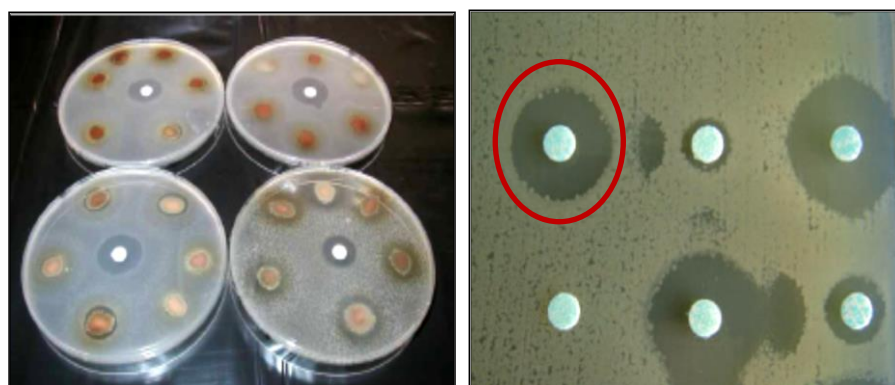


Fig. 04. Zone d'inhibition (*Kirbiš, 2007*)

1-2. Méthode alternative : PremiTest

Le PremiTest est un test à large spectre, il détecte un grand nombre d'antibiotiques couramment utilisés pour la viande. Le jus de viande est déposé dans des tubes à essais contenant la gélose ensemencée par des spores de *Bacillus stearothermophilus*, avec un indicateur de pH. Après incubation, la croissance normale des micro-organismes provoque l'acidification du milieu ce qui change la couleur de l'indicateur de pH du violet vers le jaune. Ainsi, en présence de substances inhibitrices, la couleur du milieu reste violette après incubation et l'échantillon est rapporté comme échantillon positif. Par contre, si la couleur du milieu vire au jaune l'échantillon est considéré comme étant négatif (**Scippo & Maghuin-Registrier, 2006**).

2. Méthodes biochimiques

2-1. Méthode enzymatique : PenzymTest

Le Penzym est un test qualitatif, facile d'emploi, très rapide et spécifique des antibiotiques de la famille des **β -lactames** et se base sur une réaction enzymatique et colorimétrique. L'enzyme (DD-carboxypeptidase) ajoutée dans l'extrait de viande réagit lors de l'incubation avec les antibiotiques pour former un complexe stable. L'excès d'enzyme libre toujours présent dans l'extrait de viande hydrolyse un substrat de type R-D-Ala-D-Ala. La D-Ala ainsi formée est oxydée en acide pyruvique par une D-amino acide oxydase avec formation simultanée d'eau oxygénée (**Brouillet, 1994**).

Cette dernière est utilisée pour oxyder, sous l'action d'une peroxydase, un indicateur organique redox non coloré (l'o-dianisidine) qui évoluera en un composé de couleur rose-orange. La lecture des résultats se fait de manière très rapide. Si la couleur finale est :

- ✓ **Rose orange** : l'échantillon est négatif : la concentration en antibiotique est inférieure à 0,005 (UI) PenG/ml échantillon.
- ✓ **Orange** : l'échantillon est douteux : la concentration en antibiotique est égale à 0,008 UI PenG/ml échantillon.
- ✓ **Jaune** : l'échantillon est positif : la concentration en antibiotique est supérieure à 0,017 UI PenG/ échantillon (**Doufour, 2006**).

2-2. Méthode sur tiges : le test β -STAR

Ce test est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or. Ce test est très spécifique des **β -lactamines**. Au cours de la première incubation, les antibiotiques présents dans l'échantillon se lient au récepteur. Pendant la deuxième incubation, l'échantillon migre sur un support immuno-chromatographique qui présente deux bandes de capture : La première bande retient tous les récepteurs non liés aux antibiotiques faisant apparaître une **coloration rouge intense** qui traduit une **absence de résidus**. La seconde bande contrôle le bon déroulement du test. Plus il y aura d'antibiotiques, moins il y aura de récepteurs libres susceptibles de migrer sur le support et donc la première bande sera moins visible. Le résultat est exprimé en comparant l'intensité des deux bandes (*Schneider & al., 2009*).

3. Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques sont basées sur l'interaction antigène-anticorps, qui est très spécifique pour un résidu particulier.

3-1. La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

La technique ELISA est une technique qui repose sur l'utilisation d'une enzyme pour détecter les complexes immuns. Elle est considérée comme une technique fiable, rapide et peu coûteuse, mais elle surestime la concentration en antibiotiques par rapport aux techniques actuelles de LC-MS. Les anticorps peuvent interagir par réactions croisées avec plusieurs produits structurellement semblables aux tétracyclines, entre autres les épimères de tétracyclines et les sous-produits de dégradation. Ces réactions croisées engendrent une augmentation de la concentration en antibiotiques par rapport au LC-MS (*Koivunen & al., 2006*). Le test comporte quatre étapes principales :

- 1) **Fixation des récepteurs bactériens** : Les récepteurs bactériens connus, sensibles à l'antibiotique recherché, sont incubés sur une plaque de microtitration. Ces récepteurs bactériens vont se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les récepteurs non fixés.
- 2) **Fixation de l'antibiotique à doser** : On incube notre échantillon à doser, ainsi que nos standards. Les antibiotiques spécifiques vont se fixer aux récepteurs bactériens. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les antibiotiques non fixés.

- 3) **Fixation de l'anticorps de détection** : On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une enzyme, ce qui permet de déceler les antibiotiques fixés aux récepteurs bactériens. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- 4) **Révélation** : On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'antibiotique recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'antibiotique recherché (*Thorpe & Swanson, 2005*).

3-2. RIA (Radio Immuno Assay) et RRA (Radio Receptor Assay)

Les tests RIA et RRA sont basés sur la compétition qui existe entre l'antibiotique marqué par un isotope et ce même antibiotique non marqué pour un récepteur bactérien. C'est à dire des bactéries porteuses de sites de liaisons spécifiques vis-à-vis de ces antibiotiques. Ces tests permettent de détecter les β -lactames, les tétracyclines, les macrolides, les aminoglycosides et le chloramphénicol dans les échantillons de lait, de viandes, dans les œufs et dans les fluides biologiques (*Stead & al., 2004*).

II. Méthodes de confirmation

Les méthodes de dépistage doivent être complétées par des méthodes de confirmation qui sont appliquées sur les échantillons détectés positifs, afin de pouvoir identifier sans ambiguïté la molécule du résidu et de pouvoir la quantifier. Ils sont donc à la fois **qualitatifs** et **quantitatifs** et permettent de détecter les résidus même en concentration très faible, jusqu'à deux fois moins que les LMR (*Reig & Toldra, 2008*).

1. Méthodes chromatographiques

1-1. Techniques d'extraction

Un aspect de l'analyse des résidus qui a reçu relativement peu d'attention est l'extraction initiale de l'analyte à partir de la matrice d'échantillons. Certaines applications d'homogénéisation à grande vitesse pour l'extraction par solvant des résidus de médicamenteux sont utilisées (*McCracken & al., 2000*).

La teneur totale en résidus de médicament d'un tissu comprend tous les résidus libres en plus tous les résidus liés de manière covalente à des macromolécules endogènes. Un résidu est désigné comme lié s'il n'est pas libéré des fractions macromoléculaires après des procédures d'extraction douces mais exhaustives. L'extraction des résidus liés nécessite une hydrolyse par des moyens chimiques ou enzymatiques. Les techniques d'extraction sont généralement suivies par des procédures de nettoyage dont l'extraction liquide-liquide (LLE) et l'extraction en phase solide sont les procédures de nettoyage les plus utilisées (*Myllyniemi et al., 2000*).

1-2. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

L'HPLC est une technique qualitative et quantitative qui permet la séparation analytique des constituants d'un mélange, reconnue comme une méthode de choix pour l'analyse des résidus d'antibiotiques (*Pikkemaat & al., 2009*). Comme dans toutes les techniques de séparations chromatographiques, les composés à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la **phase mobile** liquide à l'aide d'un injecteur. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la **phase stationnaire** dans un tube appelé colonne chromatographique (*Gupta et al., 2012*).

La phase stationnaire ralentit plus ou moins la migration des substances en fonction des propriétés propres aux solutés. La séparation peut être fondée sur l'adsorption, l'échange d'ions, l'exclusion par la taille, les interactions hydrophobes et la polarité. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique (*voir figure 05*) (*Oliveira & al., 2006*).

Les avantages de la HPLC sont : une haute résolution, une certaine rapidité, une forte sensibilité et une possibilité d'automatisation. Le système HPLC est couramment utilisé dans la séparation des antibiotiques (*Behl et al., 2005*). Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne (*Nisha, 2008*).

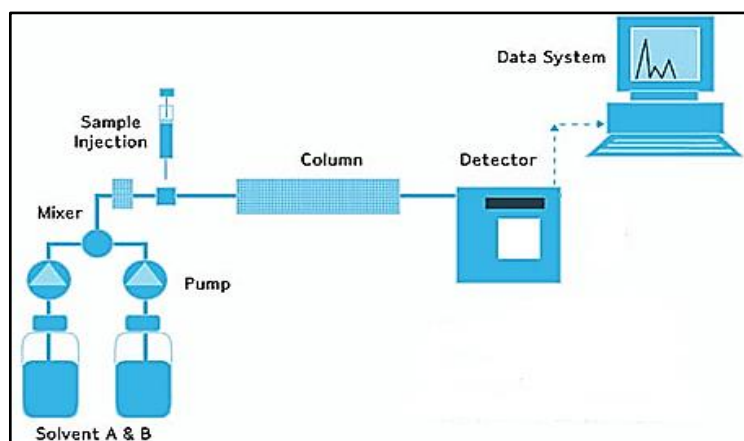


Fig. 05. Schéma représentant l'appareillage de l'HPLC (Behl et al., 2005)

De ce phénomène appelé rétention il résulte que les constituants du mélange injectés 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 couplée à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé *chromatogramme*. Le temps qui s'écoule entre l'injection du mélange et le sommet d'un pic correspond au temps de rétention (voir figure 06) (Azim et al., 2013).

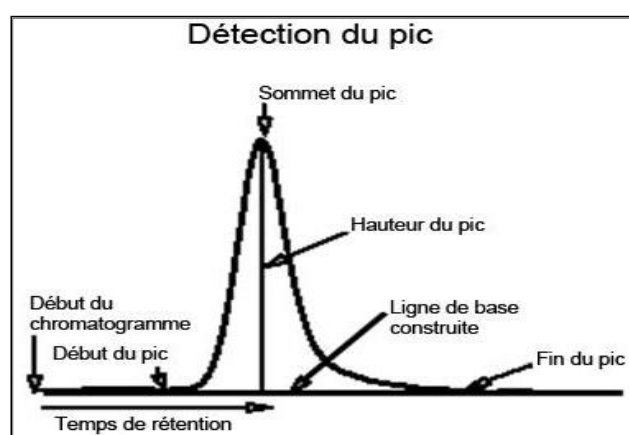


Fig. 06. Présentation d'un pic (Azim et al., 2013)

Dans des conditions chromatographiques données le "temps de rétention" 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 (*analyse quantitative*) (Rao et al., 2015).

1-3. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet de séparer des molécules d'un mélange de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Son principe consiste à partager l'échantillon à analyser entre deux phases. L'une de ces phases est un liquide stationnaire uniformément réparti sous forme d'une pellicule mince sur un solide inerte de grande surface spécifique, tandis que l'autre phase est un gaz mobile. Un composé qui a plus d'affinité pour la phase mobile, aura peu d'interaction avec la phase stationnaire et sera donc moins ralenti par celle-ci, et donc élué plus rapidement qu'un composé qui a plus d'affinité avec la phase stationnaire (*Reig & Toldra, 2008*).

1-4. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent, essentiellement par capillarité, à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Ce qui fait que chaque composant se déplace à sa propre vitesse (*Oliveira & al., 2006*).

2. Méthode spectrométrique : spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une méthode physico-chimique permettant d'identifier un principe toxique. C'est une méthode de mesure des rapports masse/charge de molécules individuelles et ionisées et de leurs produits de fragmentations (*Jeon et al., 2008*). Pour cela, le spectromètre de masse doit assurer les opérations suivantes:

- ◆ **Volatiliser** : Séparer les molécules les unes des autres : on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux ;
- ◆ **Ioniser** : Transformer les molécules en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques ;
- ◆ **Mesurer les rapports m/z** : La masse moléculaire est calculée à partir du rapport masse (m) sur le nombre de charges (z) (*Zaikin & Halket, 2006*).

3. Couplage CPG–SM et couplage HPLC–SM

Nombreux sont les laboratoires de chimie analytique aujourd'hui équipés d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse ou chromatographe en phase liquide couplé à un spectromètre de masse. La LC-MS permet de déterminer des composés à masse moléculaire élevée et des analytes polaires, non volatiles ou thermolabiles sans dérivatisation. Cette technique est particulièrement intéressante pour l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires. Le spectromètre de masse (MS) permet de déterminer de faibles traces d'un composé particulier provenant d'un mélange complexe avec plus de rapidité et de précision que les techniques classiques. Les inconvénients de cette méthode restent le coût très élevé des appareils (*Zaikin & Halket, 2006*).

Deuxième partie :

ETUDE EXPÉRIMENTALE

Objectif d'étude

Nous constatons actuellement en Algérie une utilisation abusive et anarchique des antibiotiques en pratique vétérinaire. Il s'agit surtout du non-respect du délai d'attente et de l'absence de réglementation concernant les limites maximales autorisées des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale destinées à la consommation. Ce qui présente un risque certain pour le consommateur algérien sachant que ces résidus peuvent avoir des conséquences néfastes sur sa santé.

La consommation accrue de ces antimicrobiens, au cours de ces dernières années, laisse à croire qu'il existerait un lien direct entre l'utilisation des antibiotiques chez les animaux comme médicaments ou comme adjuvants alimentaires, et l'augmentation du nombre d'organismes résistants qui se développent.

L'importance de ce problème d'ordre sanitaire et technologique nous a incités à nous intéresser à ce thème. La démarche que nous avons adoptée dans la partie expérimentale du présent travail s'articule en deux parties :

Partie I : Une étude analytique portant sur la détermination et la quantification des résidus d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline dans les tissus comestibles chez le poulet de chair (tissu hépatique, rénale et musculaire) par chromatographie liquide à haute performance avec détection aux rayons UV.

Partie II : Etude de l'effet du traitement thermique sur la persistance des résidus d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline.

Matériel et Méthodes

I-Matériel

I.1-Echantillonnage

L'étude a été réalisée sur un total de 200 poulets de chair collectés auprès de l'abattoir avicole de la commune de Ain Touta (Batna, Algérie), par des méthodes d'échantillonnage aléatoire. Les poulets étaient élevés tous ensembles ce qui nous a permis de ne pas marquer les animaux afin de connaître la provenance des échantillons.

Ces animaux étaient gardés dans des hangars clos, privés de lumière du jour et recevaient un régime alimentaire riche en vitamine D afin de palier la déficience causée par le manque d'exposition à la lumière du jour (*voir figure 07*).

Les contraintes de cet élevage sont surtout d'ordre sanitaire. Les aviculteurs, par leur manque d'encadrement, ne respectent pas vraiment les notions d'hygiène. La conception des bâtiments répond, pour la plupart, aux normes mais l'entretien des locaux n'est pas souvent assuré. Le matériel d'élevage, pourtant simple, constitue un principal facteur de dissémination des maladies car il n'est pas bien entretenu.



Fig. 07. Elevage de volaille

Ces poulets reçoivent une alimentation sous forme de granulés fort énergétiques, riches en protéines et contenant de la lysine, de la méthionine, du calcium, du phosphore, des graisses, de la cellulose, avec des proportions adaptées à chaque période d'élevage.

L'alimentation et l'eau représentent des investissements considérables, pour pallier cela, les aviculteurs commencent à concevoir eux même leurs aliments à base de produits locaux et supplémentent eux même les rations avec des antibiotiques tel que l'oxytétracycline.

Afin d'accélérer la croissance des poussins et de minimiser le temps d'élevage, l'oxytétracycline est administrée sous forme de complément alimentaire dans une proportion de 30 mg/kg de nourriture, pendant les 45 jours d'élevage. Aussi, la colistine et l'ampicilline étaient utilisées au sein de la majorité de ces fermes :

- La colistine était indiquée en tant que traitement curatif ou préventif des infections digestives dues aux *Escherichia coli*, administrée par voie orale dans l'eau de boisson à une proportion de 75 mg/kg de nourriture par jour pendant 3 jours.
- Tandis que l'ampicilline était indiquée comme traitement curatif des infections gastro-intestinales et des infections des voies respiratoires causées par *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Clostridium*, et comme traitement préventif des entérites nécrosantes à *Clostridium perfringens* sensibles à la pénicilline. L'ampicilline était administrée par voie orale dans l'eau de boisson à une proportion de 187.5 g de poudre par 100 l d'eau de boisson, ce qui est l'équivalent de 50 mg d'ampicilline par kg de nourriture et ce pendant 3 à 5 jours.

Au bout de 45 jours d'élevage 200 poulets de 2500 à 3000 g de poids corporel ont été abattus et les échantillons ont été prélevés : tissus hépatiques, rénal et musculaires (*voir figure 08*).

Le prélèvement des échantillons s'est fait en saison hivernale, qui est une période favorable pour notre étude, car durant cette saison les antibiotiques sont largement utilisés comme traitement curatif et prophylactique afin de lutter contre les différentes maladies qui pourraient surgir au sein de l'élevage.

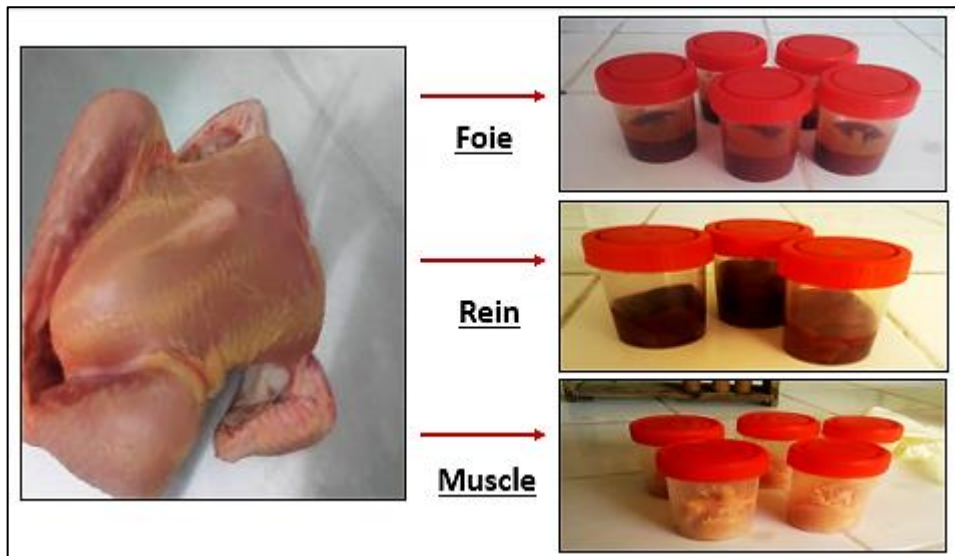


Fig. 08. Prélèvement des échantillons

Chaque échantillon a été conditionné de façon unitaire dans un tube stérile, enveloppé par du papier aluminium, étiqueté et contenant une solution de tampon phosphate salin (PBS) (voir figure 09). Chaque étiquette mentionne le code de l'échantillon et la date du prélèvement. Les produits ainsi prélevés ont été placés dans une glacière munie de plaque eutectique et transportés le plus rapidement possible au laboratoire puis stockés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'analyse.



Fig.09. Echantillons à analyser

I.2-Réactifs et produits chimiques

1. Etalon analytique

Oxytétracycline :

- Nom du produit : Oxytétracycline Hydrochloride VETRANAL (Réf : O5875, Sigma Aldrich).
- Formule chimique : $C_{22}H_{24}N_{2}O_9 \cdot HCl$.
- Masse molaire : 496.89 g/mole.
- Forme physique : poudre cristalline jaune, crémeuse, hygroscopique, sans odeur.
- Solubilité : soluble dans les solvants organiques (huile, propylène glycol) et peu soluble dans l'eau.
- Stabilité : stable à 25 °C, de 43% à 81% d'humidité pendant 6 semaines, à pH de 3.8 à 5 où son activité est maintenue à 90%. Son activité est rapidement perdue lorsqu'elle est conservée à pH supérieure à 7.

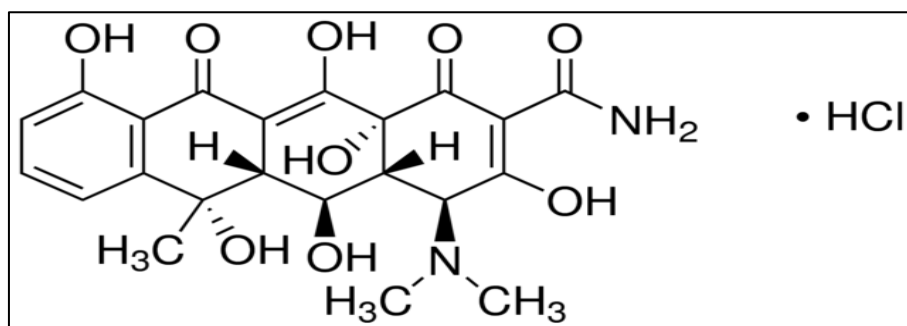


Fig10. Structure chimique d'oxytétracycline (Helmy & Gomaa, 2015).

Colistine :

- Nom du produit : Colistine Sulfate Salt (Réf : C4461, Sigma Aldrich).
- Formule chimique : $C_{53}H_{102}N_{16}O_{17}S$.
- Masse molaire : 126.55 g/mole.
- Forme physique : poudre blanche crémeuse, hygroscopique, sans odeur.
- Solubilité : soluble dans l'eau, légèrement soluble dans le méthanol et insoluble dans l'acétone et l'éther diéthylique.
- Stabilité : stable en solution aqueuse à pH compris entre (5.5 et 8).

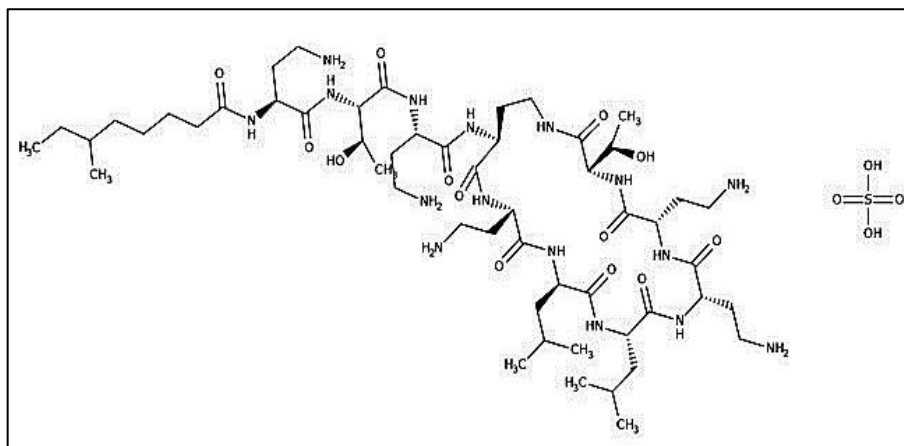


Fig 11. Structure chimique de la colistine (Kempf & al., 2013).

Ampicilline :

- Nom du produit : Ampicilline Analytical Standard (Réf : 59349, Sigma Aldrich).
- Formule chimique : $C_{16}H_{19}N_3O_4S$.
- Masse molaire : 349.40 g/mole.
- Forme physique : poudre blanche cristalline, hygroscopique, sans odeur.
- Solubilité : légèrement soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans l'alcool, le chloroforme, l'éther et les huiles fixes, mais solubles dans les acides ou les bases dilués.
- Stabilité : stable en solution aqueuse à pH compris entre (4 et 8).

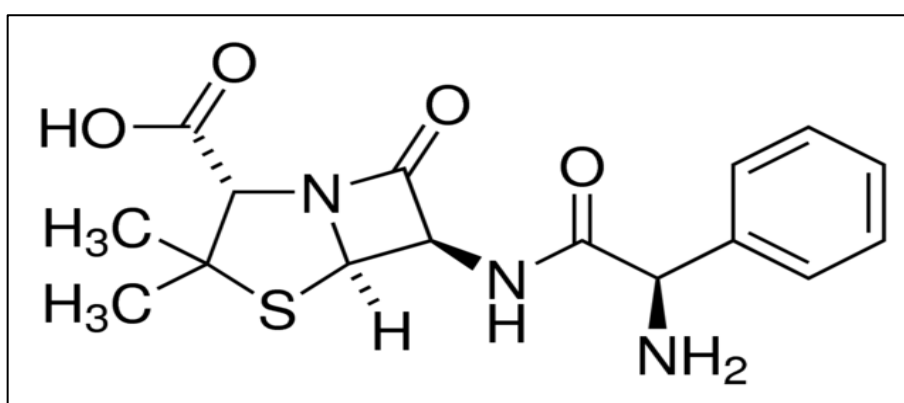


Fig 12. Structure chimique de l'ampicilline (Haouichat & al., 2002).

2. Éluant et diluants

- Le méthanol (Réf : 106009) et l'acétonitrile (Réf : 100030) étaient de grade HPLC.
- *Standards PHYWE* : le composé PHYWE est utilisé pour le calibrage de l'appareillage (HPLC). C'est un mélange de quatre molécules : Anthracène, Tétracène, Acénaphène et Acénaphylène.

3. Autres produits chimiques

Les autres produits chimiques que nous avons utilisés étaient de qualité analytique.

1.3-Appareillage

1. Système HPLC:

Les échantillons ont été analysés en utilisant un système de chromatographie liquide à haute performance de type HPLC LC-10AS (voir figure 13), équipé d'un dégazeur automatique (DGU-20A5), de deux pompes à haute pression (LC-10 ATvp), d'un détecteur UV-vis (SPD-10AVvp), d'un intégrateur (SCL-10Avp) et d'un injecteur équipé d'une boucle d'injection de 20 μ l.

L'acquisition des données a été contrôlée par le logiciel Chromatography Workstation Class-VP, Release 6.12, SP1.



Fig 13. Appareil HPLC

2. Dispositif de filtration :

Les solvants ainsi que les solutions standards doivent être filtrés à travers une membrane filtre (0.45µm) avant toute utilisation à l'aide d'un dispositif de filtration. Ceci afin d'éliminer les impuretés et de prévenir les artéfacts ou les pics parasites.

3. Centrifugeuse thermostatée :

Au cours de notre étude nous avons utilisés une centrifugeuse ventilée, réfrigérée ou thermostatée, qui permet d'obtenir rapidement par la force centrifuge la séparation des particules solides contenues dans les extraits, tout en permettant le control de la température du biomatériau durant la centrifugation ce qui est nécessaire pour la préservation des molécules d'intérêt et pour la préparation des échantillons à analyser. L'absence de contrôle de la température en phase d'extraction et de précipitation peut entrainer des résultats imprévisibles.

La centrifugeuse utilisée était de type Sigma 3-16 KL (Réf : 10360), présentant les caractéristiques suivantes :

- Capacité maximum : 4×400 ml.
- Vitesse minimum : 100 rpm.
- Vitesse maximum : 15300 rpm.
- Température minimum: -10°C .
- Température maximum : $+40^{\circ}\text{C}$.

4. Balance de précision :

Une balance analytique très sensible qui permet de mesurer des quantités de l'ordre du milligramme. C'est un appareil de haute résolution qui permet de déterminer avec exactitude la quantité du produit, avec une chambre de pesée afin d'empêcher les interférences de vibrations ou de courants d'air qui peuvent affecter les résultats.

C'est une balance de marque (RADWAG, AS220.R2) dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Capacité minimum : 10 mg.
- Capacité maximum : 220 g.
- Lisibilité (d) : 0.1 mg.

5. Agitateur vibrant (Vortex) :

C'est un agitateur électrique pour tubes à essais de type (IKA VF2, Réf : 19077), utilisé pour agiter les solutions et les extraits que nous avons préparés et afin d'assurer le mélange et l'homogénéisation de ces milieux liquides.

6. Agitateur magnétique chauffant :

De type (IKA RCT, Réf : 38202) utilisé au cours de l'étape d'extraction et de purification dans le but d'assurer l'homogénéisation des échantillons avec un réglage indépendant de la température et de la vitesse d'agitation qui nous permet d'utiliser l'agitateur magnétique chauffant comme un simple agitateur magnétique non chauffant ou comme plaque chauffante.

7. Incubateur microbiologique :

De type HERAEUS, utilisé pour l'incubation des boîtes de pétri durant de la détection microbiologique.

8. pH mètre :

De type (senSION+ Ph3, Réf : 701623) utilisé afin de confirmer le pH de la solution extractive.

II-Méthodes

II.1-Préparation de la solution d'extraction d'oxytétracycline

- **Tampon Mcllvain** : 1.29 g de monohydrate d'acide citrique ($C_6H_{10}O_8$) dissous dans 100 ml d'eau distillée ont été ajoutés à 1.09 g d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) dissous dans 100 ml d'eau distillée.
- **Solution extractive (solution tampon EDTA-Mcllvain 0.1M, pH 4)**: le tampon Mcllvain a été ajouté à une solution de 0.1 M de Na_2EDTA (Dihydrate d'éthylène diamine tétra-acétate disodique) : 3.72 g de Na_2EDTA dissous dans 100 ml d'eau distillée (0.1 M EDTA/tampon Mcllvain, 50 : 50).

II.2-Préparation du tampon phosphate salin

Le tampon phosphate salin (PBS) a été utilisé en vue d'empêcher la dénaturation des biomolécules, ou les éventuelles changements de conformation.

La préparation du tampon phosphate salin a été réalisée par la dissolution de 8g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.24 KH₂PO₄ dans 1000 ml d'eau distillée. La solution a été agitée à l'aide d'un agitateur magnétique et le pH a été ajusté à 7.4 avec la soude (NaOH).

II.3-Procédure d'extraction et de précipitation

L'extraction des résidus d'antibiotiques a été réalisée au niveau du laboratoire des « Sciences Alimentaires » et du laboratoire de « Toxicologie » au niveau du département de Technologie Alimentaire de l'institut Agro-Vétérinaire de l'université de Banta 1.

1. Oxytétracycline

Cinq grammes de chaque échantillon précédemment broyé et homogénéisé ont été pesé dans un tube à centrifugation en polypropylène auxquels 20 ml de solution tampon EDTA-McIlvaine 0.1 M (pH 4.0) ont été ajoutés.

La suspension a été agitée à l'aide d'un agitateur magnétique (IKA) à 1200 tours par minute pendant 10 minutes, ensuite agitée au vortex (IKA) pendant 2 minutes à 1600 tours par minute et laissée à température ambiante pendant 3 minutes afin de s'assurer de la distribution appropriée de la matrice.

Les tubes ont ensuite été centrifugés à 3000 tpm pendant 10 minutes à une température de 10 °C à l'aide d'une centrifugeuse thermostatée. Les surnageants ont été collectés soigneusement dans de nouveaux tubes à centrifugation propre.

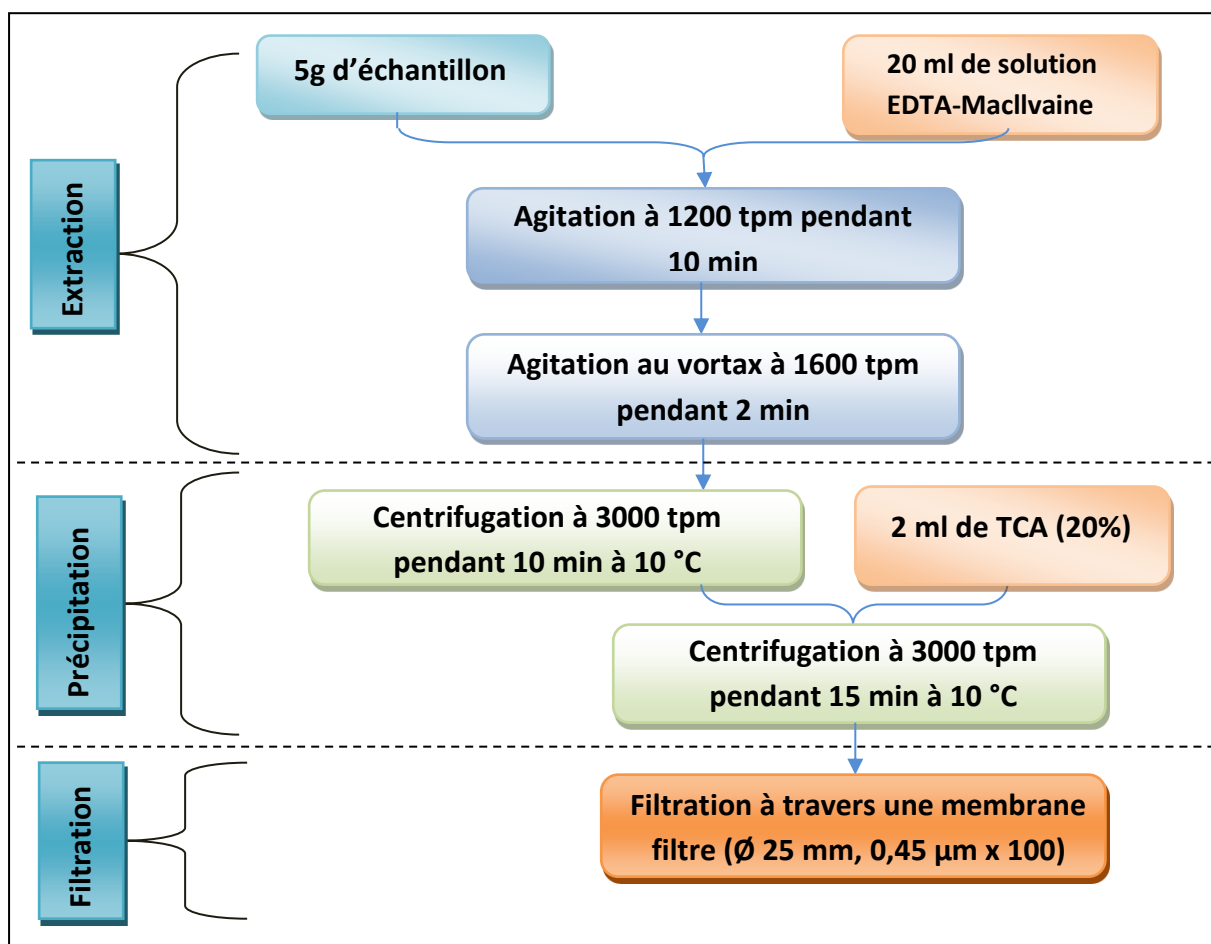


Fig.14. Extraction et précipitation d'OTC.

Deux autres extractions ont été effectuées mais avec 20 ml puis 10 ml de tampon EDTA-McIlvaine (pH 4.0).

Vingt ml de surnageants provenant des trois extractions ont été agités aux vortex pendant 2 min avec 2 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20% en tant qu'agent de déprotéinisation. Puis centrifugés à 3000 tours par minute pendant 15 minutes à 10 °C.

Les surnageants sont ensuite filtrés à l'aide d'une membrane de filtration en nitrate de cellulose (diamètre 25 mm, pores 0,45 µm x 100).

2. Colistine

Deux grammes de chaque échantillon broyé et homogénéisé ont été pesés dans un tube à centrifugation en polypropylène de 50 ml, auxquels on ajoute 10 ml de solution d'extraction composée d'acide trichloroacétique à 10% et d'acétonitrile (40 : 60, v/v), puis agités au vortex pendant 2 min à 1600 tours par minutes et centrifugés à 2500 tours par minutes pendant 10 minutes à 2 °C.

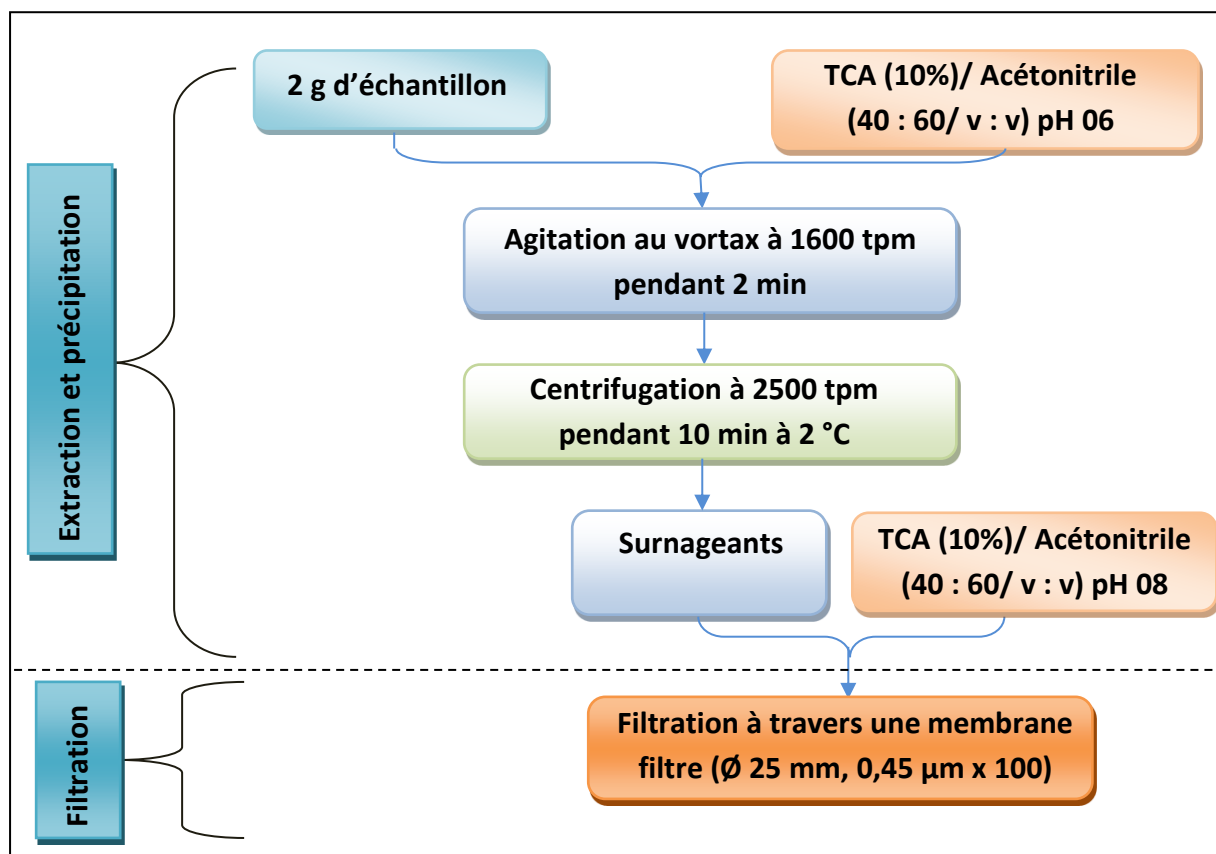


Fig.15. Extraction et précipitation de Colistine.

L'étape d'extraction a été répétée mais avec une solution d'extraction dont le pH a été ajusté à 8,0 à l'aide d'une solution de NaOH. Les surnageants ont été soigneusement recueillis et filtrés à travers une membrane de filtration en nitrate de cellulose (diamètre 25 mm, pores 0,45 µm x 100).

3. Ampicilline

Cinq grammes de chaque échantillon broyé et homogénéisé ont été pesés dans un tube à centrifugation en polypropylène de 50 ml avec 15 ml d'acétonitrile/eau (volume 15: 2) pendant une minute. Puis agités à 1200 tpm pendant 10 minutes et centrifugé à 4 000 tpm à 4 °C pendant 5 minutes à l'aide d'une centrifugeuse thermostatée. Les surnageants ont été soigneusement recueillis dans de nouveaux tubes à centrifugation propres.

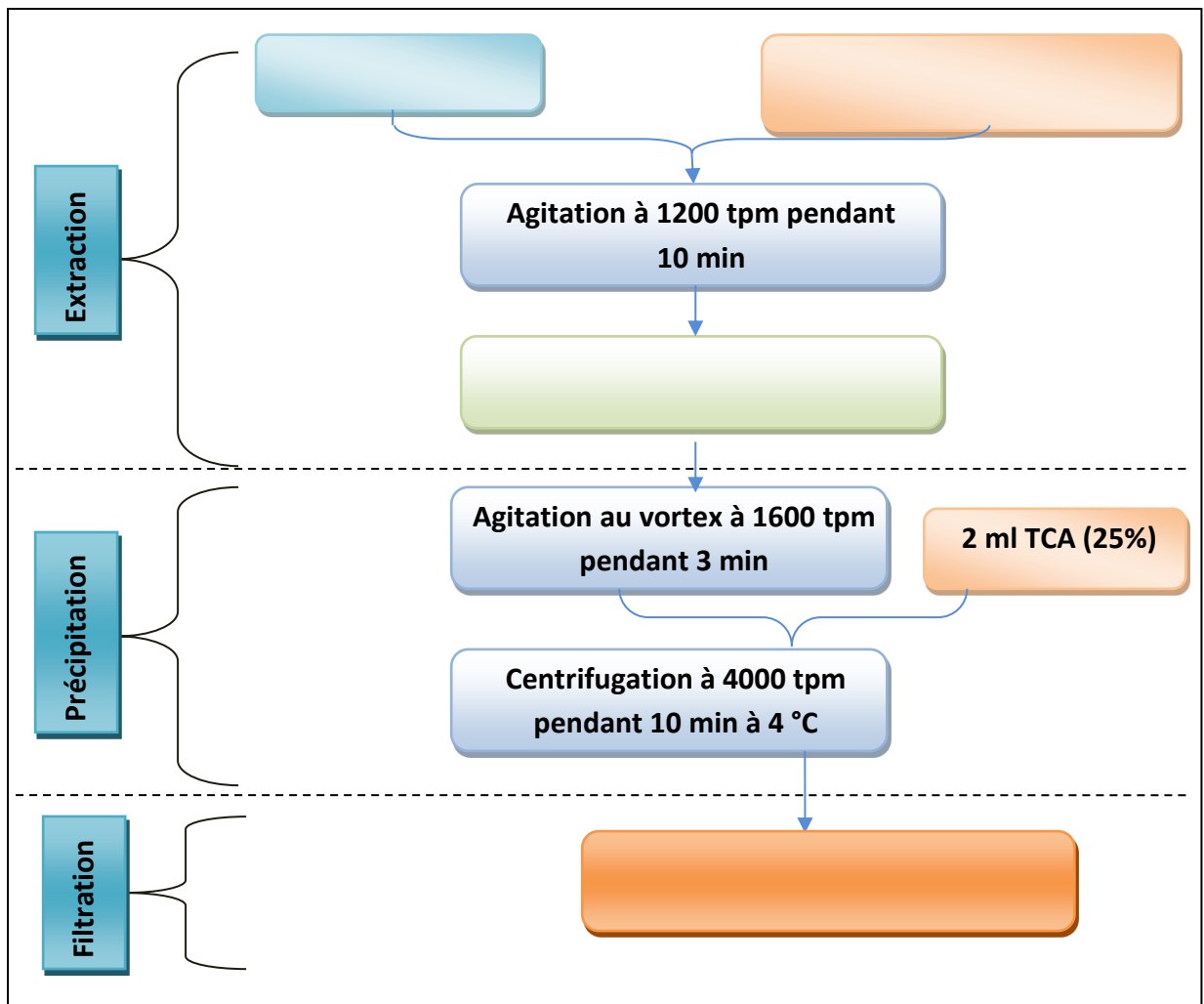


Fig.16. Extraction et précipitation d'Ampicilline.

Deux autres extractions ont été effectuées et les surnageants ont été combinés. Puis agités au vortex pendant 3 min avec 2 ml d'acide trichloroacétique à 25% comme agent de déprotéinisation. Puis centrifugé à nouveau à 4000 tpm à 4 °C pendant 10 minutes.

Les surnageants ont ensuite été filtrés à travers une membrane de filtration en nitrate de cellulose (diamètre 25 mm, pores 0,45 µm x 100).

II.4-Détection microbiologique

Après la préparation des échantillons, les extraits ont d'abord été testés en ce qui concerne la présence d'activité antimicrobienne en utilisant un test d'inhibition microbiologique. Ceci dit, les méthodes de détection ne sont pas assez spécifiques ni assez précises, car elles ne permettent ni l'identification précise ni le dosage des résidus d'antibiotiques.

De plus, sa sensibilité peut conduire à de faux résultats positifs, comme il nous est impossible d'identifier la molécule antibactérienne précisément impliquée, car le test utilisé est uniquement un test d'orientation qui devrait aboutir à des recherches plus poussées. Du fait les échantillons s'étant révélés positifs devront être soumis à un test de confirmation chromatographique afin de pouvoir identifier sans ambiguïté la molécule antibactérienne et de pouvoir la quantifier.

Le dépistage des résidus d'antibiotiques a été réalisé au niveau du laboratoire de « Microbiologie » au niveau du département de « Technologie Alimentaire » de l'institut « Agro-Vétérinaire » de l'Université de Batna 1.

La pré-sélection des échantillons de viandes pour la présence des résidus d'antibiotiques a été réalisée en utilisant un test microbiologique basé sur l'inhibition de la croissance bactérienne des souches pures *Bacillus Cereus*, *Bacillus Subtilis* et *Micrococcus luteus* par les éventuels résidus antimicrobiens présents dans les échantillons.

Les souches pures *Bacillus Cereus*, *Bacillus Subtilis* et *Micrococcus luteus* ont été obtenue à partir du service de microbiologie au niveau du CHU de Batna (Algérie). Le pH de la gélose nutritive a été ajusté à 6 par l'addition d'une solution stérile d'acide chlorhydrique (HCl) (0.1 M) et ajusté à 8 en ajoutant de l'hydroxyde de sodium (NaOH) (0.1 M).

Après autoclavage à une pression de 15 psi à une température de 121 °C pendant 15 min, le milieu de culture a été refroidi à 45-55 °C.

Quinze millilitres de gélose nutritive ont été coulés dans des boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre et laisser refroidir sur une surface plane et froide. Puis, à l'aide d'un écouvillon stérile on fait un prélèvement de souche pure et on ensemence la boîte en frottant l'écouvillon sur toute la surface de la gélose en tournant la boîte trois fois de 60°. Les boîtes ont ensuite été incubées afin de déterminer l'effet du pH sur la croissance bactérienne.

Six disques de papier Buvard d'un diamètre de 6.35 mm, imprégnés des extraits à analyser ont été déposées dans la couche d'agar après solidification. Les disques sont à une distance de moins de 30 mm l'un de l'autre comme le démontre *la figure 17*.

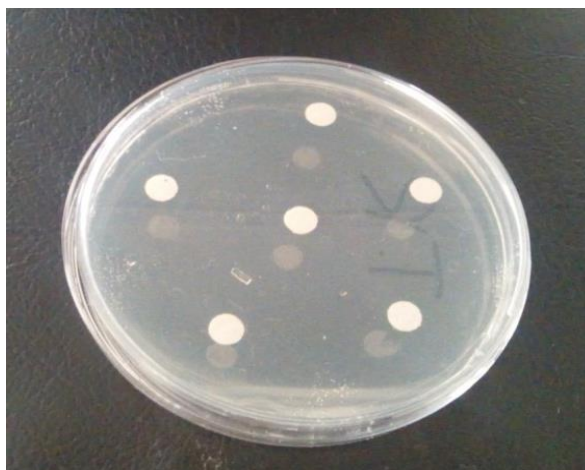


Fig.17. Application des disques dans une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre

Trois boîtes différentes ont été utilisées pour la détection d'antibiotiques :

- Boîte I : gélose nutritive de pH 6ensemencée avec la souche *Bacillus Cereus*.
- Boîte II : gélose nutritive pH 7.3ensemencée avec la souche *Bacillus Subtilis*.
- Boîte III : gélose nutritive de pH 8ensemencée avec la souche *Micrococcus luteus*.

Les boîtes ont été codées de manière à ce que les deux premières lettres représentent l'organisme d'essais, la troisième lettre représente l'antibiotique recherché, la quatrième lettre l'organe de volaille utilisé, tandis que la cinquième lettre représente le pH.

Par exemple : BCOL6 représente la boîte II avec les extraits de foie pour la détection d'éventuel résidus d'oxytétracycline.

Après une pré-diffusion d'environ 1 heure, à une température ambiante, les boîtes I ont été incubées à 37 °C pendant 24 heures, les boîtes II ont été incubées à 30 °C pendant 24 heures et les boîtes III ont été incubées à 30 °C pendant 48 heures.

L'éventuelle présence de résidus d'antibiotiques dans les échantillons entraîne la formation d'une zone transparente autour du disque appelée zone d'inhibition et qui correspond à une inhibition complète de la croissance bactérienne.

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse numérique (HDCD01200, INGCO) et par soustraction du diamètre des disques et qui est de 6.35 mm. Les échantillons présentant une zone d'inhibition supérieure ou égale à 2 mm de diamètre ont été considérés comme positifs. Tandis que les échantillons présentant une zone d'inhibition totalement inférieure à 2 mm de diamètre ont été considérés comme négatives.

II.5-Confirmation chromatographique

L'analyse chromatographique a été réalisée au niveau du « Laboratoire d'Analyse Biologique » au niveau de la Faculté des « Sciences de la Nature et de la Vie » de l'université « Frères Mentouri Constantine I ».

1. Conditions chromatographique

- ***Oxytétracycline*** : La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne analytique en phase inverse C18 (greffée de gel de silice), avec élution isocratique d'une solution d'acide oxalique (10 mM)/acétonitrile (80 : 20, v/v) comme phase mobile. Le volume d'injection était de 11 μ l pour tous les étalons et les extraits d'échantillons avec un débit d'écoulement de 1.2 ml/min et une durée d'analyse de 6 min. les pics ont été détectés à une longueur d'onde de 355 nm.

- ***Colistine*** : La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne analytique en phase inverse C18 (greffée de gel de silice), avec élution isocratique d'une solution de méthanol comme phase mobile. Le volume d'injection était de 10 μ l pour tous les étalons et les extraits d'échantillons avec un débit d'écoulement de 2 ml/min et une durée d'analyse de 8 min. Les pics ont été détectés à une longueur d'onde de 250 nm.

- ***Ampicilline*** : La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne analytique en phase inverse C18 (greffée de gel de silice), avec élution isocratique d'une solution de méthanol comme phase mobile. Le volume d'injection était de 20 μ l pour tous les étalons et les extraits d'échantillons avec un débit d'écoulement de 1 ml/min et une durée d'analyse de 12 min. les pics ont été détectés à une longueur d'onde de 220 nm.

Le tableau II démontre les conditions d'analyse chromatographique.

Tableau II. Conditions d'analyse chromatographique

	<i>Oxytétracycline</i>	<i>Colistine</i>	<i>Ampicilline</i>
Phase stationnaire	Phase inverse C18	Phase inverse C18	Phase inverse C18
Phase mobile	Acide oxalique (10 mM)/acétonitrile (80 : 20, v/v)	Méthanol	Méthanol
Diluant	Méthanol	Acétonitrile	Méthanol
Longueur d'onde	355 nm	250 nm	220 nm
Volume d'injection	11 µl	10 µl	20 µl
Débit d'écoulement	1.2 ml/min	2 ml/min	1 ml/min
Durée d'analyse	6 min	8 min	12 min

Tous les échantillons, les solvants, ainsi que les solutions standards doivent être filtrés à travers une membrane filtre de type SUPELCO (0.45µm) avant toute utilisation.

L'acquisition des données a été contrôlée par le logiciel Chromatography Workstation Class-VP, Release 6.12, SP1.

2. Tests de nettoyage

Entre chaque analyse on fait des tests de nettoyages afin de nettoyer la colonne et d'éviter les artéfacts.

3. Préparation des solutions standards

- *Oxytétracycline* : La solution standard d'oxytétracycline a été préparée en dissolvant 10 mg du standard pur dans 10 ml de méthanol pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml. La solution standard a été préservée dans des flacons enveloppés par du papier aluminium afin de les protéger de la photodégradation.

- *Colistine* : La solution standard de colistine a été préparée en dissolvant 10 mg du standard pur dans 10 ml d'acétonitrile pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml.

- **Ampicilline** : Une solution mère de 0,4 mg/ml a été préparée en dissolvant 8 mg de standard pure d'ampicilline dans 20 ml de méthanol. La solution standard a été conservée dans des flacons enveloppés par du papier aluminium afin d'éviter une éventuelle décomposition.

Ces solutions mères étaient conservées à -20 °C et étaient stables pendant un mois, après quoi elles sont remplacées par de nouvelles solutions fraîches.

4. Préparations des solutions étalons ou des solutions filles

Les solutions filles sont obtenues par dilution de la solution mère. Six séries de solutions étalons de concentrations différentes ont été préparées : 600, 300, 150, 75, 30 et 0.1 µg/ml afin de tracer la courbe d'étalonnage et d'évaluer la linéarité.

5. Filtration

L'opération de filtration est effectuée quotidiennement avant toute manipulation. La phase mobile ainsi que les extraits à analyser sont déversés dans le réservoir, la pompe exerce une pression forcée qui permet au liquide de passer à travers la membrane filtre dont le diamètre des pores est de 0.45 µm, cette dernière retient toutes les impuretés.

Cette étape de filtration est primordiale pour l'analyse HPLC car elle permet d'éliminer toutes les impuretés présentes dans les solutions et d'éviter ainsi l'apparition, des artefacts sur les chromatogrammes.

6. Quantification

La quantité d'antibiotiques présente dans les produits analysés est déterminée à l'aide des solutions étalons qui ont une concentration et un volume connus.

La quantification d'oxytétracycline, d'ampicilline et de colistine dans les matrices a été basée sur la surface des pics des standards qui ont été utilisés afin d'établir une courbe d'étalonnage et ainsi une linéarité de la variation de la surface des pics en fonction de la variation des concentrations d'antibiotiques dans les différentes matrices.

II.6-Traitement thermique et congélation des échantillons positifs

Les échantillons confirmés positives par HPLC ont été soumis à un traitement thermique (ébullition et friture). Comme ils ont été soumis à une congélation à -20 °C qui a duré un mois.

a-Ebullition : 20 g de chacun des échantillons révélés positives ont été placé dans une passoire puis immergés dans un bain d'eau préchauffé à 100 °C que l'on a fait bouillir pendant 30 minutes. Suite à cela les échantillons ont été retiré et laisser refroidir.

b-Friture : 20 g de chacun des échantillons révélés positives ont été frit dans une casserole contenant une quantité appropriée d'huile végétale préchauffée à 200 °C pendant 10 minutes, puis retirés et laisser refroidir.

c-Congélation : 20 g de chacun des échantillons révélés positives ont été congelés à -20 °C pendant un mois.

Ces échantillons ainsi traités ont été analysés à nouveau par HPLC-UV suivant la méthode et les conditions précédemment décrites.

II.7-Echantillons enrichis

L'enrichissement des échantillons en antibiotiques se définit comme l'ajout d'une solution de concentration connue d'antibiotique à un échantillon. Ces échantillons sont utilisés comme des échantillons de contrôle positif et sont pris à partir de poulets qui n'ont pas été traités par des antibiotiques.

Ces échantillons ont été homogénéisés avec de l'eau distillée à une proportion de 1 : 2 (tissu : eau distillée) et ont été centrifugés à 3000 tpm pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris de tissus. Ensuite, l'enrichissement des échantillons a été réalisé selon la procédure suivante :

- Oxytétracycline

Une solution contenant de l'OTC a été préparée : 5 mg d'OTC furent d'abord pesés puis dilués dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration de 50 mg/l et agitée pendant 5 min à 250 tpm par un agitateur vibrant (vortex). Des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir des concentrations de 40 mg/ml, 10 mg/l, 5 mg/l et 2.5 mg/l.

- Colistine

Afin de préparer une solution de colistine 9 mg de colistine furent dilués dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration de 90 mg/l et agitée pendant 5 min à 250 tpm par un agitateur vibrant (vortex). Des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir des concentrations de 72 mg/ml, 18 mg/l, 9 mg/l et 4.5 mg/l.

- Ampicilline

Une solution contenant de l'ampicilline a été préparée : 7 mg d'ampicilline furent dilués dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration de 70 mg/l et agitée au vortex pendant 5 min à 250 tpm. Des dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir des concentrations de 35 mg/ml, 14 mg/l, 7 mg/l et 3.5 mg/l.

Cinq grammes de jus de viande ont été pesé et mis dans un tube à centrifugation en polypropylène de 50 ml. Les échantillons de viande sont enrichis par les solutions d'antibiotiques précédemment préparée directement dans les tubes.

Ainsi, les échantillons avec une concentration connue d'antibiotique ont été analysés, et l'extraction des antibiotiques a été réalisée selon la méthode d'extraction et de précipitation précédemment décrite.

II.8-Paramètres de validation de la méthode

La validation de notre méthode analytique doit faire l'objet des tests suivants :

- **Répétabilité** : c'est la réalisation de la méthode dans des conditions de travail où les résultats sont obtenus par la même méthode, le même analyte, le même opérateur, le même équipement et pendant un court intervalle de temps. La répétabilité a été vérifiée par trois séries de 10 essais, effectués le même jour, la même solution de travail, le même laboratoire, le même équipement, le même opérateur et les mêmes conditions de travail.
- **Reproductibilité** : pour ce qui est de la reproductibilité de la méthode les essais sont réalisés dans des conditions de travail différentes. Pour ceci nous avons réalisé trois séries de 20 essais effectuées par 3 analystes différents, avec 3 solutions de travail différentes (une solution pour chaque série) et à quelques jours d'intervalle.

Pour vérifier les paramètres de répétabilité et de reproductibilité de la méthode employée, nous avons eu recours aux tests statistiques de Student pour comparer les trois séries et voir si la différence entre ces dernières est significative.

- **Linéarité** : la linéarité de la variation des hauteurs de pics en fonction de la variation des concentrations du standard de référence injecté doit être vérifiée. La courbe de linéarité des surfaces en fonction des concentrations correspondantes doit être établie et le coefficient de corrélation doit être calculé. Afin de vérifier la linéarité de notre méthode analytique nous avons réalisé une gamme d'étalonnage de 600, 300, 150, 75, 30 et 0.1 µg/ml. Les résultats sont exprimés par :
 - L'équation de la courbe d'étalonnage : $Y = aX + b$ (Y : Surface, X : Concentration).
 - Le coefficient de corrélation (r).

- **Le recouvrement** : les effets matriciels dans les échantillons biologiques par exemple les lipides dans le plasma ou les protéines résiduelles, peuvent provoquer une perte d'analyte pendant la procédure analytique et peuvent affecter l'efficacité de récupération ou d'extraction. Le recouvrement est déterminé par des expériences utilisant du matériel de matrice vierge fortifié.

- **Les limites analytiques** : les limites analytiques comprennent la limite de détection (LOD), la limite de quantification (LOQ). La LOD est la plus faible concentration d'analyte qui peut être détectée dans un échantillon après l'application des critères d'identification appropriés. La LOQ est la concentration la plus faible de l'analyte identifié dans un échantillon qui peut être quantifié.

II.9-Analyse statistique

Nos résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA) a été appliquée pour tester les différences entre les moyennes de concentrations résiduelles. La différence entre les résultats a été analysée par le test Student. Lorsque ($p \leq 0.05$) les résultats ont été désignés comme étant statistiquement significatives. Lorsque ($p \leq 0.01$) les résultats ont été désignés comme étant statistiquement très significatives. Par contre lorsque ($p > 0.1$) les résultats ont été désignés comme étant non significatives.

Résultats et discussion

I-Résultats

I.1-Détection microbiologique

Suite à l'incubation, les disques s'entourent d'une zone claire appelée zone d'inhibition et qui correspond à une absence de culture bactérienne comme le démontre la *figure 18*.



Fig. 18. Zones d'inhibitions

A. Boîtes I

Nos résultats démontrent que 74, 61 et 46 échantillons parmi 200 échantillons de foie, des reins et du muscle, respectivement, ont démontré une activité antimicrobienne avec un pourcentage de 37.5%, 30.5% et 23%, respectivement. Ces résultats sont exprimés dans le tableau III.

Tableau III : Moyenne des zones d'inhibition (en mm) des résidus d'antibiotiques présents dans les échantillons des boîtes I

Echantillons examinés	Nombre d'échantillons	Echantillons positive		Zone d'inhibition (en mm)	
		Nombre	Pourcentage	Moyenne	SEM
Foie	200	74	37.5%	4.5148	0.1591
Rein	200	61	30.5%	3.6918	0.1216
Muscle	200	46	23%	3.2913	0.0447

B. Boîtes II

Nos résultats démontrent que 106, 83 et 64 échantillons parmi 200 échantillons de foie, des reins et du muscle, respectivement, ont démontré une activité antimicrobienne avec un pourcentage de 53%, 41.5% et 32%, respectivement. Ces résultats sont exprimés dans le tableau IV.

Tableau IV : Moyenne des zones d'inhibition (en mm) des résidus d'antibiotiques présents dans les échantillons des boîtes II

Echantillons examinés	Nombre d'échantillons	Echantillons positive		Zone d'inhibition (en mm)	
		Nombre	Pourcentage	Moyenne	SEM
Foie	200	106	53%	4.2011	0.1856
Rein	200	83	41.5%	3.4827	0.1520
Muscle	200	64	32%	3.1678	0.1306

C. Boîtes III

Nos résultats démontrent que 89, 67 et 52 échantillons parmi 200 échantillons de foie, des reins et du muscle, respectivement, ont démontré une activité antimicrobienne avec un pourcentage de 44.5%, 33.5% et 26%, respectivement. Ces résultats sont exprimés dans le tableau V.

Tableau V : Moyenne des zones d'inhibition (en mm) des résidus d'antibiotiques présents dans les échantillons des boîtes III

Echantillons examinés	Nombre d'échantillons	Echantillons positive		Zone d'inhibition (en mm)	
		Nombre	Pourcentage	Moyenne	SEM
Foie	200	89	44.5%	3.9389	0.1604
Rein	200	67	33.5%	3.3692	0.1426
Muscle	200	52	26%	3.1059	0.1233

Aussi l'analyse statistiques des résultats obtenus a révélé que les moyennes des zones d'inhibition enregistrés au niveau des échantillons de tissus hépatique étaient significativement plus élevées que les moyenne des zones d'inhibition observées au niveau des échantillons de tissus rénal et musculaire ($p \leq 0.05$) (voir figure 19).

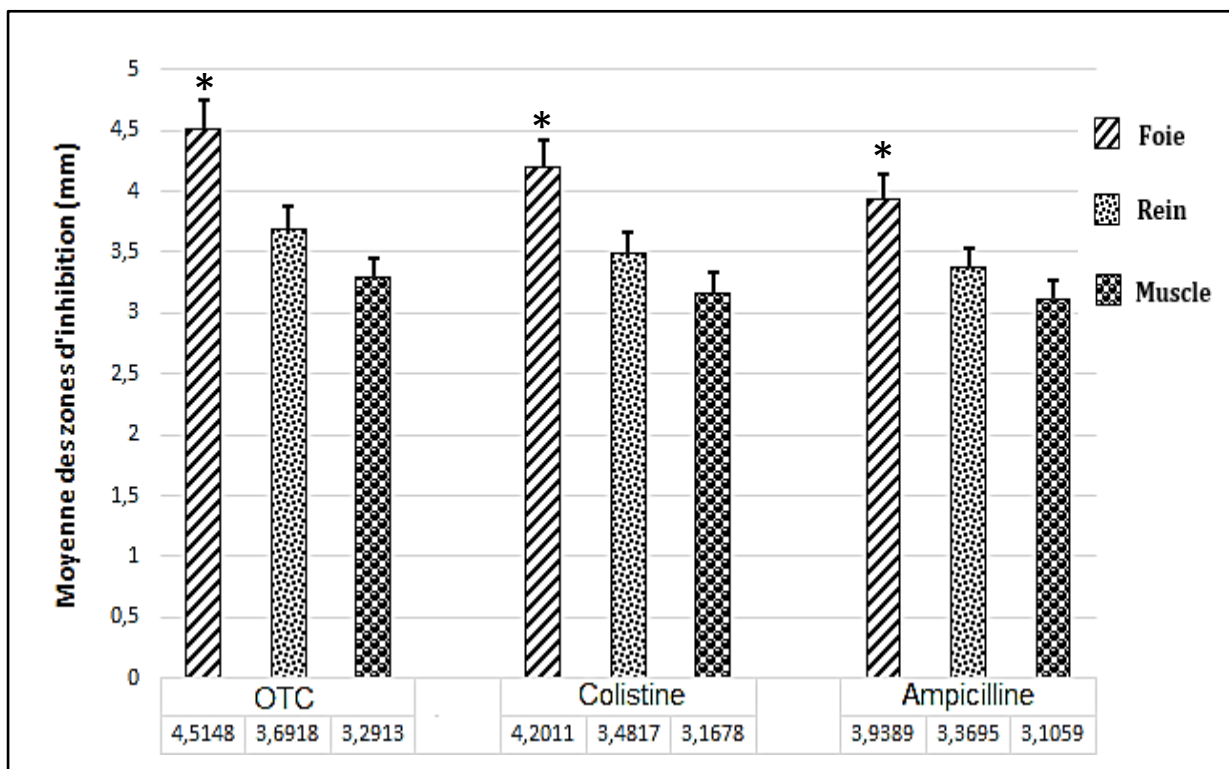


Fig 19. Moyennes des zone d'inhibiton au niveau du foie, du rein et du muscle chez le poulet de chair (moyenne \pm SEM en mm) (* $p \leq 0.05$)

I.2-Confirmation chromatographique

A. Calibrage de l'appareil

Le calibrage de l'appareil HPLC a été réalisé par un mélange de quatre molécules (Anthracène, Tétracène, Acénaphène et Acénaphtylène). Les conditions d'analyse de ce mélange sont représentées dans le tableau VI.

Tableau VI. Conditions d'analyse du standard PHYWE

Phase stationnaire	Phase inverse (C18)
Phase mobile	Méthanol 100%
Longueur d'onde	254 nm
Débit d'écoulement	1.5 ml/min
Volume d'injection	20 μ l
Durée d'analyse	10 min

Les résultats obtenus lors de l'analyse du composé PHYWE sont représentés dans la *figure 20*.

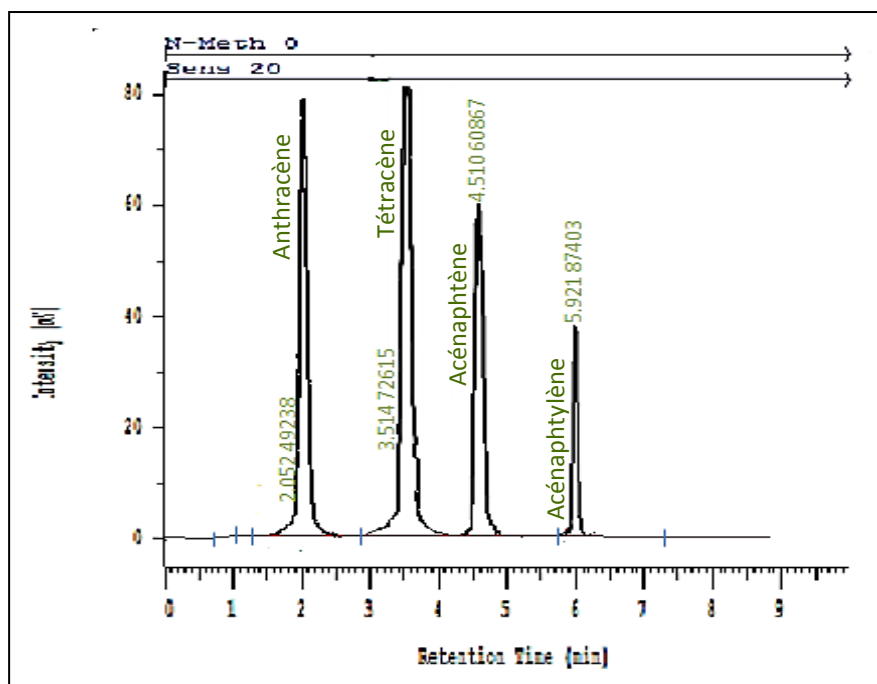


Fig. 20. Chromatogramme obtenue lors du calibrage de l'appareil.

Les quatre molécules du standard PHYWE ont été détectées à une longueur d'onde de 254 nm. Le chromatogramme obtenu démontre quatre pics différents avec des temps de rétention différents (Anthracène 2.05, Tétracène 3.51, Acénaphthène 4.51 et Acénaphthylène 5.59 min). Le calibrage de l'appareil ainsi réalisé, nous avons procédé à l'analyse des échantillons.

B. Paramètres de validation de la méthode

Suite à l'analyse statistique des résultats lors de la validation de la méthode analytique obtenus, nous remarquons qu'il n'y-a pas de différence significative entre les surfaces des trois séries d'analyse et qu'il y a un étroitement entre les résultats individuels obtenus. Ainsi nous pouvons conclure que la méthode employée est répétable et reproductible. Aussi le pourcentage de recouvrement étant estimé de 91.68%, 91.54% et 93.48%, indique qu'une concentration maximale de standard pur d'OTC, de colistine et d'ampicilline, respectivement, a été prélevée. Les valeurs de la LOD et de la LOQ indiquent que la méthode est suffisamment sensitive.

Les paramètres de validation de la méthode utilisée sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VII. Paramètres de validation de la méthode employée pour la quantification des résidus d'antibiotiques

Paramètre		OTC	Colistine	Ampicilline
Répétabilité	Série 01	40.76	85.18	43.27
	Série 02	44.26	80.05	44.03
	Série 03	42.49	82.24	44.54
Reproductibilité	Série 01	40.66	82.22	40.38
	Série 02	40.68	84.39	42.74
	Série 03	41.12	80.27	40.23
Recouvrement (%)		91.68	91.54	93.48
LOD (µg/kg)		3.23	7.20	5.51
LOQ (µg/kg)		6.80	9.92	7.19

- **Oxytétracycline** :

A partir de solutions de concentrations croissantes de standard d'OTC nous avons pu établir une courbe de linéarité. La relation entre la surface du pic et la concentration d'OTC était linéaire ($r^2 = 0.9993$, $n=6$) sur une série d'étalonnage de 0.1 à 600 µg/ml.

La courbe a été décrite par l'équation ($Y= 32.04 x + 186.9$), où « Y » représente la surface du pic et « x » la concentration en (µg/kg). Le coefficient de corrélation était satisfaisant et indiquait que cette procédure était fiable pour la détection quantitative (*voir figure 21*).

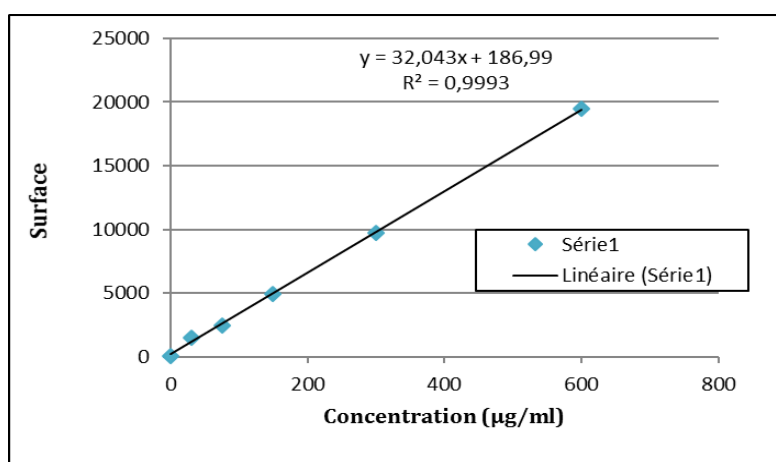


Fig. 21. Courbe d'étalonnage d'OTC

- Colistine

La courbe d'étalonnage de colistine indique que la relation entre la surface du pic et la concentration de colistine était linéaire ($r^2 = 0.9994$, $n= 6$) sur une série d'étalonnage de 0.1 à 600 $\mu\text{g/ml}$. La courbe a été décrite par l'équation ($Y= 32.352 x + 120.36$). Le coefficient de corrélation était satisfaisant et indiquait que cette procédure était fiable pour la détection quantitative (voir figure 22).

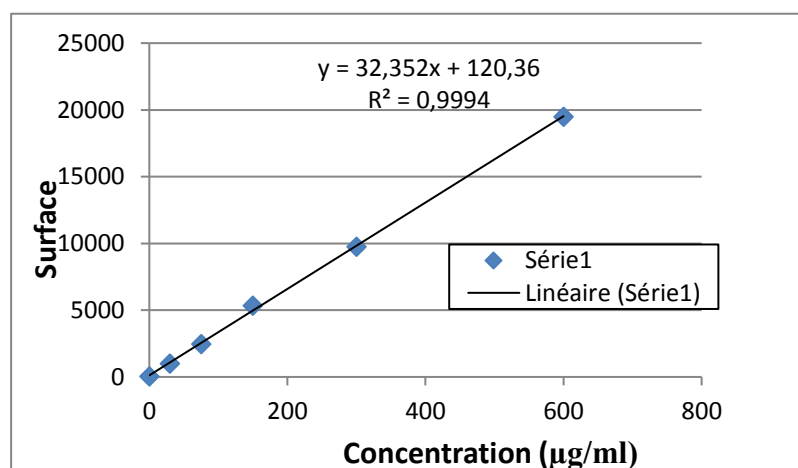


Fig. 22. Courbe d'étalonnage de Colistine.

- Ampicilline

La relation entre la surface du pic et la concentration d'ampicilline était linéaire ($r^2 = 0.9999$, $n= 6$) sur une série d'étalonnage de 0.1 à 600 $\mu\text{g/ml}$. La courbe a été décrite par l'équation ($Y= 27.818 x + 97.951$), où « Y » représente la surface du pic et « x » la concentration en ($\mu\text{g/kg}$). Le coefficient de corrélation était satisfaisant et indiquait que cette procédure était fiable pour la détection quantitative (voir figure 23).

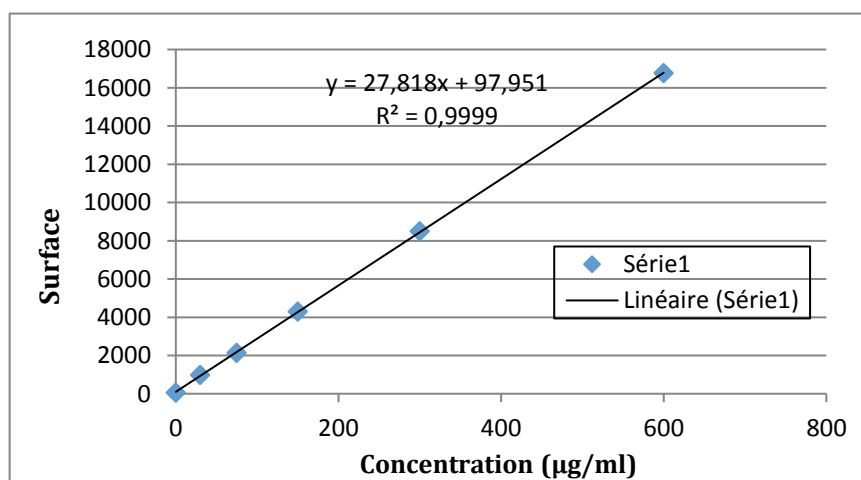


Fig. 23. Courbe d'étalonnage d'ampicilline.

C. Résultats de l'analyse chromatographique

Les résidus d'antibiotiques détectés dans les produits analysés ont été identifiés en se base de la comparaison du temps de rétention avec celui des pics standard de référence. L'identité a été confirmée en comparant l'extrait d'échantillon avec la solution standard de concentration connue, comme il est démontré en *figures 24, 25 et 26*.

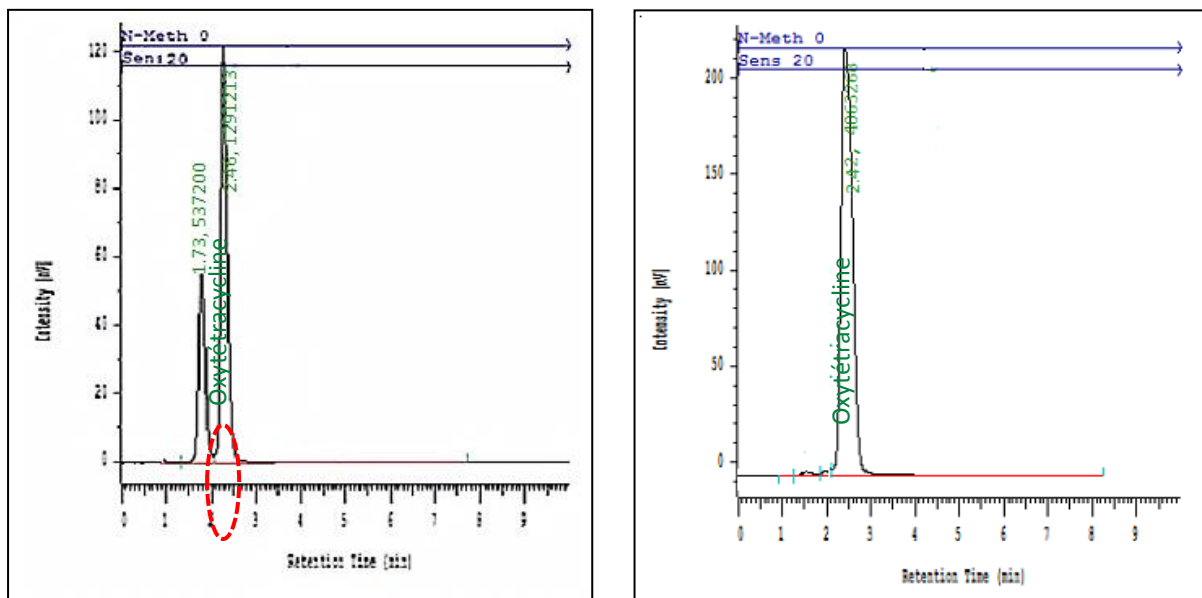


Fig. 24. Chromatogramme d'Oxytétracycline

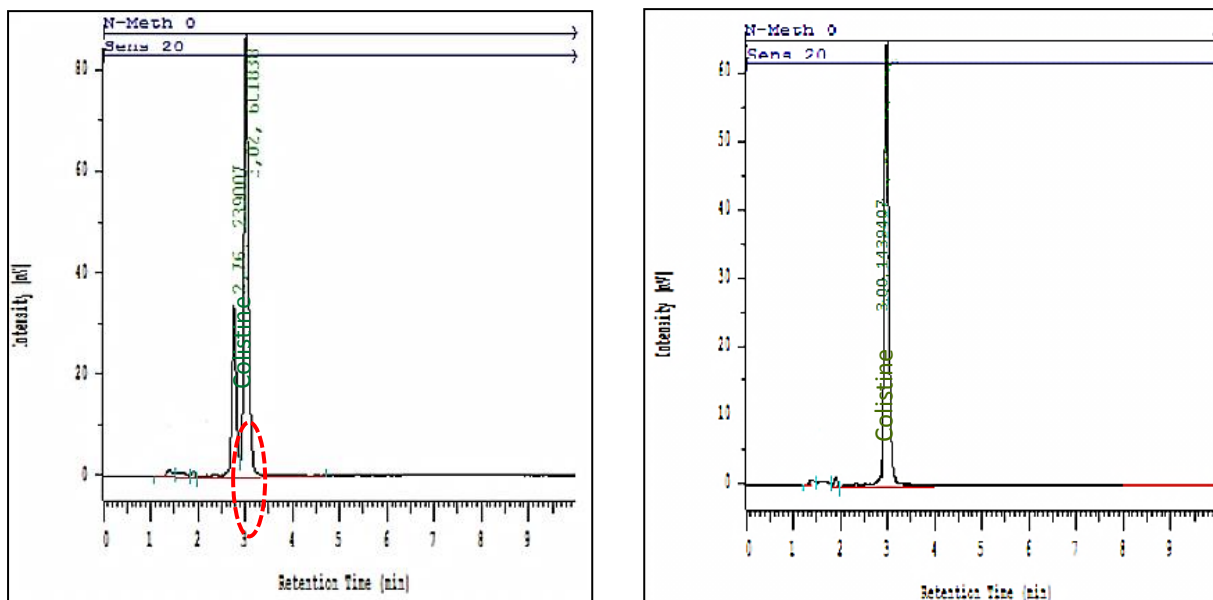


Fig. 25. Chromatogramme de colistine

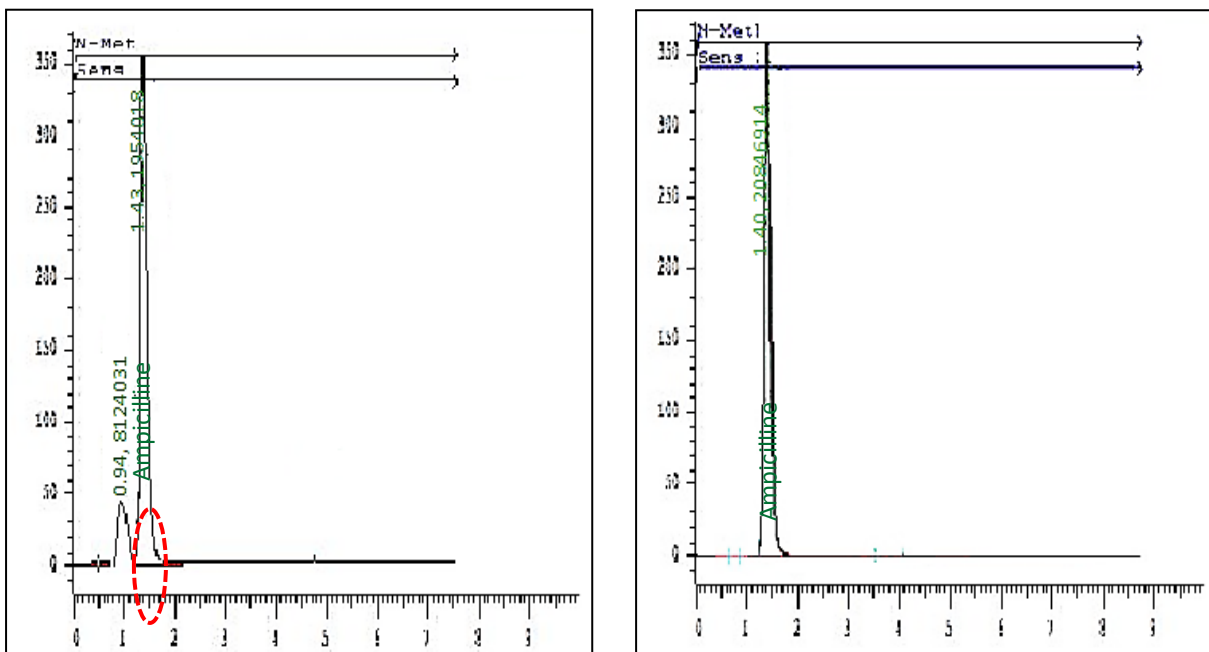


Fig. 26. Chromatogramme d'Ampicilline

Les résultats obtenus montrent que l'oxytétracycline a été détectée dans 14, 5 et 2 échantillons de foie, de reins et de muscle, respectivement ayant précédemment montré une activité antimicrobienne, représentant ainsi un pourcentage de 18.91, 8.19% et 4.34%, respectivement à une concentration de 958.81 ± 4.9 , 626.35 ± 7.94 et 194.17 ± 0.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au niveau du foie, des reins et du muscle pectoral, respectivement (Tableau VIII).

Tableau VIII : Concentrations résiduelles moyennes d'Oxytétracycline ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Echantillons examinés	Nombre d'échantillons	Echantillons positive		Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		Nombre	Pourcentage	Moyenne	SEM	
Foie	74	14	18.91%	958.81	4.9	300
Rein	61	5	8.19%	626.35	7.94	600
Muscle	46	2	4.34%	194.17	0.61	100

La colistine a été détectée dans 31, 19 et 13 échantillons de foie, de reins et de muscle, respectivement. Ceci représente un pourcentage de 2.24%, 22.89% et 20.31%, respectivement. Les concentrations moyennes été estimées de 141.17 ± 5.98 , 136.59 ± 1.74 et 108.62 ± 3.51 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au niveau du foie, des reins et du muscle, respectivement (tableau IX).

Tableau IX: Concentrations résiduelles moyennes de Colistine ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Echantillons examinés	Nombre d'échantillons	Echantillons positive		Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		Nombre	Pourcentage	Moyenne	SEM	
Foie	106	31	29.24%	141.17	5.98	150
Rein	83	19	22.89%	136.59	1.74	200
Muscle	64	13	20.31%	108.62	3.51	150

L'ampicilline a été détectée dans 17, 9 et 5 échantillons de foie, de reins et de muscle, respectivement, ce qui représente un pourcentage de 19.10%, 13.43% et 9.61%, respectivement, avec des concentrations résiduelles de 73.14 ± 0.59 , 68.54 ± 1.42 et $63.09 \pm 0.77 \mu\text{g}/\text{kg}$ au niveau du foie, des reins et du muscle pectoral, respectivement (tableau X).

Tableau X : Concentrations résiduelles moyennes d'Ampicilline ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Echantillons examinés	Nombre d'échantillons	Echantillons positive		Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		Nombre	Pourcentage	Moyenne	SEM	
Foie	89	17	19.1%	73.14	0.59	50
Rein	67	9	13.43%	68.54	1.42	50
Muscle	52	5	9.61%	63.09	0.77	50

Aussi nous remarquons que les concentrations résiduelles d'oxytétracycline et d'amicilline dépassent les limites maximales de résidus (LMR) fixées par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Ces échantillons pourraient ainsi être déclarés comme non-consommables et potentiellement dangereux pour la santé du consommateur. Par contre, les concentrations moyennes de colistine étaient inférieures aux LMR fixées par l'OMS, révélant ainsi que ces échantillons ne représentent aucun risque pour la santé du consommateur.

Par ailleurs, l'analyse statistique des résultats obtenus a révélée que les concentrations résiduelles moyennes d'oxytétracycline, de colistine et d'amicilline étaient significativement plus élevées au niveau du foie ($p \leq 0.05$). Ces résultats sont représentés dans la *figure 27*.

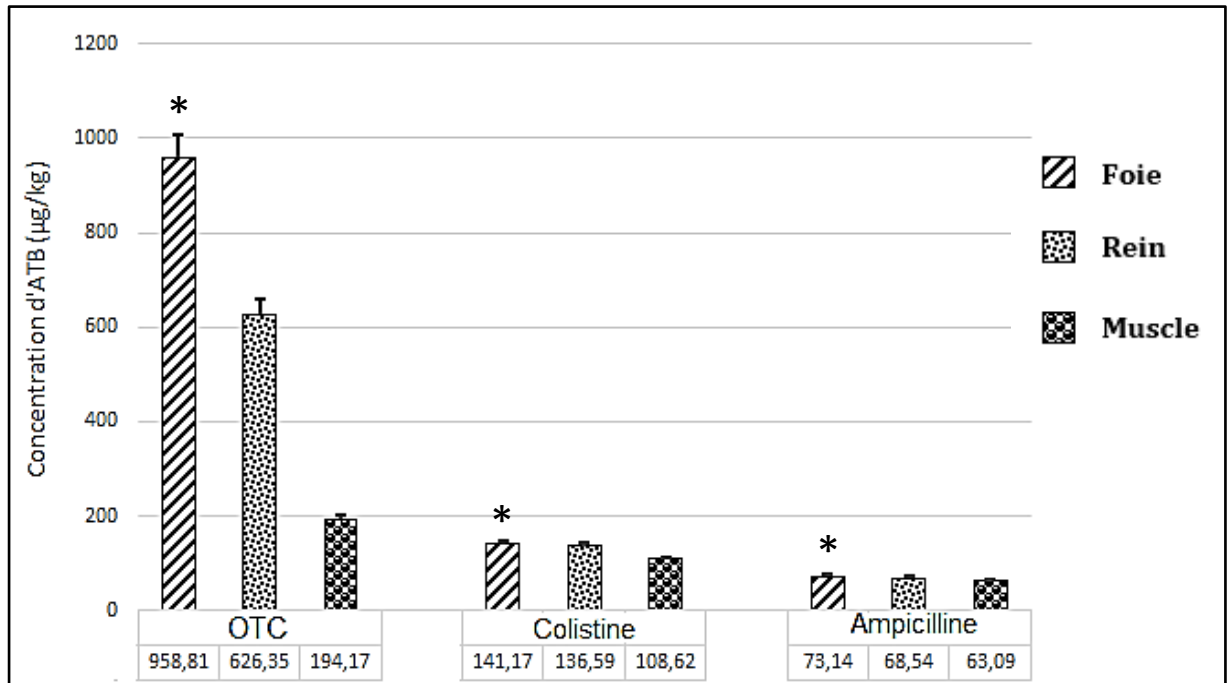


Fig. 27. Concentrations moyennes des résidus d'antibiotiques au niveau du foie, du rein et du muscle pectoral chez le poulet de chair (moyenne \pm SEM en $\mu\text{g}/\text{kg}$) (* $p \leq 0.05$)

I.3- Effet du traitement thermique et de la congélation sur les résidus d'antibiotiques

- Ébullition :

Après l'ébullition à 100 °C pendant 30 minutes des échantillons confirmés positifs par l'analyse chromatographique, il s'est révélé que la concentration d'oxytétracycline diminue significativement avec un pourcentage de 73.94%, 48.44% et 76.96% au niveau des échantillons de foie, de rein et de muscle pectoral, respectivement. D'une concentration de 958.81 ± 4.9 à $249.78 \pm 3.91 \mu\text{g}/\text{kg}$, de 626.35 ± 7.94 à $322.89 \pm 1.82 \mu\text{g}/\text{kg}$ et de 194.17 ± 0.61 à $44.72 \pm 1.13 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement. Aussi, nous remarquons que l'ébullition a permis de diminuer la concentration des résidus d'oxytétracycline en dessous des LMR recommandées par l'OMS.

Les concentrations résiduelles de Colistine ont diminuée significativement avec un pourcentage de 61.13%, 72.34% et 53.69% au niveau des échantillons de foie, de rein et de muscle pectoral, respectivement. D'une concentration de 141.17 ± 5.98 à $53.09 \pm 5.94 \mu\text{g}/\text{kg}$, de 136.59 ± 1.74 à $39.04 \pm 2.52 \mu\text{g}/\text{kg}$ et de 108.62 ± 3.51 à $50.30 \pm 0.96 \mu\text{g}/\text{kg}$ pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement.

Aussi l'ébullition a induit une diminution significative du niveau résiduel d'ampicilline avec un pourcentage de 36.8%, 39.65% et 40.53% au niveau des échantillons de foie, de rein et de muscle pectoral, respectivement. D'une concentration de 73.14 ± 0.59 à 46.23 ± 0.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$, de 68.54 ± 1.42 à 41.37 ± 1.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et de 63.09 ± 0.77 à 37.52 ± 1.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les échantillons de foie, de rein et de muscle pectoral, respectivement. Aussi, nous remarquons que l'ébullition a permis de diminuer la concentration des résidus d'Ampicilline en dessous des LMR recommandées par l'OMS.

Ces résultats sont démontrés dans la *figure 28*.

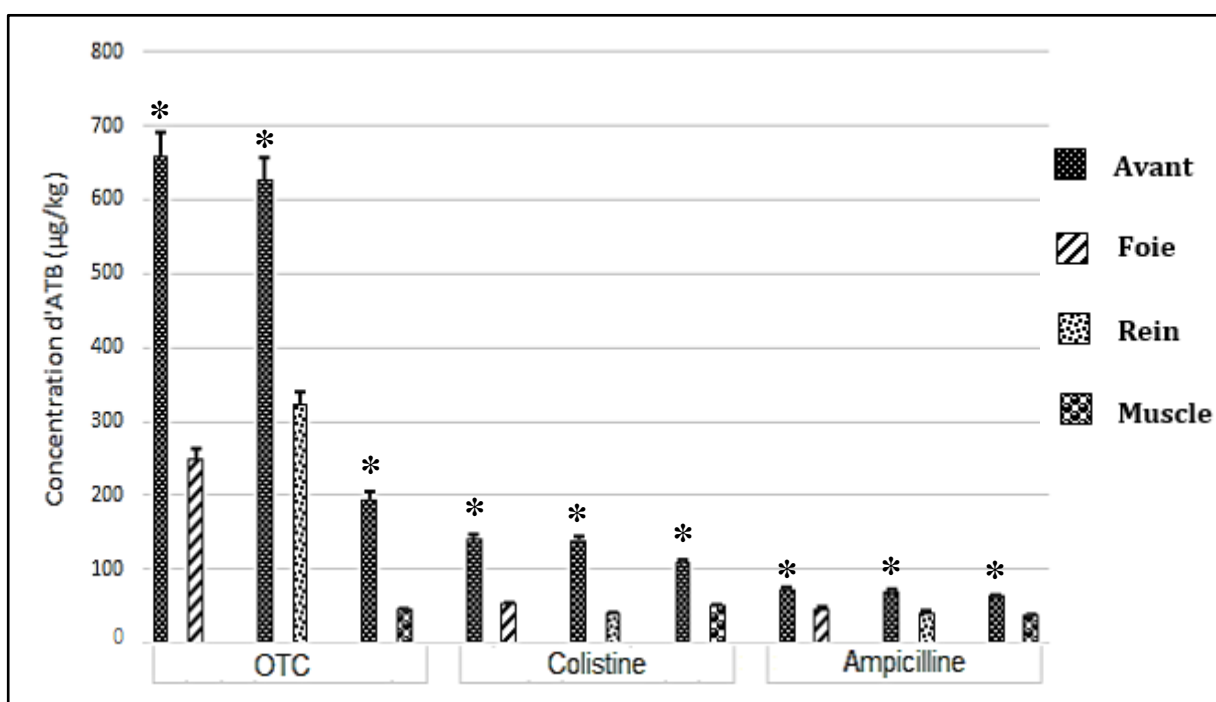


Fig. 28. Effet de l'ébullition à 100 °C pendant 30 minutes sur la concentration des résidus d'ATB (moyenne \pm SEM en $\mu\text{g}/\text{kg}$) (* $p \leq 0.05$)

- Friture :

Après avoir frits les échantillons dans l'huile de graines de coton préchauffée à 200 °C, il a été démontré que la concentration d'oxytétracycline diminuait très significativement avec un pourcentage de 83.2%, 95.17% et 77.43% pour les échantillons de foie, de rein et de muscle respectivement, d'une concentration de 958.81 ± 4.9 à 161.03 ± 1.49 , de 626.35 ± 7.94 à 30.02 ± 1.49 et de 194.17 ± 0.61 à 43.82 ± 1.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement. Nous remarquons également que la friture a permis de diminuer la concentration d'OTC en dessous des LMR recommandées par l'OMS.

Les concentrations résiduelles de Colistine ont diminuées très significativement avec un pourcentage de 78.46%, 85.3% et 77.97% pour les échantillons de foie, de rein et de muscle respectivement. D'une concentration de 141.17 ± 5.98 à 29.42 ± 3.19 , de 136.59 ± 1.74 à 20.75 ± 1.96 et de 108.62 ± 3.51 à 23.92 ± 0.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement.

Les concentrations moyennes d'Ampicilline ont diminuées très significativement avec un pourcentage de 84.47%, 74.72% et 65.89% pour les échantillons de foie, de rein et de muscle respectivement, d'une concentration de 73.14 ± 0.59 à 11.36 ± 0.97 , de 68.54 ± 1.42 à 17.33 ± 0.21 et de 63.09 ± 0.77 à 21.52 ± 0.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement. Nous remarquons également que la friture a permis de diminuer la concentration d'Ampicilline en dessous des LMR recommandées par l'OMS.

Ces résultats sont démontrés dans la *figure 29*.

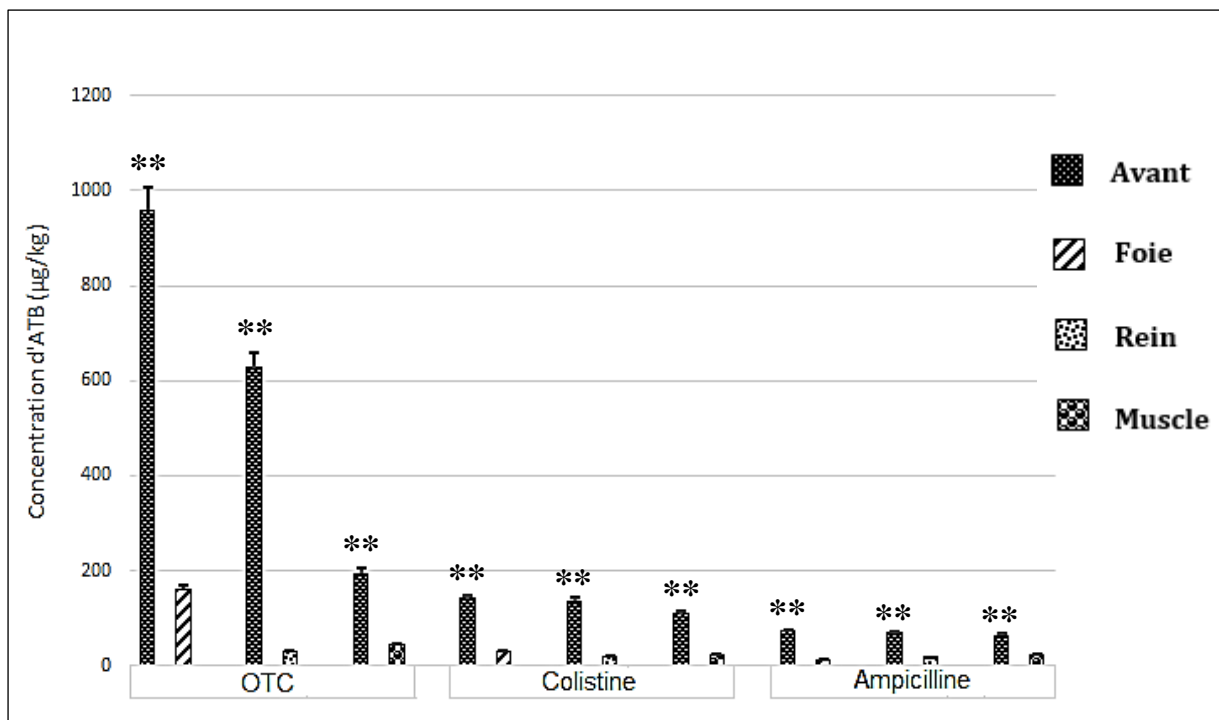


Fig. 29. Effet de la friture à 200 °C pendant 10 minutes sur la concentration des résidus d'ATB (moyenne \pm SEM en $\mu\text{g}/\text{kg}$) ($p \leq 0.01$)**

- **Congélation :**

Après congélation des échantillons à -20 °C pour une durée d'un mois, il a été démontré que la concentration moyenne des résidus d'oxytétracycline diminue significativement avec un pourcentage de réduction de 49.22%, 71.96% et de 58.78% pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement. Avec une contraction de 958.81 ± 4.9 à 486.79 ± 3.15 , de 626.35 ± 7.94 à 175.59 ± 3.11 et de 194.17 ± 0.61 à 80.03 ± 1.31 µg/kg pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement.

Ceci dit, la congélation n'a pas permis de diminuer la concentration des résidus d'oxytétracycline en dessous des LMR recommandées par l'OMS pour les échantillons de foie.

La concentration résiduelle de Colistine a diminuée significativement avec un pourcentage de réduction de 62.09%, 47.51% et de 73.29% pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement, d'une concentration résiduelle de 141.17 ± 5.98 à 51.78 ± 1.34 , de 136.59 ± 1.74 à 74.10 ± 0.96 et de 108.62 ± 3.51 à 29.01 ± 1.22 µg/kg pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement.

La concentration moyenne des résidus d'Ampicilline a diminuée significativement avec un pourcentage de réduction de 62.52%, 53.29% et de 52.68% pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement, d'une concentration de 73.14 ± 0.59 à 27.42 ± 0.52 , de 68.54 ± 1.42 à 32.02 ± 0.45 et de 63.09 ± 0.77 à 29.86 ± 0.93 µg/kg pour les échantillons de foie, de rein et de muscle, respectivement. Ainsi, la congélation a permis de diminuer la concentration des résidus d'Ampicilline en dessous des LMR recommandées par l'OMS pour les trois matrices.

Ces résultats sont démontrés dans la *figure 30*.

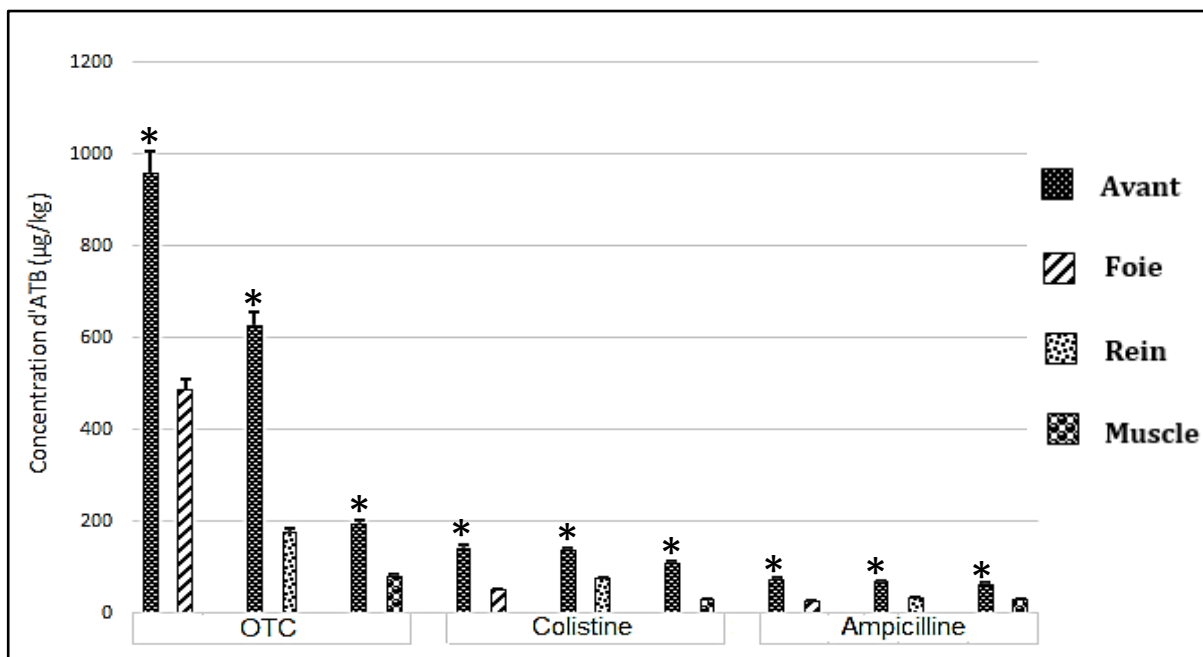


Fig. 30. Effet de la congélation à -20 °C durant un mois sur la concentration des résidus d'ATB (moyenne ± SEM en µg/kg) (*p ≤ 0.05)

II-Discussion

L'élevage intensif de la volaille, motivé par la forte demande qu'il ne cesse de connaître, a eu pour conséquence une augmentation considérable, voir abusive de l'utilisation des antibiotiques vétérinaires. Le consommateur se trouve ainsi exposé à des résidus d'antibiotiques pouvant avoir un effet néfaste sur sa santé.

Notre étude a été portée sur un effectif de 200 poulets de chair. Le besoin d'un maximum de précision pour cette étude a contribué à ce choix. Ainsi l'intervalle de confiance peut se situer autour de 95% avec une précision de 10%. Ceci est donc favorable à une étude statistique.

Le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les échantillons à analyser a été réalisé par un test d'inhibition microbiologique. Ceci afin de sélectionner les échantillons contenant des résidus à activité antimicrobienne et devant faire l'objet d'une étude plus approfondie par chromatographie liquide à haute performance avec détection aux rayons UV.

Le test d'inhibition microbiologique consistait en l'inhibition de la croissance des souches pures *Bacillus Cereus*, *Bacillus Subtilis* et *Micrococcus luteus*. Le pH du milieu de culture est un facteur important qui influe sur la perméabilité des bactéries aux antibiotiques, la stabilité et l'activité des enzymes qui inactivent les antibiotiques tels que la pénicillinase sécrétée par la bactérie *Bacillus Subtilis* et dont l'activité peut être augmentée à un pH bas.

La répétabilité et la reproductibilité des tests de validation de la méthode ont révélés des valeurs acceptables. Les pourcentages de recouvrement indiquaient que des concentrations maximales de standards purs ont été prélevées. Les valeurs de LOD et LOQ indiquaient que la méthode était sensitive. Ainsi la méthode employée était suffisamment spécifique et sensible pour la détermination des résidus d'antibiotiques dans les produits à analyser.

Les antibiotiques analysés et déterminés au cours de cette étude sont : l'oxytétracycline, la colistine et l'ampicilline.

Les résultats obtenus au cours de notre étude ont démontré que les proportions d'oxytétracycline détectées étaient supérieures aux proportions d'ampicilline suivie par la colistine. Confirmant ainsi le fait que l'oxytétracycline est plus utilisée que l'ampicilline et la colistine dans cette région (Ain Touta, Batna).

La présence d'antimicrobiens dans les échantillons analysés indique que ces poulets ont souvent été exposés à ces médicaments vétérinaires des semaines, voire des jours, avant d'être conduits dans les établissements de distribution municipaux, et qu'il existe un manque de vigilance concernant les délais d'attente des médicaments avant l'abattage des animaux.

Ainsi que la distribution d'une gamme variée de médicaments vétérinaires utilisés à toutes les occasions, sans diagnostic précis de la maladie, ce qui est d'autant plus néfaste qu'il entraîne des coûts de traitement prohibitifs, mais aussi des problèmes d'antibiorésistance.

Aussi, les résultats obtenus au cours de ce travail ont révélé que les résidus d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline ont été détectés à une concentration significativement plus élevée au niveau du foie. Tout en sachant que les concentrations résiduelles détectées d'oxytétracycline et d'ampicilline étaient supérieures aux LMR recommandées par l'OMS. Confirmant ainsi une mauvaise utilisation généralisée des antibiotiques dans les fermes et le manque d'application du délai de d'attente recommandé.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par *Sattar & al. (2014)*, *Olatoye & Basiru (2013)* et *Cheong & al. (2010)* qui ont signalé que la plus forte concentration des résidus d'antibiotiques était présente dans le foie, ils ont en conclu que cela pouvait être attribué au fait que le foie est responsable du métabolisme et de la désintoxication des médicaments par les enzymes microsomaux.

En effet, le foie est le site de métabolisation d'oxytétracycline, d'ampicilline et de colistine. Ceci pourrait être un facteur de persistance des molécules au niveau de cet organe. De plus certains médicaments subissent un cycle entérohépatique qui ralentit leur élimination. Ce niveau résiduel pourrait diminuer en augmentant le délai d'attente avant l'abattage jusqu'à atteindre environ trois semaines.

D'autre part, la concentration d'oxytétracycline, d'ampicilline et de colistine au niveau des échantillons de rein était plus élevée que sa concentration au niveau des muscles. Des résultats similaires ont été rapportés par *Villa & al. (2001)* et *Morshdy & al. (2014)* qui ont déclaré que des concentrations élevées d'oxytétracycline ont été enregistrées dans les échantillons de reins.

La concentration moyenne des résidus d'oxytétracycline et d'ampicilline détectée au niveau du foie, des reins et des muscles chez le poulet de chair par HPLC étaient supérieures aux LMR recommandés par l'OMS. Bien que les doses quotidiennes reçues par ces poulets étaient inférieures à la dose journalière admissible d'oxytétracycline et d'ampicilline.

Ceci démontre que l'exposition à long terme, même à des niveaux inférieurs aux DJA, prédispose le consommateur à la persistance des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par *Salehzadeh & al. (2006)* qui ont indiqué que les concentrations résiduelles d'antibactériens dans la viande de poulet pouvaient constituer une menace potentiellement grave pour la santé des consommateurs.

En effet l'exposition de la microflore intestinale à des résidus antimicrobiens pourrait contribuer à la colonisation de l'intestin par des souches bactériennes résistantes, compromettant la thérapie antimicrobienne chez l'homme en exerçant une pression de sélection sur la microflore intestinale, favorisant ainsi la croissance de micro-organismes antibio-résistants.

De plus les pénicillines qui connaissent une large utilisation en thérapeutique humaine sont le plus souvent incriminées pour favoriser les manifestations allergiques constatées dans les hôpitaux. Il faudrait donc limiter leur utilisation en médecine vétérinaire, si non, respecter les délais d'attente avant la consommation de viande ou de produits provenant d'animaux traités.

Basyoni & Barr (2009) ont déclaré que les causes les plus courantes de la présence des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale sont le non-respect du délai d'attente, le surdosage d'antibiotiques et l'utilisation incontrôlée et anarchique des antibiotiques comme facteurs de croissance ou pour la prophylaxie.

Ces différentes menaces représentent des préoccupations majeures dans l'emploi des antibiotiques qui sont une arme indispensable pour la lutte contre les infections humaine et animale.

Par ailleurs, les concentrations résiduelles moyennes de colistine étaient inférieures aux LMR recommandées par l'OMS. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Nguyen & al. (2016)** qui ont signalé que la colistine était largement utilisée dans les aliments pour animaux comme facteur de croissance, et principalement en aviculture, mais qui ont enregistré des niveaux appropriés de colistine chez le poulet de chair.

Cependant, suite à la confirmation de la présence d'*Escherichia coli* résistante à la colistine portant le gène *mcr-1*, l'OMS recommande en 2016 une restriction complète de l'utilisation de la colistine en tant que promoteurs de croissance et à titre préventif en l'absence de diagnostic.

Les *E. coli* résistants aux médicaments s'acquièrent facilement par la consommation d'aliments contaminés, par l'eau potable ou par le contact direct avec une personne malade ou des animaux porteurs de la bactérie. Ceci est d'une préoccupation majeure du fait que la colistine est l'un des antibiotiques indispensables en tant que traitements de dernier ressort contre les infections multirésistantes chez l'homme.

Une étude réalisée au Vietnam a montré une résistance croissante chez *Escherichia coli* commensal associée à l'utilisation intensive de la colistine dans les industries du bétail et de la volaille.

Le gène *mcr-1* est un nouveau déterminant de résistance transférable à médiation plasmidique, codant pour une phospho-éthanol-amine transférase qui est une enzyme qui permet l'addition de phospho-éthanol-amine au lipide A, présent dans la paroi de la bactérie et sur lequel se fixe la polymyxine B. ce gène est capable de se déplacer d'une bactérie à l'autre, propageant la résistance aux antibiotiques parmi les espèces bactériennes.

Ce gène a été décrit en **2015** par *Liu et al.* pour la première fois. La plupart des souches d'E. Coli ne causent pas de maladie, mais les souches virulentes peuvent provoquer une gastro-entérite, des infections des voies urinaires et une méningite néonatale.

D'autre part, la confirmation de la présence de plusieurs résidus d'antibiotiques différents dans les produits analysés, constitue une menace importante pour la santé du consommateur. Des résultats similaires ont été rapportés par *Tavakoli et al., (2015)* qui ont rapportés la présence de résidus de quatre antibiotiques différents chez le poulet de chair, dont l'oxytétracycline, le chloramphénicol, l'enrofloxacin et la pénicilline.

Les aliments contaminés peuvent avoir une apparence et un odorat normal, il est donc important de veiller à ce que la viande soit bien cuite afin de détruire les bactéries. Du fait, la plupart des aliments d'origine animale sont cuits avant consommation afin d'augmenter la digestibilité, l'attribut appétissant et la durée de conservation. Ces dernières années plusieurs études ont été entamées afin d'évaluer l'impact du traitement thermique sur la persistance des résidus d'antibiotiques.

Suite à la détermination des résidus d'antibiotiques dans les échantillons analysés, nous avons testé l'effet du traitement thermique sur la persistance de ces résidus par ébullition, friture et congélation des produits analysés. Les données obtenues au cours de notre travail, ont démontré que l'ébullition des échantillons positive à une température de 100 °C pendant 30 minutes ainsi que leur congélation à -20 °C, induisent une diminution significative du taux de résidus d'oxytétracycline, d'ampicilline et de colistine.

Aussi il a été observé que la friture de ces échantillons à 200 °C pendant 10 minutes dans l'huile végétale provoquait une diminution très significative de ces résidus antimicrobiens.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par *Nashwa (2012)* ; *Kühne et al. (2001)* et *Javedi (2011)* qui ont rapporté que l'ébullition diminuait significativement les niveaux résiduels d'oxytétracycline dans la viande de dindon. Ainsi la chaleur pourrait avoir un effet destructeur sur la structure cyclique des tétracyclines.

Elkahky & Allam (2005) ont révélés que la friture avait un effet destructeur sur les résidus d'antibiotiques. *Marouf & Bazalou (2005)* ont conclu que l'effet de la chaleur directe de l'huile de friture était plus efficace que l'eau bouillante. Un chauffage plus sévère ou une cuisson prolongée avec de la chaleur humide permettrait d'inactiver les composés les plus sensibles à la chaleur.

Par contre nos résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par *Moats (1999)* et *Gehan (1991)* qui a mentionné que les procédés ordinaires de cuisson de la viande ne pouvaient pas inactiver même les composés les plus sensibles tels que la pénicilline et la tétracycline.

Une étude réalisée ultérieurement par *Gergis-Aida (1998)* sur l'effet du traitement thermique comme l'ébullition et la friture a démontré que le traitement thermique diminuait la concentration des résidus d'antibiotiques ou bien induisait une inactivation de ces dernières en fonction du degré de température et du temps d'exposition.

Par ailleurs, des études menées par *Pavlov & al. (2005)* et *Morshdy & al. (2014)* ont démontré que la congélation de viande de poulet pouvait diminuer la concentration des résidus d'antibiotiques en provoquant une dégradation partielle de ces résidus.

Ainsi, les méthodes de cuisson et de congélation induisent une destruction partielle des résidus d'antibiotiques et ne permettent pas la destruction complète des antibiotiques même les plus sensibles tels que les pénicillines.

D'autant plus, la pertinence de la sécurité alimentaire est incertaine, car la nature des produits de dégradation est inconnue dans la plupart des cas. L'identité de ces produits de dégradation devrait être établie et leur toxicité devrait être évaluée.

Par conséquent, les méthodes de cuisson ne peuvent être utilisées comme des méthodes fiables pour éliminer des résidus d'antibiotiques dans la viande de poulets de chair et le seul moyen pour mieux se protéger est de prolonger le délai d'attente.

Cependant, ce délai ne saurait être respecté par les aviculteurs qui visent à exploiter au maximum et à vendre au mieux, c'est pourquoi l'intervention de l'Etat devrait s'articuler essentiellement dans le contrôle de la vente, mais aussi dans l'utilisation des médicaments vétérinaires par ces exploitants.

Ce n'est qu'à ce prix qu'on parviendrait à minimiser les risques que peuvent faire courir les résidus de médicaments vétérinaires aux consommateurs de denrées alimentaires d'origine animale.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion et recommandations

Approximativement 80% des antibiotiques importants en médecine humaine sont consommés dans le secteur animal comme outil thérapeutique, mais en grande partie, pour favoriser la croissance chez les animaux sains.

L'utilisation excessive et inadaptée des antibiotiques chez les animaux contribue à amplifier la menace de la résistance aux antibiotiques. Certains types de bactéries responsables d'infections graves chez l'homme sont déjà devenus résistantes à la plupart des traitements disponibles et très peu d'options thérapeutiques prometteuses sont en cours de développement pour prendre le relais.

A travers cette étude expérimentale, nous avons mis en évidence la présence de résidus d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline dans les tissus comestibles chez le poulet de chair. Confirmant ainsi une mauvaise utilisation généralisée des antibiotiques au sein de ces fermes et le manque d'application du délai d'attente recommandé.

L'analyse chromatographique des échantillons a révélé que des niveaux significativement élevés de résidus d'oxytétracycline, de colistine et d'ampicilline ont été détectés au niveau des échantillons de tissus hépatique, suivi par les échantillons rénaux et musculaires.

Cette utilisation inadaptée, incontrôlée et excessive des antibiotiques chez les animaux de production contribue à amplifier la menace de la résistance aux antibiotiques. C'est le cas de plusieurs bactéries responsables d'infections graves chez l'homme et qui sont devenues résistantes à la plupart des traitements disponibles.

Les échantillons confirmés positifs par HPLC-UV ont été soumis à un traitement thermique et une congélation. Les résultats de cette analyse ont révélé que l'ébullition et la congélation des échantillons induisaient une diminution significative des concentrations résiduelles d'oxytétracycline, d'ampicilline et de colistine. D'autre part, la friture provoquait une diminution très significative de la concentration moyenne des résidus antibactériens.

Ainsi, nous pouvons confirmer que les méthodes de cuisson (ébullition et friture) et de congélation induisent une destruction partielle des résidus d'antibiotiques. Par conséquent, ces méthodes ne peuvent être utilisées comme des méthodes fiables pour éliminer les résidus d'antibiotiques et le seul moyen de se protéger est de prolonger le délai d'attente, la posologie et la durée d'utilisation prescrite.

Pour conclure cette étude on peut dire qu'il devient impératif et essentiel de réaliser des bases de données scientifiquement exploitables afin d'élaborer des réglementations et des prises de décisions visant à protéger la santé du consommateur.

Ce qui nous amène à formuler certaines recommandations afin d'éviter au maximum la présence des résidus d'antibiotiques et les dangers qu'ils présentent à savoir risque allergique, risque embryotoxique, effet mutagène ou cancérigène et l'acquisition d'antibiorésistance par les bactéries rendant difficile l'antibiothérapie humaine :

- En plus de la formation au métier d'éleveurs, il faudrait suivre des formations qui pourraient contribuer à la sensibilisation des éleveurs sur le danger des antibiotiques afin d'être amenés à ne plus les utiliser abusivement et d'en laisser la responsabilité de leur utilisation aux vétérinaires.
- Les vétérinaires prescripteurs de médicaments, sont autant responsables de cette situation. Il convient de leur recommander une plus grande rigueur à la prescription des médicaments.
- Mettre en place des plans de surveillance et de contrôle des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires d'origine animale, surveiller davantage la filière des médicaments vétérinaires et veiller à une utilisation raisonnée des antibiotiques.
- Les autorités sont entrainés d'apporter une solution au problème d'antibiorésistance, comme il serait bénéfique d'interdire la consommation du foie qui est très contaminé par les résidus médicamenteux.
- Il faudrait interdire l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance chez les animaux de production en Algérie comme il est le cas pour les pays de l'union européenne.
- il serait bénéfique de penser à l'utilisation des produits « BIO » afin de remédier à ce problème.

- Il est préférable de mettre la prescription des antibiotiques vétérinaires sous l'autorité des pharmaciens, comme il est le cas pour les antibiotiques humains. Ceci est appliqué dans certains pays Scandinaves et le résultat est plus que satisfaisant entraînant une importante réduction d'utilisation des antibiotiques, en plus du fait qu'ils représentent les pays les moins touchés par l'antibiorésistance.

L'ensemble de ces résultats obtenus ouvrent la voie de plusieurs perspectives de recherche, qui peuvent être développés comme suit : nous pourrions nous intéresser à la détermination d'antibiotiques tels que les tétracyclines, les bêta-lactamines et les sulfonamides dans une autre denrées alimentaire qui est- le lait de vache, par une technique plus spécifique et plus précise qui est la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse. Ceci nous permettra également d'évaluer les conséquences sanitaires, technologiques et économiques, que la persistance d'éventuel résidus d'antibiotiques pourrait avoir.

Annexes

Annexe 01

Anti-infectieux dont l'usage est interdit pour le traitement des animaux dont les productions sont destinées à la consommation

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

Annexe 02

Limites maximales résiduelles (LMR) des antibiotiques exprimés en µg/kg

Substances avec LMR définitives							
Substances	Espèces	Muscle	Foie	Rein	Graisse	Lait	Œuf
Benzylpenicilline	Toutes	50	50	50	50	04	
Nafcilline	Bovins	300	300	300	300	30	
Ampicilline	Toutes	50	50	50	50	04	
Amoxicilline	Toutes	50	50	50	50	04	
Oxacilline	Toutes	300	300	300	300	30	
Cloxacilline	Toutes	300	300	300	300	30	
Dicloxacilline	Toutes	300	300	300	300	30	
Cefquinone	Bovins	50	100	200	50	20	
	Porc, équidés	50	100	200	50		
Ceftiofur	Bovins	1000	2000	6000	2000	100	
	Porc	1000	2000	6000	2000		
Céfapirine	Bovins	50		100	50	60	
Céfalonium	Bovins					20	
Céfopérazone	Bovins					50	
Céfacétrile	Vache laitière					125	
Céfazoline	Bovins, ovins, caprins					50	
Streptomycine	Bovins, ovins	500	500	1000	500	200	
	Porc	500	500	1000	500		
Gentamycine	Bovins	50	200	750	50	100	
	Porc	50	200	750	50		
Néomycine	Toutes	500	500	500	500	500	500
Kanamycine	Toutes	100	600	2500	100	150	
Apramycine	Bovins	1000	1000	2000	1000		
Spectinomycine	Toutes sauf les ovins	300	1000	5000	500	200	
	Ovins	300	2000	5000	500	200	
Bacitracine	Bovins	150	150	150	150	100	
	Lapins	150	150	150	150		
Colistine	Toutes	150	150	200	150	50	300
Tétracycline	Toutes	100	300	600		100	200
Oxytétracycline	Toutes	100	300	600		100	200
Chlortétracycline	Toutes	100	300	600		100	200
Doxycycline	Bovins, porc, volaille	100	300	600	300		
Substances avec LMR définitives							
Substances	Espèces	Muscle	Foie	Rein	Graisse	Lait	Œuf
Florfénicol	Bovins, ovins, caprins	200	3000	300	500		
	Porc	300	2000	500	200		
	Poulet	100	2500	750			
	Poissons	1000			200		

	Toutes les autres espèces	100	2000	300			
Thiamphénicol	Bovins, poulet	50	50	50	50		
Erythromycine	Bovins	200	200	200	200	40	
	Ovins	200	200	200	200		
	Poulet	200	200	200	200		150
Spiramycine	Bovins	200	300	300	300	200	
	Porc	250	2000	1000			
	Poulet	200	400				
Tylosine	Bovins	100	100	100	100	50	
	Proc	100	100	100	100		
	Volaille	100	100	100	100		200
Tilmicosine	Bovins, ovins	50	1000	1000	50	50	
	Porc, lapin	50	1000	1000	50		
	Poulet	75	1000	250	75		
Tulathromycine	Bovins, porcins		3000	3000	100		
Lincomycine	Toutes	100	500	1500	50	150	50
Tiamuline	Porc	100	500		100		1000
	Poulet	100	1000		100		
	Dinde	100	300				
Valnémuline	Porc	50	500	100			
Sulfamides	Toutes	100	100	100	100	100	
Baquiloprime	Bovins		300	150	10	30	
	Porc		50	50	40		
Triméthoprim	Bovins	50	50	50	50	50	
	Porc, volailles	50	50	50	50		
	Poissons	50					
	Equins	100	100	100	100		
Acide oxolinique	Porc, poulet	100	150	150	50		
	Poissons	100	500	1500	300		
Fluméquine	Bovins	200	500	1500	300	50	
	Ovins, porc	200	800	1000	250		
	Poulet, dinde	400					
	Salmonidés	600					
Enrofloxacin	Bovins	100	300	200	100	100	
	Ovins, porc, lapin, volaille	100	300	200	100		
Sarafloxacin	Poulet		100		10		
	Salmonidés	30					
Danofloxacin	Bovins	200	400	400	100	30	
	Porc	100	200	200	50		
	Poulet	200	400	400	100		
Difloxacin	Bovins	400	1400	800	100		
	Porc	400	800	800	100		
	Poulet, dinde	300	1900	600	400		
Marbofloxacin	Bovins	150	150	150	50	75	
	Porc	150	150	150	50		
Novobiocine	Bovins					50	
Rifaximine	Bovins					60	

Substances non soumises aux LMR								
Substance	Espèces	Tissu				Conditions d'emploi		
Céfacétrile	Bovins	Tout sauf le lait				Voie intra-mammaire seulement		
Céfalonium	Bovins	Tout sauf le lait				Voie intra-mammaire seulement		
Céfazoline	Bovins, ovins, caprins	Tout sauf le lait				Voie intra-mammaire seulement		
Céfomperazone	Bovins	Tout sauf le lait				Voie intra-mammaire seulement		
Apramycine	Bovins, porc, lapin et poulet	Tout sauf le lait et œufs				Voie orale seulement, interdiction d'emploi chez les femelles laitières et les poules pondeuses		
Bacitracine	Bovins	Tout sauf le lait				Voie intra-mammaire seulement		
Novobiocine	Bovins	Tout sauf le lait				Voie intra-mammaire seulement		
Rifaximine	Toutes	Tout sauf le lait				Voie intra-mammaire seulement		
Substances avec LMR provisoires								
Substance	Espèces	Muscles	Foie	Rein	Graisse	Lait	Œufs	Date
Acide oxolinique	Bovins	100	150	150	50			01-01-2006
Substances avec LMR impossibles à fixer								
Substances	Chloramphénicol, ntrofuranes, nitroimidazoles							

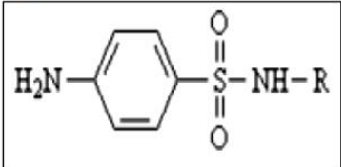
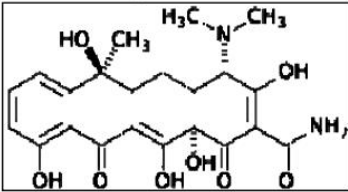
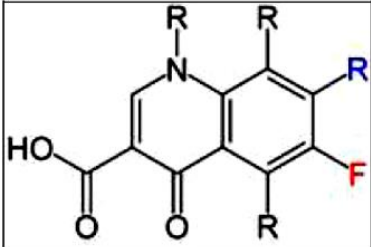
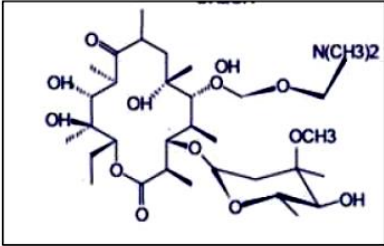
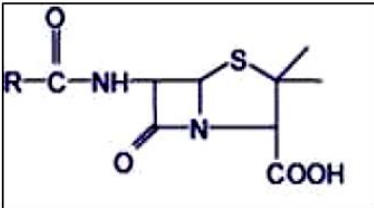
Annexe 03

Molécules d'antibiotiques utilisées en médecine humaine et vétérinaire

Famille	Sous-famille	Molécule	Utilisée chez l'homme	Utilisée chez l'animal
B-lactamines	Pénicillines	Pénicilline G	×	×
		Pénicilline V	×	
		Pénicilline M	×	×
		Pénicilline A	×	×
		Carpoxyénicilline	×	
		Uréidoénicilline	×	
	Céphalosporine	Première génération	×	×
		Deuxième génération	×	×
		Troisième génération	×	×
		Monobactames	×	
Cyclines		×	×	
Aminosides		×	×	
Macrolides		×	×	
Apparentés aux macrolides	Lincosamides		×	×
	Kétolides		×	
	Synergistines / Streptogramines		×	
Quinolones	Première génération		×	×
	Deuxième génération		×	×
Furanes			×	×
Phénicolés			×	×
Triméthoprome			×	×
Polymoxines			×	×
Sulfamides			×	×
Glycopeptides			×	
Imidazolés			×	×
Antituberculeux			×	×
Divers		Acides fusidique	×	×
		Bacitracine	×	×
		Clofazimine	×	
		Dapsone	×	
		Fospomycine	×	
		Fumagilline	×	
		Mupirocine	×	
	Oxazolidinones	Linézolide	×	
	Thyroricine	×	×	

Annexe 04

Les principales familles d'antibiotiques

Familles	Structures	Mode d'action	Spectre
Sulfamides	Des dérivés synthétiques de l'acide sulfonique : para-amino-phényl sulfonamides 	Inhibition de l'enzyme bactérienne chargée de transformer l'acide folique en THF.	Large spectre d'action : bactéries à Gram (+) et Gram (-).
Tétracyclines	Des antibiotiques bactériostatiques 	Inhibition de la croissance et la multiplication des bactéries pathogènes.	Large spectre d'activité : bactéries à Gram (+), Gram (-), aérobies, anaérobies
Quinolones	Des antibiotiques de synthèse 	Inhibition de la synthèse de l'ADN.	Large spectre d'action : bactéries à Gram (+) et Gram (-).
Macrolides	Des antibiotiques bactériostatiques 	Action sur la synthèse des protéines.	Large spectre d'action : bactéries à Gram (+).
Bêta lactamines	Des antibiotiques bactériostatiques 	Action sur l'enveloppe cellulaire.	Large spectre d'action : bactéries à Gram (+).

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- 1-Alemayehu T. & Serawit D., 2015.** Overview on Mechanisms of Antibacterial Resistance. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, **2** (1): 27-36.
- 2-Alloui N., 2011.** Situation actuelle et perspectives de modernisation de la filière avicole en Algérie. *J. la Rech. Avic. Algérienne*.
- 3-Aminov R.I., 2010.** A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*, **134** (1): 1-7.
- 4-Azim M.S., Mitra M. & Bhasin P.S., 2013.** HPLC method development and validation. *Int. Res. J. Pharm.*, **4** (4): 39-46.
- 5-Basyoni S.R. & Barr A.A.H., 2009.** Determination of some antibiotics and sulphonamide residues in meat and liver of rabbit carcasses. *Zagazig veterinary journal*, **37** (1): 178-184.
- 6-Beaumont C., Le bilan-duvall E., Juin J. & Magdelaine P., 2004.** Productivité et qualité du poulet de chair. *Inra. Prod. Anim.*, **17** (4) : 265-273.
- 7-Behl A., Ahuja M. & Dhake A.S., 2005.** Reverse phase high performance liquid chromatography method for quantification of ofloxacin tablets. *Indian Journal Pharm. Sci.*, **7**: 479-485.
- 8-Beloum A., 2000.** Etude de l'évolution des paramètres technico-économiques de la production avicole en Algérie cas poulet de chair. Mémoire d'ingénieur INESA : Université de Batna. 63p.
- 9-Bergogne-Bérézin E., 2006.** Antibiothérapie des infections urinaires basses : bases cliniques, microbiologiques et pharmacologiques. *Antibiotiques*, **8** (1): 51-62.
- 10-Bernard A., 2003.** Nitrofurans residues in Belovo egg products: evaluation of the health risks for the consumer. *Rapport d'expert*, Université Catholique de Louvain (Belgique), 3p.
- 11-Bhattacharjee M., 2016.** Chemistry of antibiotics and related drugs. Edition: 1, Chapter: 1, Publisher: Springer International Publishing, pp. XII, 219.
- 12-Bonjar G.S., 2014.** Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of Escherichia coli. *Asian Journal of Plant Sciences*, **3**: 310-314.
- 13-Boudouma D. & Tefiel H., 2012.** « Performances du poulet de chair acclimaté et élevé en conditions chaudes dans le Nord de l'Algérie ». *Livestock Research for Rural Development*. **24** (5) : 1-6.
- 14-Brouillet P., 1994.** Maîtrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait. *Recueil de médecine vétérinaire*, **170** : 443-454.

- 15-Cambau E. & Guillard T., 2012.** Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **31** (1) : 65-76.
- 16-Chataigner B. & Stevens A., 2005.** Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar.
- 17-Chataigner B., 2004.** Etude de la qualité sanitaire des viandes bovines et ovines à Dakar (Sénégal) : Contamination par des résidus d'antibiotiques. Thèse de Doctorat vétérinaire : Université de Toulouse. n°4019, 103p.
- 18-Cheong C.K., Hajeb P., Jinap S. & Fitry M.R., 2010.** Sulfonamides determination in chicken meat products from Malaysia. *International Food Research Journal*, **17**: 885-892.
- 19-CNIS (Centre National de l'Informatiques et des Statistiques, 2011.** Importations des intrants avicoles. Série statistiques du commerce extérieur, Alger, Algérie.
- 20-Corpet D-E., 2000.** Mécanismes de la promotion de croissance des animaux par les additifs alimentaires antibiotiques. *Revue Méd. Vét.*, **151** (2) : 99-104.
- 21-Davies J., 2010.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**: 417-433.
- 22-Delepine B., Hurtaud-Pessel D. & Sanders P., 2002.** Les méthodes récentes d'analyse physico-chimique des résidus d'antibiotiques dans le lait. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, **15** : 191-196.
- 23-Dockrell H.M., Goering R.V., Roitt I., Wakelin D. & Zuckerman M., 2004.** Attacking the enemy: Antimicrobial agents and chemotherapy. Editors. Medical Microbiology, Chapter: 2, Publisher: Elsevier Mosby, pp. 473-507.
- 24-Dolliver H., Kumar K., Gupta S. & Singh A., 2008.** Application of enzyme-linked immunosorbent assay analysis for determination of monensin in environmental samples. *Journal of Environmental Quality*, **37**: 1220-1226.
- 25-Doufour B., 2006.** Tests de dépistage et de diagnostic, caractéristiques, valeurs prédictives et applications pratiques. *Bulletin des GTV*. **35** : 71-76.
- 26-Dougherty T.J. & Pucci M.J., 2012.** Antibiotic Discovery and Development. Edition: 1, Chapter: 22, Publisher: Springer US, pp. XVII, 1127.
- 27-Dupraz P., 2004.** Interdiction des promoteurs de croissance antibiotiques et commerce international. *Journées Recherche Porcine*, **36** : 151-158.
- 28-Edoh V., Agnimela M. & Boka B., 2001.** Etat de résistance de *S. aureus* au CHU de Treicheville Abidjan : Etude sur 387 souches hospitalières isolées de Janvier à Décembre 1998. *Le pharmacien d'Afrique*, **152** : 15-19.

- 29-El-Kahky M.A.A. & Allam T.H., 2005.** Detection of some antibiotic residues in camel's meat products. *J. of Egy. Vet. Med. Assoc.*, **65** (5): 203-209.
- 30-Fabre J.M., Gardey L., Lherbette L., De Boisseson M., Berthelot X., 2000.** Détection des résidus de céfalexine dans le lait en cas d'allongement de la durée du traitement par voie intramammaire. *Revue de médecine vétérinaire*, **151** : 965-968.
- 31-Ferrah A., 2004.** Les systèmes d'élevage en Algérie cas des petits élevages, OFAAL. 30p.
- 32-Gehan R.M., 1991.** Studies on the withdrawal time of some antibiotics from broilers and rabbits. M.V.Sc. Thesis Fac. Vet. Med. Zagazig University, Moshtohor Branch.
- 33-Gergis-Aida F., 1998.** Tetracycline residues in broiler carcasses. *Beni-Suef Vet. Med. Res.*, **3**: 159-172.
- 34-Gourmelen C., Royer E. & Salaun Y., 2001.** Impact d'une restriction de l'usage des facteurs de croissance antibiotiques sur le coût de la production de porc. *Journées de la Recherche Porcine en France*, **33** : 291-298.
- 35-Gupta V., Jain A.D.K., Gill N.S. & Gupta K., 2012.** Development and validation of HPLC method. *Int. Res. J. Pharm. App Sci.*, **2** (4) : 17-25.
- 36-Gysi M., 2006.** Antibiotiques utilisés en production laitière en 2003 et 2004. *Suisse Agric.* **38** (4) : 215-220.
- 37-Hakem A., Titouche Y., Houali K., Yabrir B., Malki O. & Chenouf N., 2013.** Screening of antibiotics residues in poultry meat by microbiological methods. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, **70** (1): 77-82.
- 38-Haouichat H., Guénard L., Bourgeois S., Pauli G. & De Blay F., 2002.** Les tests cutanés dans l'exploration de l'allergie à la pénicilline. *Revue Française d'allergologie*, **42** (8) : 779-792.
- 39-Hasani A., Kariminik A. & Issazadeh K., 2014.** Characteristics of Antimicrobial Activities. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.*, **2** (1): 63-75.
- 40-Helmy E.T. & Gomaa E.A., 2015.** Conductometric, spectrophotometric and *in vivo* investigation of the interaction of Ca (II) Ion with Oxytétracycline Hydrochloride. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, **4**(3): 197-203.
- 41-Hsieh M-K., Shyu C-L., Liao J-W., Franje C-A., Huang Y-J., Chang S-K., Shih P-Y. & Chou C-C., 2011.** Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity. *Vet. Med.*, **56** (6): 274–285.
- 42-Javedi A., 2011.** Effect of roasting, boiling and microwaving cooking method on Doxycycline residues in edible meats of poultry by microbial method. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol.*, **5** (8): 1034-1037.

- 43-Jehl F., 2003.** Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides. *Antibiotiques*, **5** (2) : 89-98.
- 44-Jeon M., Kim J., Paeng K-J., Park S-W. & Paengi R., 2008.** Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. *Microchemical Journal.*, **88** (1) : 26-31.
- 45-Jumaa S. & Karaman R., 2015.** Antibiotics. Edition: 1, Chapter: 2, Publisher: Nova Science Publishers, pp. 41-73.
- 46-Kaci A., 2015.** La filière avicole algérienne à l'ère de la libération économique. *Cah. Agric.*, **24** (03) : 151-160.
- 47-Kaci A. & Cheriet F., 2013.** « Analyse de la compétitivité de la filière de viande de volailles en Algérie : tentatives d'explication d'une déstructuration chronique ». *New Medit*, **2** : 11-21.
- 48-Kapoor G. Saigal S. & Elongavan A., 2017.** Action and resistance mechanisms of antibiotics : A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, **33** (3): 300-305.
- 49-Kempf I., Fleury M.A., Drider D., Bruneau M., Sanders P., Chauvin C., Madec J.Y & Jouy E., 2013.** What do we know about resistance to colistine in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **42**(5): 379-383.
- 50-Kentarchos N-E., 2006.** Pharmacocinétique et pharmacodynamie des antibiotiques dans le poumon. *Antibiotiques*, **8** (4) : 232-241.
- 51-Khattab W.O., Elderea H.B., Salem E.G. & Gomaa N.F., 2010.** Transmission of Administered Amoxicillin Drug Residues from Laying Chicken to their Commercial Eggs. *Egypt Public Health Assoc.*, **85** (5-6): 297-316.
- 52-Kirbiš A., 2007.** Microbiological screening method for detection of aminoglycosides, β -lactames, macrolides, tetracyclines and quinolones in meat samples. *Slov. Vet. Res.*, **44** (1/2): 8-11.
- 53-Koivunen M.E., Dettmer K., Vermeulen R., Bakke B., Gee S.J. & Hammock B.D., 2006.** Improved methods for urinary atrazine mercapturate analysis- Assesment of an enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and a novel liquid chromatography- mass spectrometry (LC-MS) method utilizing online solid phase extraction (SPE). *Analytica Chimica Acta*, **572**: 180-189.
- 54-Kühne M., Komer U. & Wenzel S., 2001.** Tetracycline residues in meat and bone meals. Part 2: the effects of heat treatments on bound tetracycline residues. *Food Addit. Contam.*, **18** (7): 593-600.

- 55-Laurentie M. & Sanders P., 2002.** Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, **15** (3) : 197-201.
- 56-Lee H.J., Lee M.H. & Ruy P.D., 2001.** Public health risks: chemical and antibiotic residues. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **14**: 402-413.
- 57-Leitner A., Zollner P. & Lindner W., 2001.** Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, **939** (1-2): 49-58.
- 58-Levy S.B. & Marshall B., 2004.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Supplement*, **10** (12): 122-129.
- 59-Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R. & Spencer J., 2016.** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.*, **16** (2) : 161-168.
- 60-Maillard R., 2002.** Antibiothérapie respiratoire. *La Dépêche Vétérinaire*, **80** : 15-17.
- 61-Marouf H.A. & Bazalou M.S., 2005.** Detection of antibiotic residues in meat sold in Damietta governorate. *4th Int. Sci. Conf., Mansoura*, **5-6**: 509– 519.
- 62-Martin C., 2008.** Urgences et infections. Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques. Edition: 1, Chapter: 1, Publisher: Arnette. Pp. 96.
- 63-Martínez J.L., 2008.** Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, **321**: 365–367.
- 64-Mathlouthi N., Mallet S., Saulnier L., Quemener B. & Larbier M., 2002.** Effects of xylanase and b-glucanase addition on performance, nutrient digestibility, and physico-chemical conditions in the small intestine contents and caecal microflora of broiler chickens fed wheat and barley-based diet. *Anim. Res.*, **51**: 395-406.
- 65-Merad M., 2001.** Toxicité des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, **91** : 17-21.
- 66-Mezouane M., 2010.** 1^{er} Symposium des Sciences Avicoles, 9-11 Nov. Batna.
- 67-Millemann Y., 2002.** Antibiorésistances et prescription antibiotique. *La Dépêche Technique*, **80** (5) : 25-29.
- 68-Ministère de l'agriculture, 2018.** Evolution de la production des filières agricoles sur la période 2014-2017. *Radio Algérie*.
- 69-Moats W.A., 1999.** The effect of processing on veterinary residues in foods. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **459**: 233– 241.

- 70-Morin R., Uhlund C. & Lévesque G., 2005.** L'utilisation des antibiotiques en pisciculture au Québec. *Aquicole*, **9** (3) : 06.
- 71-Morshdy A.M., Hussein M.A. & El-Gohary A.E., 2014.** Studies on oxytetracycline residues depletion in rabbit meat. *Assiut Vet. Med. J.*, **60** (141): 158-166.
- 72-Myllyniemi A.L., Rannikko R., Lindfors E., Niemi A. & Backman C., 2000.** Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues. *Food Addit Contam*, **17**: 991–1000.
- 73-Myllyniemi A-L., Sipila H., Nuotio L., Niemi A. & Honkanen-Buzalski T. 2002.** An indirect conductimetric screening method for the detection of antibiotic residues in bovine kidneys. *The Analyst*, **127** (9) : 1247-1251.
- 74-Nashwa M.Z., 2012.** Seasonal variation of antibiotic residues in some slaughtered animal. Ph.D. of Vet. Med. Sciences, Dept. of food control, Zagazig University.
- 75-Nauciel C. & Vildé J-L., 2005.** Bactériologie médicale. Edition: 1, Chapter: 2, Publisher: Elsevier Masson, pp. 257.
- 76-Nguyen N.T., Nguyen H.M., Nguyen C.V., Nguyen T.V., Nguyen M.T. & Thai H.Q., 2016.** The use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and their association with resistance in commensal Escherichia coli Bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, **82** (13) : 3727–3735.
- 77-Nisha R., 2008.** Antibiotic Residues: A Global Health Hazard. *Veterinary World*, **1** (12): 375-377.
- 78-Olatoye I.L. & Basiru A., 2013.** 'Antibiotic usage and oxytetracycline residue in African catfish (*Clarias gariepinus*) in Ibadan, Nigeria'. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, **5** (3): 302–309.
- 79-Oliveira R., De Pietro A. & Cass Q., 2006.** Quantification of cephalixin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup. *Talanta*, **71**: 1233–1238.
- 80-Pavlov A., Lashev L. & Rusev V., 2005.** Studies on the residue levels of tobramycin in stored poultry products. *Trakia Journal of Sciences*, **3** (5): 20-22.
- 81-Perrin-Guyomard A., Poul J.M., Corpet D.E., Sanders P., Fernandez A.H. & Bartholomew M., 2005.** Impact of residual and therapeutic doses of ciprofloxacin in the human-flora-associated mice model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **42** (2):151-160.
- 82-Pikkemaat M.G., 2009.** Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**: 893-905.

- 83-Prajwal S., Vasudevan V.N., Sathu T., Irshad A, Nayankumar S.R & Kuleswan P., 2017.** Antibiotic residues in food animals: Causes and health effects. *The Pharma Innovation Journal*, **6** (12): 01-04.
- 84-Rahmani T., 2006.** Situation de l'élevage du poulet de chair dans la daïra de Touggourt : (cas de Sidi Mahdi, commune de Nezla). Mémoire d'ingénieur : Université d'Ouargla. 180 p.
- 85-Ramdane M-S., 2015.** Étude qualitatives et quantitatives des résidus d'antibiotiques dans la viande de volaille et les œufs dans la région de la Mitidja. Utilisation des probiotiques comme alternative. Thèse de doctorat : Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. Pp : 41-44.
- 86-Rao B.V., Sowjanya G.N. & Ajitha A., 2015.** Review on stability indicating HPLC method development. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **4** (8) : 405-423.
- 87-Reig M. & Toldra F., 2008.** Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science*, **78** (1-2) : 60-67.
- 88-Roach Y., So T.A., Shah S., Chee L. & Nachman K.E., 2015.** International Agreement to Address the Contribution of Animal Agriculture to Antibiotic Resistance: A One Health Approach. *Journal of Law Medicine and Ethics*, **43** (2): 474-496.
- 89-Rotschafer J.C., Andes D.R. & Rodvold K.A., 2016.** Antibiotics pharmacodynamics. Edition: 1, Chapter: 4, Publisher: Humana Press, pp. XI, 666.
- 90-Rowland M. & Tozer T-N., 2011.** Distribution kinetics. *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 4th ed. Pp : 561-602.
- 91-Salehzadeh F., Madani R., Salehzadeh A., Rokni N. & Golchinefar F., 2006.** Oxytetracycline Residue in Chicken Tissues from Tehran Slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*, **5** (4): 377-381.
- 92-Sanders P., 2005.** L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale. *Bull. Acad. vét. Fr.*, **158** (2) : 137-142.
- 93-Sanders P., Bousquet-Melou A., Chauvin C. & Toutain P.L., 2011.** Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Prod. Anim.*, **24** (2) : 199-204.
- 94-Sattar S., Hassan M.M., Islam S.K.M.A., Alam M., Faruk M.S.A., Chowdhury S. & Saifuddin A.K.M., 2014.** Antibiotic residues in broiler and layer meat in Chittagong district of Bangladesh. *Veterinary World*, **7** (9): 738-743.
- 95-Schneider M.J., Mastovska K., Lehotay S.J., Lightfield A.R., Kinsella B. & Shultz C.E., 2009.** Comparison of screening methods for antibiotics in beef kidney juice and serum. *Analytica Chimica Acta*, **637**: 290-297.

- 96-Scippo M-L. & Maghuin-Rogister G., 2006.** Résidus et contaminants des denrées alimentaires : Méthodes biologiques de dépistage. *Ann. Méd. Vét.*, 150 : 125-130.
- 97-Spertini F., Comte D., Petitpierre S. & Bart P.A., 2012.** Allergie aux bêta-lactamines. *In Revue Médicale Suisse*, 337 : 836-842.
- 98-Sérieys F., 2004.** Antibiothérapie des infections mammaires quelle(s) voie(s) de traitement ?. *Bulletin des GVT*, 24 : 42-45.
- 99-Shlaes D.M., 2010.** Antibiotics: The Perfect Storm. Edition: 1, Chapter: 3, Publisher: Springer Netherlands, pp. VIII, 106.
- 100-Silbergeld E.K., Graham J. & Price L.B., 2008.** Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual Review of Public Health*, 29: 151-169.
- 101-Stead S., Sharman M. & Tarbin J.A., 2004.** Meeting maximum residue limits: an improved screening technique for the rapid detection of antimicrobial residues in animal food products. *Food Addit. Contam.*, 21: 216–21
- 102-Tavakoli H.R., Safae M.S., Afsharfarnia S., Joneidi N. & Sa'adat S., 2015.** Detecting antibiotic residues by HPLC method in chicken and calves meat in diet of a military center in Tehran. *Acta Medica Mediterranea*, 31: 1427.
- 103-Thorpe R. & Swanson S., 2005.** Current methods for detecting antibodies against erythropoietin and other recombinant proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 12 (1): 28-39.
- 104-Toprak E., Veres A., Michel J.B., Chait R., Hartl D.L. & Kishony R., 2011.** Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat. Genet.*, 44: 101–105.
- 105-Van Den Bogaard A.E., 2001.** Human health aspects of antibiotic use in food animals. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 126 (18): 590-595.
- 106-Villa R., Cagnardi P., Bacchetta S., Sonzogni O., Faustini M. & Carli S., 2001.** Meat distribution and residue depletion of oxytetracycline in the rabbit. *World rabbit Science*, 9 (4): 159-164.
- 107-Wang H.H., Manuzon M., Lehman M., Wan K., Luo H.L., Wittum T.E., Yousef A. & Bakaletz L.O., 2006.** Food transmitting antibiotic resistance genes. *Fems Microbiology Letters*, 254: 226-231.
- 108-Zaikin V.G. & Halket J.M., 2006.** Derivatization in mass spectrometry: 8. Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *European journal of mass spectrometry*, 12 (2): 79-115.
- 109-Zaslhoff M., 2002.** Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.