



DÉPARTEMENT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES
EL KHROUB

N° d'ordre : 029/Mag/2009

Série : 001/SV/2009

Mémoire

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

Option : hygiène alimentaire

Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande

THÈME

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

Par : M^{elle} **BOULTIF LATIFA**

Jury de soutenance

Président	MEKROUD. A	Maître de conférences	U.M.C
Rapporteur	EL HADEF EL OKKI. S	Professeur	U.M.C
Examineur	HAMDI TAHA. M	Maître de conférences	E.N.V Alger
Examineur	BENAZZOUZ. H	Maître de conférences	U.M.C

ANNÉE UNIVERSITAIRE 2008-2009

REMERCIEMENTS

- *Je remercie Allah de m'avoir donné la force et le courage pour pouvoir réaliser ce modeste travail.*
- *Mes vifs remerciements vont en premier lieu au professeur : Mr EL HADEF EL OKKI. S qui a bien voulu accepter l'encadrement de mon travail par ses précieux orientations et conseils.*
- *Je remercie également le professeur Mr MEKROUD. A qui a fait l'honneur d'avoir accepté la présidence du jury de thèse.*
- *Je remercie Mr le professeur HAMDI TAHA. M, maître de conférence à l'école nationale vétérinaire d'Alger qui a accepté de participer en qualité de membre de jury.*
- *Je remercie Mr le professeur BENZAOUZ. H, maître de conférence à l'université de Constantine qui a accepté de participer en qualité de membre de jury.*
- *Je remercie tous les enseignants qui ont participé à l'encadrement de cette post graduation.*
- *Je remercie vivement tous les membres de l'équipe 2 : à commencer par Mr CHÉBIRA. B qui m'a aidé, supporté et soutenu durant toute l'année pratique, à Mm CHOUDER, Melle HADEF et Mr ZEGHILET.*
- *Je remercie Mr AIT EL HOUCINE. T pour ses précieux conseils concernant l'HPLC.*
- *Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*
- *Enfin mes pensées vont vers mes parents qui m'ont aidé et soutenu tout le long de mes deux années d'études et surtout pour la préparation de ce travail.*

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIBIOTIQUES	3
1. HISTORIQUE	3
1.1 LA PÉNICILLINE	3
1.2 AUTRES ANTIBIOTIQUES	4
1.2.1 LES CÉPHALOSPORINES	4
1.2.2 LES AMINOGLYCOSIDES	4
1.2.3 LES TÉTRACYCLINES	4
1.2.4 LES MACROLIDES	4
2. DÉFINITIONS	4
3. PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES ET LEURS SPECTRES D'ACTIVITÉ	5
4. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LEUR MODE D'ACTION	7
4.1 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LA PAROI BACTÉRIENNE	7
4.2 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LA MEMBRANE BACTÉRIENNE	8
4.3 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE (RIBOSOMES)	8
4.3.1 LES AMINOSIDES	8
4.3.2 LES MACROLIDES	9
4.3.3 LES PHÉNICOLÉS	9
4.3.4 LES TÉTRACYCLINES	9
4.4 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LE MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES ET DE LEURS PRECURSEURS	9
4.4.1 BLOCAGE DE L'ARN POLYMÉRASE	9
4.4.1.1 La Rifamycine	9
4.4.2 ACTION SUR L'ADN	9
4.4.2.1 Les Quinolones	9
4.4.2.2 Dérivés des Nitrofuranes	10

4.4.3 LES 5 NITROIMIDAZOLES	10
4.5 ANTIBIOTIQUES IHNIBITEURS DES VOIES MÉTABOLIQUES OU IHNIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DE L'ACIDE FOLIQUE	10
4.5.1 LES SULFAMIDES	10
4.5.2 LES DIAMINOPYRIDINES	10
5. PHARMACOCINÉTIQUE	10
5.1 DÉFINITION	10
5.2 PHARMACOCINÉTIQUE DES PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES	11
5.2.1 BETALACTAMINES	11
5.2.1.1 Les Pénicillines	11
5.2.1.2 Les Céphalosporines	12
5.2.2 LES AMINOSIDES	13
5.2.3 LES PHÉNICOLÉS	13
5.2.4 LES TÉTRACYCLINES	14
5.2.5 LES MACROLIDES	14
5.2.6 LES GLYCOPEPTIDES	14
5.2.7 LES RIFAMYCINES	14
5.2.8 LES POLYPEPTIDES	15
5.2.9 LES SULFAMIDES	15
5.2.10 LES QUINOLONONES	15
CHAPITRE II : LES MODALITÉS D'APPARITION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT	17
1. CINÉTIQUE DES ANTIBIOTIQUES DANS LA MAMELLE	17
1.1 RAPPEL SUR LES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES UTILISÉS POUR LE TRAITEMENT DES MAMMITES	17
1.2 PHARMACOCINÉTIQUE DES ANTIBIOTIQUES DANS LA MAMELLE	19
1.3 FACTEURS DE VARIATION DE L'EXCRÉTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT	19
1.3.1 PRINCIPE ACTIF	19
1.3.2 RÔLE DE L'EXCIPIENT	21
1.3.3 EFFET DE LA DOSE	22
1.3.4 VOIE D'ADMINISTRATION	22
1.3.5 DURÉE DE TRAITEMENT	23

1.3.6 FACTEURS LIÉS À L'ANIMAL	23
2. LES CAUSES DE CONTAMINATION DU LAIT PAR LES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES	24
3. LES MESURES DESTINÉES À PRÉVENIR LA PRÉSENCE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT	25
4. LE LAIT	26
4.1 DÉFINITION	26
4.2 COMPOSITION ET CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DU LAIT	26
4.3 VALEUR NUTRITIVE DU LAIT	27
4.3.1 APPORTS EN PROTÉINES	27
4.3.2 APPORTS EN LIPIDES	27
4.3.3 APPORTS EN GLUCIDES	28
4.3.4 APPORTS EN MINÉRAUX ET OLIGO-ÉLÉMENTS	28
4.3.5 APPORTS EN VITAMINES	28
4.4 IMPORTANCE DE LA CONSOMMATION DU LAIT	28
4.5 IMPORTANCE DE LA CONSOMMATION DU LAIT DANS LE MONDE	29
4.6 IMPORTANCE DE LA CONSOMMATION LAITIÈRE EN ALGÉRIE	30
CHAPITRE III : LES PROBLÈMES CAUSÉS PAR LES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES	31
1. ORIGINE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES	31
1.1 UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES À TITRE CURATIF OU PRÉVENTIF	31
1.2 UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES COMME ADDITIFS ALIMENTAIRES	32
2. DÉFINITION DES RÉSIDUS	32
3. LE DÉLAI D'ATTENTE ET LA LIMITE MAXIMALE DES RÉSIDUS	32
3.1 LE DÉLAI D'ATTENTE	33
3.1.1 DÉFINITION	33
3.1.2 MÉTHODES DE CALCUL DU TEMPS D'ATTENTE DANS LE LAIT	33
3.1.3 EXPRESSION DU TEMPS D'ATTENTE	34
3.2 LA LIMITE MAXIMALE DES RÉSIDUS (LMR)	35
3.2.1 DÉFINITION DE LA LIMITE MAXIMALE DES RÉSIDUS (LMR)	36
3.2.2 LA LÉGISLATION EUROPÉENNE	38
3.2.3 LA LÉGISLATION ALGÉRIENNE	38

4. LES PROBLÈMES LIÉS A LA PRÉSENCE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES	38
4.1 LES PROBLÈMES SANITAIRES	39
4.1.1 PROBLÈMES D'ALLERGIE	39
4.1.2 RISQUES TOXIQUES	40
4.1.3 MODIFICATIONS DE LA FLORE DIGESTIVE DU CONSOMMATEUR	40
4.1.4 RISQUES D'ANTIBIORESISTANCES	40
4.2 LES PROBLÈMES TECHNOLOGIQUES	42
CHAPITRE IV : LES MÉTHODES DE DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES	44
1. HISTORIQUE ET ÉVOLUTION DES MÉTHODES DE DÉTECTION DANS LE TEMPS	44
2. LES TESTS DE DÉPISTAGE	45
2.1 LA MÉTHODE D'ACIDIFICATION	45
2.2 DELVOTEST	47
2.2.1 DELVOTEST SP	47
2.2.2 LE DELVO X PRESS	48
2.3 COPAN MILK TEST	48
2.4 VALIO T101	49
2.5 β-STAR	49
2.6 PENZYM TEST	51
2.7 SNAP TEST	52
2.8 CHARM TEST	53
2.9 TESTS ELISA	54
2.10 LE SYSTÈME DE DÉTECTION BASÉ SUR DES MICROBILLES MAGNÉTIQUES	54
3. SEUILS DE SENSIBILITÉ DES DIFFÉRENTS TESTS DE DÉPISTAGE	55
CHAPITRE V : LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	56
1. HISTORIQUE	56
2. DÉFINITION ET GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE	56
3. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	57

(HPLC)	
3.1 PRINCIPE	57
3.2 INSTRUMENTATION	58
3.2.1 RÉSERVOIRS DES SOLVANTS	59
3.2.2 POMPES	59
3.2.3 INJECTEUR OU VANNE D'INJECTION	59
3.2.4 COLONNE	60
3.2.5 DÉTECTEURS	61
3.3 LE CHOIX DES SOLVANTS	62
3.3.1 LA POLARITÉ	63
3.3.2 LES GRADIENTS D'ÉLUTION	63
3.4 ANALYSES DES CHROMATOGRAMMES	63
3.4.1 ANALYSE QUALITATIVE	64
3.4.2 ANALYSE QUANTITATIVE	64
3.5 LES AVANTAGES DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	65
3.6 DOMAINES D'APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	65
3.6.1 EXEMPLE DE L'ANALYSE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT	65
<i>PARTIE EXPÉRIMENTALE</i>	
1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	68
1.1 MATÉRIEL UTILISÉ	68
1.1.1 DESCRIPTION DE L'HPLC DE L'ETUDE	68
1.1.2 CENTRIFUGEUSE	69
1.1.3 DISPOSITIF DE FILTRATION	69
1.1.4 SERINGUES D'INJECTION	70
1.1.5 FILTRES	70
1.1.6 PIPETTES	71
1.1.7 BALANCE ANALYTIQUE	71
1.1.8 VORTEX	71
1.1.9 FLACONS EN PLASTIQUE	71
1.1.10 TUBES EN VERRE	71
1.2 PRODUITS CHIMIQUES	71

1.2.1 COMPOSÉ PHYWE	71
1.2.2 STANDARDS D'ANTIBIOTIQUES	72
1.2.3 AUTRES PRODUITS	73
1.3 ÉCHANTILLON	73
1.4 PROTOCOLE GÉNÉRAL D'ANALYSE	73
1.4.1 MAÎTRISE DE L'UTILISATION DE L'APPAREILLAGE	73
1.4.2 PRÉPARATION DES SOLUTIONS	73
1.4.2.1 PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE PÉNICILLINE	73
1.4.2.2 PRÉPARATION DE LA SOLUTION DU CHLORAMPHÉNICOL	73
1.4.2 OPÉRATION DE FILTRATION	74
1.4.3 L'ANALYSE HPLC	74
1.4.3.1 DÉMARRAGE DES MODULES HPLC	74
1.4.3.2 ÉTAPES DE L'ANALYSE	74
1.4.4 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DES RÉSIDUS DE PÉNICILLINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	75
1.4.4.1 UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DE LA PÉNICILLINE G	76
1.4.4.2 OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DE LA PÉNICILLINE	76
1.4.4.3 OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LA PÉNICILLINE G	77
1.4.4.4 OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LA PÉNICILLINE G	77
1.4.4.5 OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LA PÉNICILLINE G	79
1.4.4.6 OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LA PÉNICILLINE G	79
1.4.5 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DES RÉSIDUS DE CHLORAMPHÉNICOL PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	80
1.4.5.1 UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DU CHLORAMPHÉNICOL	80
1.4.5.2 OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DU CHLORAMPHÉNICOL	81
1.4.5.3 OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LE CHLORAMPHÉNICOL	81
1.4.5.4 OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LE	82

CHLORAMPHÉNICOL	
1.4.5.5 OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LE CHLORAMPHÉNICOL	82
1.4.5.6 OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LE CHLORAMPHÉNICOL	83
1.4.6 EXAMENS DE LA FIABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC	83
1.4.6.1 LA RÉPÉTABILITÉ	83
1.4.6.2 LA REPRODUCTIBILITÉ	84
1.4.6.3 LA LINÉARITÉ DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE	86
1.4.7 LA LIMITE DE DÉTECTION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC	87
1.4.8 LA MÉTHODE D'EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT	88
1.5 EXPRESSION DES RÉSULTATS	89
1.5.1 LES TESTS STATISTIQUES	89
1.5.1.1 CALCUL DE LA RÉPÉTABILITÉ	89
1.5.1.2 CALCUL DE LA REPRODUCTIBILITÉ	90
1.5.1.3 CALCUL DE L'INTERVALLE DE CONFIANCE	91
2. RÉSULTATS ET DISCUSSION	92
2.1 MAÎTRISE DE L'UTILISATION DE L'APPAREILLAGE	92
2.2 RÉSULTATS DE L'OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DE LA PÉNICILLINE G PAR HPLC	93
2.2.1 RÉSULTAT DE L'UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DE LA PÉNICILLINE G	93
2.2.2 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DE LA PÉNICILLINE G	94
2.2.3 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LA PÉNICILLINE G	95
2.2.4 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LA PÉNICILLINE G	96
2.2.5 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LA PÉNICILLINE G	99
2.2.6 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LA PÉNICILLINE G	102
2.3 RÉSULTATS DE L'OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DU CHLORAMPHÉNICOL PAR HPLC	103
2.3.1 RÉSULTAT DE L'UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DU CHLORAMPHÉNICOL	103
2.3.2 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DE	104

STANDARD DU CHLORAMPHÉNICOL	
2.3.3 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LE CHLORAMPHÉNICOL	105
2.3.4 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LE CHLORAMPHÉNICOL	107
2.3.5 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LE CHLORAMPHÉNICOL	109
2.3.6 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LE CHLORAMPHÉNICOL	111
2.4 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS OBTENUS : PARAMETRES D'ANALYSE RETENUS	112
2.4.1 LA PÉNICILLINE G	113
2.4.2 LE CHLORAMPHÉNICOL	113
2.5 FIABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ANALYSE AVEC LES PARAMÈTRES RETENUS	113
2.5.1 LA PÉNICILLINE G	113
2.5.1.1 LA RÉPÉTABILITÉ	113
2.5.1.2 LA REPRODUCTIBILITÉ	114
2.5.1.3 LA LINÉARITÉ DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE	115
2.5.2 LE CHLORAMPHÉNICOL	116
2.5.2.1 LA RÉPÉTABILITÉ	116
2.5.2.2 LA REPRODUCTIBILITÉ	117
2.5.2.3 LA LINÉARITÉ DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE	118
2.6 RÉSULTAT DE LA DÉTERMINATION DE LA LIMITE DE DÉTECTION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC	119
2.6.1 LA LIMITE DE DÉTECTION DE LA PÉNICILLINE G	119
2.6.2 LA LIMITE DE DÉTECTION DU CHLORAMPHÉNICOL	120
2.7 RÉSULTATS DES ESSAIS DE L'EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT	122
2.7.1 ÉCHANTILLON DE LAIT DOPÉ PAR LA PÉNICILLINE G	122
2.7.2 ÉCHANTILLON DE LAIT DOPÉ PAR LE CHLORAMPHÉNICOL	122
2.7.3 ÉCHANTILLON DE LAIT TÉMOIN	123
CONCLUSION	125

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

TABLEAUX	
Tableau n° 1 : principales familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité	5
Tableau n° 2 : paramètres pharmacocinétiques des principales pénicillines	12
Tableau n° 3 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites en lactation	17
Tableau n° 4 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites hors lactation	18
Tableau n° 5 : rapports de concentration lait/sérum des antibiotiques en fonction de leur PKa	19
Tableau n° 6 : composition chimique du lait chez divers mammifères ; composition moyenne du lait en gramme par litre (g/l)	26
Tableau n° 7 : caractéristiques physicochimiques du lait de vache	27
Tableau n° 8 : les quantités disponibles de lait et de produits laitiers (beurre exclu), par pays (kg/personne/an)	29
Tableau n° 9 : Limite Maximale des Résidus (LMR) des principaux antibiotiques (exprimées en µg/kg ou ppm)	36
Tableau n° 10 : exemples de LMR du lait en Europe, au États Unis et dans le codex alimentarius (exprimées en µg/kg ou ppm)	37
Tableau n° 11 : évolution des méthodes de détection dans de temps	44
Tableau n° 12 : sensibilité des différents tests de dépistages aux antibiotiques	55
Tableau n° 13 : Propriétés de quelques solvants utiles pour la chromatographie en phase liquide	62
Tableau n° 14 : résultats des calculs statistiques pour les trois séries de répétabilité de la pénicilline	113
Tableau n° 15 : résultats des calculs statistiques des trois séries d'analyse de la molécule de pénicilline	114

Tableau n° 16 : résultats des calculs statistiques pour les trois séries de répétabilité du chloramphénicol	116
Tableau n° 17 : résultats des calculs statistiques des trois séries d'analyses de la molécule du chloramphénicol	117
FIGURES	
Figure n° 1 : passage sang/lait de l'antibiotique et partition selon pH et pKa	20
Figure n° 2 : rôle de l'excipient sur la cinétique de la concentration de l'antibiotique dans le lait	22
Figure n° 3 : réseau de transfert de la résistance aux antibiotiques	42
Figure n° 4 : expression des résultats de Délvotest SP	48
Figure n° 5 : interprétation des résultats de Copan milk test	49
Figure n° 6 : principe de réaction du β -STAR	51
Figure n° 7 : interprétation des résultats du β -STAR	51
Figure n° 8 : lecture du Snap test	53
Figure n° 9 : principe de Charm test II	54
Figure n° 10 : instrumentation de l'HPLC	58
Figure n° 11 : Injecteur à boucle à gauche, le remplissage de la boucle à droite, l'injection dans la colonne	60
Figure n° 12 : l'analyse qualitative d'un chromatogramme	63
Figure n° 13 : HPLC de l'étude	69
Figure n° 14 : le dispositif de filtration	70
Figure n° 15 : seringue d'injection	70
Figure n° 16 : la balance analytique	71
Figure n° 17 : le standard de pénicilline	72
Figure n° 18 : le standard de chloramphénicol	72
Figure n° 19 : maîtrise de l'utilisation de l'appareillage	92
Figure n° 20 : utilisation de quelques paramètres préconisés sur le prospectus de la pénicilline G	93
Figure n° 21 : solvant de dilution : méthanol	94
Figure n° 22 : solvant de dilution : acétonitrile	94
Figure n° 23 : phase mobile acétonitrile	95
Figure n° 24 : phase mobile méthanol	95

Figure n° 25 : longueur d'onde 190 et 220 nm	97
Figure n° 26 : longueurs d'onde 220 et 250 nm	97
Figure n° 27 : longueur d'onde 250 et 280 nm	98
Figure n° 28 : longueurs d'onde 280 et 300 nm	98
Figure n° 29 : longueurs d'onde 300 et 330 nm	99
Figure n° 30 : débit 0.8 ml/min	100
Figure n° 31 : débit 1 ml/min	100
Figure n° 32 : débit 1.2 ml/min	100
Figure n° 33 : débit 1.4 ml/min	100
Figure n° 34 : débit 1.6 ml/min	101
Figure n° 35 : volume d'injection 5 µl	102
Figure n° 36 : volume d'injection 10 µl	102
Figure n° 37 : volume d'injection 15 µl	103
Figure n° 38 : volume d'injection 20 µl	103
Figure n° 39 : utilisation de quelques paramètres mentionnés sur le prospectus du chloramphénicol	104
Figures n° 40 : solvant de dilution : méthanol	105
Figure n° 41 : solvant de dilution : acétonitrile	105
Figure n° 42 : phase mobile méthanol	106
Figure n° 43 : phase mobile acétonitrile	106
Figure n° 44 : longueur d'onde 200 nm	107
Figure n° 45 : longueur d'onde 220 nm	107
Figure n° 46 : longueur d'onde 250 nm	108
Figure n° 47 : longueur d'onde 272 nm	108
Figure n° 48 : longueur d'onde 280 nm	108
Figure n° 49 : longueur d'onde 300 nm	108
Figure n° 50 : longueur d'onde 320 nm	109
Figure n° 51 : débit 1 ml/min	110
Figure n° 52 : débit 1.2 ml/min	110
Figure n° 53 : débit 1.4 ml/min	110
Figure n° 54 : débit 1.6 ml/min	110
Figure n° 55 : volume 5 µl	111
Figure n° 56 : volume 10 µl	111

Figure n° 57 : volume 15 μ l	112
Figure n° 58 : volume 20 μ l	112
Figure n° 59 : courbe de linéarité de la pénicilline G	115
Figure n° 60 : la courbe de linéarité du chloramphénicol	118
Figure n° 61 : concentration 0.15 mg/ml	119
Figure n° 62 : concentration 15×10^{-4} mg/ml	119
Figure n° 63 : concentration 15×10^{-8} mg/ml	120
Figure n° 64 : concentration 15×10^{-10} mg/ml	120
Figure n° 65 : concentration 0.2 mg/ml	121
Figure n° 66 : concentration 2×10^{-4} mg/ml	121
Figure n° 67 : concentration 2×10^{-8} mg/ml	121
Figure n° 68 : échantillon de lait dopé avec le standard de pénicilline	122
Figure n° 69 : échantillon de lait dopé avec le standard chloramphénicol	123
Figure n° 70 : échantillon de lait témoin	123

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de la Mise sur Marché
cal : calculé
Ca/P : calcium/phosphore
D : diamètre
DJA : Dose journalière acceptable
DSE : dose sans effet
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMEA : Agence Européenne de l'Evaluation du Médicament
FAO : Food and Agriculture Organization
FDA : Food and Drug Administration
HPLC : chromatographie liquide haute performance
Kcal : kilo calorie
KJ : kilo joule
L : longueur
LMR : Limite Maximale des Résidus
Na₂EDTA : di-sodium Éthylène Diamine Tétra-Acétique
NaH₂HPO₄ : di-sodium hydrogénophosphate
nm : nanomètre
ppb : partie par billion
ppm : partie par million
t_M : temps mort
t_R : temps de rétention
UI : Unité Internationale
UV : Ultra Violet

INTRODUCTION

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 humaine.

Les résidus d'antibiotiques dans le lait doivent être une source de préoccupation des pouvoirs publics, surtout lorsqu'on connaît leurs effets néfastes sur la santé humaine (antibiorésistance, problèmes allergiques, etc.), sur la technologie laitière (pertes économiques) et lors des contrôles bactériologiques (résultats faussement négatifs).

L'importance de ce problème d'ordre sanitaire et technologique nous a incité à s'intéresser à ce thème.

Ce travail entre dans le cadre d'un projet de recherche intitulé Surveillance de la chaîne alimentaire - Détection et quantification des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale, cinétique des principaux antibiotiques utilisés en pratique vétérinaire en Algérie dans le laboratoire de Pathologie Animale, Développement des Élevages et Surveillance de la Chaîne Alimentaire des denrées animales ou d'origine animale (PADESCA) du département des sciences vétérinaires d'El Khroub.

Dans la première partie nous avons réuni des données bibliographiques concernant les principales familles d'antibiotiques, les problèmes causés par les résidus d'antibiotiques, les méthodes de détection couramment utilisées pour leur recherche ainsi que des rappels sur la chromatographie liquide haute performance.

Dans la deuxième partie nous avons procédé à l'optimisation des paramètres de détection et de quantification de deux antibiotiques :

- la pénicilline car c'est l'antibiotique le plus recherché dans le lait
- le chloramphénicol, antibiotique prohibé

Les paramètres de détection et de quantification ont été soumis à des tests statistiques afin de déterminer la fiabilité de la méthode.

*SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE*

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIBIOTIQUES

1. HISTORIQUE

1.1 LA PÉNICILLINE

Le 3 septembre 1928, le docteur Alexander Fleming, de retour de vacances, constate que les boîtes de Pétri, où il faisait pousser des staphylocoques, ont été envahies par des colonies cotonneuses d'un blanc verdâtre ; *Penicillium notatum* (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999), (Doucet, 1998), (Anonyme. b, 1997).

Alors qu'il doit désinfecter ces boîtes contaminées, Fleming s'aperçoit qu'autour des colonies de moisissure, il existe une zone circulaire dans laquelle le staphylocoque n'a pas poussé. Il émet l'hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon en est responsable et lui donne le nom de pénicilline (Doucet, 1998), (Milhaud et al, 1982).

Il fallait attendre une dizaine d'années avant que la pénicilline ne revienne sur le devant de la scène. C'est en 1939, que Howard Walter Florey et Ernest Boris Chain, réussirent à isoler l'agent actif de la pénicilline (Doucet, 1998), (Anonyme. b, 1997), ils ont fait des essais thérapeutiques sur l'animal (Chain), puis sur l'homme (Florey) (Milhaud et al, 1982).

1942-1945 : développement des procédés industriels de préparation des pénicillines (Milhaud et al, 1982).

1949 : Behrens mettait en évidence la notion de précurseur et de préparation de pénicillines biosynthétiques (Milhaud et al, 1982).

1950 : préparation des pénicillines « retard » (Milhaud et al, 1982).

1959 : Batchelor, isolait l'acide amino-6 pénicillinique et préparait des pénicillines semi-synthétiques (Milhaud et al, 1982).

En octobre 1964, Dorothy Crowfoot Hodgkin recevait un prix Nobel en chimie pour avoir découvert la structure moléculaire de la pénicilline (Anonyme. b, 1997).

1.2 AUTRES ANTIBIOTIQUES

1.2.1 LES CÉPHALOSPORINES

En 1945, G. Brotzu isolait une souche de *Céphalosporium acremonium* à partir d'un réseau d'égouts, cette moisissure produit une substance qui inhibe la croissance de nombreuses espèces bactériennes (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999).

1.2.2 LES AMINOGLYCOSIDES

En 1943, Schatz et Waksman isolaient une souche de *Streptomyces griseus* et mettaient en évidence son activité antimicrobienne en 1944 (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999).

1.2.3 LES TÉTRACYCLINES

En 1949, Kane, Finlay et Sabin, isolaient l'oxytétracycline à partir de *Streptomyces rimosus* (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999).

1.2.4 LES MACROLIDES

En 1952, Mac Guire isolait l'érythromycine à partir de *Streptomyce erythraeus* (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999).

2. DÉFINITIONS

La définition des antibiotiques a connu une évolution dans le temps ainsi :

- Waksman (1943) a défini les antibiotiques comme " toutes substances chimiques produites par les micro-organismes capables d'inhiber le développement et détruire les bactéries et d'autres micro-organismes" (Bergogne-Bérézin et Dellamonica, 1999), (Milhaud et al, 1982).

- Turpin et Velu (1957) ont quant à eux défini les antibiotiques comme " tout composant chimique élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique par l'inhibition de certains processus vitaux à l'égard des virus, des microorganismes et de certains êtres pluricellulaires" (Milhaud et al, 1982).

Les antibiotiques se définissent actuellement comme des molécules antibactériennes synthétiques ou naturelles (d'origine biologique) capables d'inhiber la croissance des

bactéries ou les détruire (Helali, 1999). Ils ont une toxicité sélective ; ils sont toxiques pour les bactéries mais pas pour l'organisme (Merad et Merad, 2001).

Les sources principales des antibiotiques sont les champignons, mais aussi les bactéries. Il existe également des antibiotiques entièrement synthétiques (Guillemot et al, 2006), (Anonyme. b, 2002), (Merad et Merad, 2001), (Yala et al, 2001).

Exemples selon Yala (2001) :

- la pénicilline est produite par un champignon "*Penicillium notatum* "
- le chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique

D'après le même auteur les antibiotiques sont définis aussi par leur :

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

3. PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES ET LEURS SPECTRES D'ACTIVITÉ

Le tableau 1 représente les principales familles d'antibiotiques ainsi que leurs spectres d'activité.

Tableau n° 1 : principales familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité (Allain a, b, c, 2006), (Abidi, 2004), (Yala et al, 2001), (Perlemuter et al, 2000), (Lechat et al, 1975)

FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES	ANTIBIOTIQUES CORRESPONDANTS	SPECTRES D'ACTIVITÉ
Bêtalactamines	Les pénicillines Pénicilline G Ampicillines Amoxycilline Carbénicilline Cloxacilline Dicloxacilline Oxacilline Pipéracilline Nafcicilline	Actives contre cocci Gram + et Gram – ainsi que les bacille Gram +
	Les céphalosporines Première génération Céfalexine Cefalonium Céfapirine Céfalotine	Actives contres les Gram +

	Céfazoline Céfadroxil Céfradine Deuxième génération Céfuroxime Céfoxitine Troisième génération Ceftiofur Céfopérazone Céfotiam Ceftazidime Céfépime Quatrième génération Cefquinome	Spectre intermédiaire Active contre les Gram -
Aminosides	Streptomycine Néomycine Apramycine Amikacine Gentamicine Kanamycine Netilmicine Ribostamycine Spectinomycine Tobramycine Framycétine Paramomycine	Actives contre les bacilles à Gram -
Phénicolés	Chloramphénicol Thiamphénicol Florfénicol	Spectre large
Tétracyclines	Oxytétracycline Chlortétracycline Doxycycline Minocycline Déméthylchlortétracycline	Spectre large
Macrolides	Érythromycine Lincomycine Spiramycine Tylosine Josamycine Oléandomycine Tilmicosine Tulathromycine	Actives contre les coques Gram + et Gram – et bacille gram + Actifs sur les mycoplasmes
Glycopeptides	Vancomycine Teicoplanine	Active contre les bactéries à Gram +
Polypeptides	Colistine Colistiméthate Polymyxine B Bacitracine Tyrothricine	Active contre les bacilles Gram -
Sulfamides	Sulfaméthizol Sulfathiazol Sulfadimidine sulfadimérazine Sulfaméthoxazole Sulfadiazine Sulfadiméthoxine Sulfaméthoxyypyridazines	Spectre large
Quinolones	Acide oxolinique Ciproflaxine Fluméquine Enrofloxacin Danofloxacin	Spectre large

	Ibafloxacin Marbofloxacin Difloxacin	
--	--	--

4. CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES SELON LEUR MODE D'ACTION

D'après Rychembusch (2003) et Anonyme. b (2002) on distingue selon le mode d'action :

- des antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne
- des antibiotiques actifs sur la synthèse protéique
- des antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs
- des antibiotiques inhibiteurs des voies métaboliques
- des antibiotiques antianaérobies

4.1 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LA PAROI BACTÉRIENNE

Les antibiotiques qui agissent sur la paroi sont essentiellement des inhibiteurs de la synthèse de peptidoglycane (Anonyme. a, 2007), (Allain. c, 2006), (Anonyme. d, 2006).

On peut distinguer des antibiotiques qui agissent sur :

- les premières étapes de la synthèse du peptidoglycane ; c'est le cas de la fosfomycine, la vancomycine et la teicoplanine (Allain. c, 2006), (Yala et al, 2001), (Anonyme, 2000).
- les dernières étapes de la synthèse du peptidoglycane ; c'est le cas des bêta-lactamines (pénicillines et céphalosporines) (Anonyme. a, 2007), (Allain. c, 2006), (Yala et al, 2001), (Anonyme, 2000).

Les β -lactamines exercent leur effet antibiotique sur les germes possédant une paroi riche en peptidoglycane et sont sans effet sur les organismes dépourvus de paroi (mycoplasmes). Les β -lactamines, de par leur structure chimique, inhibent les transpeptidases extracytoplasmiques à condition d'entrer en contact avec elles.

Dans les bactéries Gram positif, les différentes β -lactamines atteignent les transpeptidases à travers la paroi de peptidoglycane déjà constituée ou en cours de constitution. Par contre, dans les bactéries Gram négatif, elles n'atteignent ces

enzymes qu'après pénétration à travers les canaux porines de la membrane externe (Allain. c, 2006), (Hennel, 2006), (Anonyme, 2000).

4.2 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LA MEMBRANE BACTÉRIENNE

Ce sont des antibiotiques de nature polypeptidique ; la polymyxine et la colistine sont des antibiotiques qui altèrent la membrane plasmique des germes en s'y incorporant et en y formant des pores à l'origine d'échanges anormaux, notamment une sortie de phosphate du germe vers le milieu extérieur (l'éclatement de la bactérie) (Allain. a, 2006), (Hennel, 2006), (Yala et al, 2001), (Helali, 1999), cela s'explique par le fait que les polymixines agissent comme des détergents cationiques : grâce à leur caractère amphipathique, elles pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insèrent parmi les phospholipides de la paroi, perturbant ainsi la perméabilité membranaire (Anonyme, 2000).

4.3 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE (RIBOSOMES)

Selon Anonyme (2000), différentes classes d'antibiotiques agissent en interférant avec la synthèse protéique bactérienne, et ce, au niveau de l'une des trois étapes principales de la traduction :

- l'initiation
- l'élongation
- la terminaison

4.3.1 LES AMINOSIDES

Ils perturbent la synthèse protéique bactérienne en se fixant sur les ribosomes de la sous-unité 30 S. Sans doute en raison de leur caractère polycationique, ils déplacent les ions magnésium (Allain. b, 2006), (Yala et al, 2001), (Anonyme, 2000), ce qui augmente la pression osmotique à l'intérieur de la bactérie et conduit à sa lyse (Hennel, 2006). L'altération de la membrane bactérienne est la conséquence de la perturbation de la synthèse protéique et de leur effet direct sur elle (Anonyme. a, 2007), (Allain. b, 2006), (Tissot, 2005), (Yala et al, 2001), (Anonyme, 2000), (Helali, 1999).

4.3.2 LES MACROLIDES

Ils perturbent la synthèse protéique bactérienne en se fixant sur les ribosomes de la sous-unité 50 S (Anonyme. a, 2007), (Anonyme. b, 2002), (Anonyme, 2000), bloquant ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse (Yala et al, 2001).

4.3.3 LES PHÉNICOLÉS

Ils perturbent la synthèse protéique bactérienne en se fixant sur les ribosomes de la sous-unité 50 S, ce qui empêche la fixation d'un nouvel acide aminé sur la chaîne protéique en croissance (Anonyme. a, 2007), (Anonyme. b, 2002), (Yala et al, 2001), (Anonyme, 2000), (Helali, 1999).

4.3.4 LES TÉTRACYCLINES

Ils inhibent la synthèse protéique en se fixant à la sous-unité 30 S des ribosomes. Ils s'opposent à la fixation de l'acide aminé-acyl-tRNA sur l'accepteur constitué par le complexe mRNA-ribosome, ce qui arrête la synthèse protéique (Anonyme. a, 2007), (Allain. b, 2006), (Hennel, 2006), (Yala et al, 2001), (Anonyme, 2000), (Helali, 1999).

4.4 ANTIBIOTIQUES ACTIFS SUR LE MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLEIQUES ET DE LEURS PRECURSEURS

On distingue des antibiotiques actifs d'une part sur la synthèse des ARN et d'autre part sur la synthèse des ADN ou de leurs précurseurs (Anonyme. b, 2002).

4.4.1 BLOCAGE DE L'ARN POLYMÉRASE

4.4.1.1 La Rifamycine

Agit en bloquant l'ARN polymérase (Anonyme. a, 2007), (Hennel, 2006), (Yala et al, 2001).

4.4.2 ACTION SUR L'ADN

4.4.2.1 Les Quinolones

Ils inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien (Anonyme. a, 2007), (Hennel, 2006), (Yala et al, 2001), (Anonyme, 2000).

4.4.2.2 Dérivés des Nitrofuranes

Ils agissent en perturbant la réplication de l'ADN (Anonyme. a, 2007), (Yala et al, 2001).

4.4.3 LES 5 NITROIMIDAZOLES

Ils agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques entraînant la mort rapide de la bactérie (Yala et al, 2001).

4.5 ANTIBIOTIQUES IHNIBITEURS DES VOIES MÉTABOLIQUES OU IHNIBITEURS DE LA SYNTHÈSE DE L'ACIDE FOLIQUE

4.5.1 LES SULFAMIDES

Ils agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques à incorporer dans les acides nucléiques (Anonyme. a, 2007), (Anonyme. b, 2002), (Anonyme, 2000).

4.5.2 LES DIAMINOPYRIDINES

Ils inhibent la réduction de l'acide folique en tirant partie de la différence de sensibilité de la dihydrofolate réductase bactérienne par comparaison avec l'enzyme des cellules eucaryotes (Anonyme. b, 2002), (Helali, 1999).

5. PHARMACOCINÉTIQUE

La connaissance de la pharmacocinétique est essentielle afin de comprendre les effets des médicaments (Anonyme. b, 2002).

5.1 DÉFINITION

C'est l'étude qualitative et quantitative du devenir d'un médicament après son administration à l'organisme (Anonyme. d, 2006) c'est à dire que la pharmacocinétique rapporte ce que l'organisme fait au médicament ; elle étudie comment le corps absorbe, distribue, métabolise et excrète ce dernier (Anonyme. b, 2002), selon Anonyme. d (2006) la pharmacocinétique comporte donc quatre phases qui se déroulent simultanément :

- résorption
- distribution

- métabolisation
- excrétion

La cinétique est très spécifique à chacune des substances. Elle varie d'une espèce à l'autre et est fortement influencée par la forme galénique des spécialités, par conséquent, il est vivement conseillé de connaître la pharmacocinétique des principales familles d'antibiotiques (Anonyme. c, 2007).

5.2 PHARMACOCINÉTIQUE DES PRINCIPALES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES

5.2.1 BETALACTAMINES

5.2.1.1 Les Pénicillines

Sur le plan pharmacocinétique, l'absorption digestive de la pénicilline G est médiocre, inférieure à 30%, car elle est détruite par le suc gastrique acide (Allain, 2006), (Anonyme. b, 2002), (Anonyme. b, 2001), (Milhaud et al, 1982). Les pénicillines diffusent facilement dans les espaces extracellulaires (Allain, 2006), (Milhaud et al, 1982) mais ne se concentrent pas dans les tissus (Anonyme. b, 2002).

Dans les deux ou trois premières heures qui suivent une injection intramusculaire de la pénicilline, la concentration dans le lait est environ 100 fois inférieure à la concentration sanguine. Ensuite la concentration dans le lait augmente légèrement alors que la concentration sanguine diminue ; à la 6^{ème} ou à la 12^{ème} heure, le rapport entre les deux concentrations est de l'ordre de 10 (Milhaud et al, 1982).

Les pénicillines sont liées aux protéines plasmatiques à minimum 50% mais ceci n'a guère de conséquences cliniques (Anonyme. b, 2002).

Sa demi-vie plasmatique est courte, de l'ordre de 30 minutes (Allain. c, 2006), (Anonyme. b, 2002), (Milhaud et al, 1982), les paramètres pharmacocinétiques des principales pénicillines sont illustrés dans le tableau 2.

Tableau n° 2 : paramètres pharmacocinétiques des principales pénicillines

(Anonyme. b, 2002), (Milhaud et al, 1982)

Pénicilline	Absorption orale (%)	Liaison aux protéines (%)	Métabolisation hépatique	Demi-vie (h)
1. Benzylpénicillines				
Pénicilline G	20	60	non	0.5
Pénicilline V	60	80	non	1
2. Pénicillines résistantes aux pénicillinases				
Méthicilline	-	35	non	0.5
Cloxacilline	50	94	oui	0.5
Dicloxacilline	50	97	oui	0.5
Flucloxacilline	50	96	oui	0.5
3. Aminopénicillines				
Ampicilline	40	20	non	1
Amoxicilline	80	20	non	1
4. Carboxypénicillines et acyluréidopénicillines				
Ticarclilline	-	50	oui	1
Pipéracilline	-	50	oui	1
Azlocilline	-	50	oui	1
Mezlocilline	-	50	oui	1

Les pénicillines subissent peu de biotransformations et sont éliminées sous forme active (Hennel, 2006), le pourcentage de dégradation n'excède pas 20% (Milhaud et al, 1982), Certaines molécules (carboxypénicillines et acyluréidopénicillines) subissent en outre une métabolisation hépatique (Anonyme. b, 2002), (Milhaud et al, 1982).

L'élimination des pénicillines s'opère au niveau rénal par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire (Anonyme. c, 2007), (Allain. c, 2006), (Anonyme. b, 2002), (Milhaud et al, 1982).

Le lait n'élimine qu'une petite quantité de pénicilline administrée par voie générale. À la suite d'administration par voie galactophore, lors du traitement des mammites, des résidus de pénicilline existent non seulement dans le lait du quartier traité, mais encore dans celui des quartiers voisins et ceci pendant plusieurs jours (Milhaud et al, 1982).

5.2.1.2 Les Céphalosporines

Elles sont stables en milieu acide mais sont pour la plupart mal résorbées dans le tube digestif, elles sont dès lors administrées par voie parentérale (à l'exception du Céfadroxil, de la Céfalexine, de la Céfatrizine et du Céfaclor) (Anonyme. b, 2002).

Comme les pénicillines, les céphalosporines diffusent mais ne se concentrent pas dans les tissus. Elles passent toutefois mieux la barrière hémato-encéphalique, même si celle-ci n'est pas enflammée (Anonyme. b, 2002).

L'élimination est rapide (demi vie de 1 à 2 heures), elle s'opère par voie rénale et par métabolisation hépatique dans certains cas (céfalotine, ceftriaxone, céfopérazone, céfotaxime) (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002).

5.2.2 LES AMINOSIDES

Ce sont des antibiotiques très hydrosolubles, avec une mauvaise absorption digestive (Anonyme. a, 2007) et ne franchissent pas la paroi intestinale (Anonyme. c, 2007), (Allain. b, 2006), (Anonyme. b, 2001). Après injection intramusculaire, la résorption à partir du point d'injection est rapide. Les pics sériques sont obtenus une à deux heures après l'injection et varient proportionnellement à la dose injectée.

Leur distribution est essentiellement extracellulaire (Anonyme. a, 2007), (Anonyme. c, 2007), (Allain. b, 2006) de fortes concentrations sont trouvées dans le rein, l'endolymphe et la périlymphe de l'oreille interne, ce qui explique leur toxicité rénale et cochléaire (Anonyme. a, 2007), (Allain. b, 2006), (Anonyme. b, 2002).

La liaison des aminoglycosides aux protéines plasmatiques est faible (Anonyme. b, 2002), la demi-vie est d'une dizaine d'heures (Anonyme. b, 2001).

Les aminoglycosides ne subissent aucune métabolisation (Anonyme. b, 2002) leur élimination urinaire par filtration glomérulaire est largement prédominante, ils s'accumulent donc dans l'organisme en cas d'insuffisance rénale (Anonyme. a, 2007), (Anonyme. c, 2007), (Allain. b, 2006), (Anonyme. b, 2001).

5.2.3 LES PHÉNICOLÉS

L'absorption digestive est excellente, le chloramphénicol (antibiotique appartenant à la famille des phénicolés) diffuse bien dans les tissus et les liquides extracellulaires en raison de leur liposolubilité, et l'une de leurs caractéristiques est l'excellente pénétration dans le liquide céphalorachidien même en absence d'inflammation méningée.

La demi-vie est de trois à quatre heures, la métabolisation se fait essentiellement dans le foie, l'élimination est surtout urinaire (Anonyme. b, 2001), (Schorderet, 1998).

5.2.4 LES TÉTRACYCLINES

La biodisponibilité orale varie fortement selon la forme galénique et le type de molécule (Anonyme. c, 2007) leur forte liposolubilité leur permet de bien diffuser à travers les barrières biologiques et atteindre des concentrations efficaces y compris dans les milieux intracellulaires ; notamment dans le placenta, les glandes mammaires, les sécrétions bronchiques et les liquides d'ascites (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2001) la liaison aux protéines de ces molécules limite par contre leur diffusion dans le liquide céphalo-rachidien.

L'Oxytétracycline est éliminée par filtration glomérulaire sous forme active et accessoirement par la bile. Le cycle entéro-hépatique prolonge la demi-vie d'élimination, il peut aussi être à l'origine d'une dérive de la flore intestinale (Anonyme. c, 2007).

5.2.5 LES MACROLIDES

Ils sont absorbés par l'intestin (Anonyme. b, 2001) ils se distribuent largement dans l'organisme. Ils diffusent dans les tissus (à l'exception du liquide céphalo-rachidien) et se concentrent dans les milieux vascularisés (poumons, foie, rein, os) car se sont des molécules liposolubles et basiques, ils ont donc une distribution essentiellement intracellulaire (Anonyme. b, 2002).

La très longue demi-vie d'élimination, de 6 et de 8 jours respectivement chez le porc et les bovins, justifie l'efficacité thérapeutique d'une administration unique. L'élimination des macrolides est biliaire, après métabolisation hépatique (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002), (Anonyme. b, 2001).

5.2.6 LES GLYCOPEPTIDES

Ils nécessitent une administration parentérale, la demi-vie moyenne de la vancomycine est de six heures (Anonyme. b, 2001).

L'élimination est essentiellement urinaire et sous forme active (Lechat et al, 1975).

5.2.7 LES RIFAMYCINES

La résorption digestive est de cent pour cent (Anonyme. b, 2001), ils ont une forte liaison aux protéines sériques : supérieure au taux sanguin ; les deux tiers sont désacétylés dans le foie (Milhaud et al, 1982).

La demi-vie est de deux à trois heures et l'élimination s'effectue par la bile (Anonyme. b, 2001), l'urine et faiblement dans le lait (Milhaud et al, 1982).

5.2.8 LES POLYPEPTIDES

Ce sont des antibiotiques non absorbés par la muqueuse intestinale (Lechat et al, 1975) la résorption des formes parentérales est par contre rapide, la répartition des antibiotiques polypeptidiques dans l'organisme est exclusivement extracellulaire, il ne franchissent ni la barrière placentaire ni la barrière mammaire, il ne sont donc d'aucun intérêt pour le traitement par voie générale des mammites et posent peu de problèmes pour les résidus dans le lait (Milhaud et al, 1982).

Ils sont excrétés sous forme active dans les urines (Anonyme. c, 2007), (Milhaud et al, 1982).

5.2.9 LES SULFAMIDES

Ce sont des acides faibles, ils sont en général bien absorbés par voie orale et se distribuent largement dans tous les tissus, y compris dans le liquide céphalo-rachidien et synovial (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002).

La transformation se fait au niveau du foie (Anonyme. a, 2007), ils sont partiellement liés aux protéines plasmatiques (Anonyme. b, 2002).

Leurs demi vie est de neuf à douze heures (Anonyme. a, 2007), leur élimination rénale est facilitée à pH alcalin (Anonyme. a, 2007), (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002), (Anonyme. b, 2001) (filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire) (Anonyme. a, 2007) une partie étant préalablement métabolisée dans le foie (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002) en fin élimination accessoirement biliaire et fécale (Anonyme. a, 2007).

5.2.10 LES QUINOLONES

Les fluoroquinolones (antibiotiques faisant partis de la famille des quinolones) sont rapidement et complètement absorbées (80-100 %) par voie digestive chez les monogastriques (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002) des concentrations sériques maximales sont atteintes environ une heure après administration orale. Chez les ruminants, la biodisponibilité orale est plus faible, du fait de leur caractère liposoluble (Anonyme. c, 2007).

Les fluoroquinolones sont peu liées aux protéines plasmatiques (25-50%) (Anonyme. b, 2002) leur distribution tissulaire est large et bonne (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002) et peuvent donc agir sur les germes intracellulaires sensibles (Anonyme. b, 2002).

La demi-vie varie entre trois et onze heures (Anonyme. b, 2002), elles sont partiellement métabolisées par le foie et excrétées sous forme active par la bile et les urines (Anonyme. c, 2007), (Anonyme. b, 2002).

CHAPITRE II

LES MODALITÉS D'APPARITION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

1. CINÉTIQUE DES ANTIBIOTIQUES DANS LA MAMELLE

1.1 RAPPEL SUR LES PRINCIPAUX ANTIBIOTIQUES UTILISÉS POUR LE TRAITEMENT DES MAMMITES

Les mammites représentent la principale pathologie en élevage bovin, le vétérinaire a souvent recours aux antibiotiques pour ses traitements.

Les produits utilisables pendant la lactation doivent permettre une bonne pénétration du principe actif dans le tissu (c'est à dire ayant une forte affinité pour le tissu mammaire et ses sécrétions (Anonyme. c, 2007)) ainsi qu'une élimination rapide. La formulation des produits de tarissement doit permettre un bon maintien des concentrations en principe actif dans le tissu mammaire (en utilisant des suspensions huileuses qui libèrent lentement le principe actif (Anonyme. c, 2007)) (Gehring et Smith, 2006).

Le traitement des mammites comprend :

- **le traitement en lactation**, qui concerne les infections cliniques (visé à traiter les mammites proprement dite) (Guerin et Guerin-Fauble, 2007), les mammites cliniques sont dues pour les deux tiers des cas à des germes Gram + (*Streptococcus uberis* et *Staphylococcus aureus* principalement) et un tiers des cas à des germes Gram - (*E. coli* principalement). Les mammites cliniques font appel à de nombreux antibiotiques notamment ceux représentés dans le tableau 3 (Anonyme. c, 2007), (Guerin et Guerin-Fauble, 2007).

Tableau n° 3 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites en lactation (mammites cliniques) (Guerin et Guerin-Fauble, 2007)

Préparations contenant 1 seul antibiotique	Nom commercial
Céfalexine	Rilexine
Céfopérazone	Pathozone
Cefquinome	Cobactan
Céfazoline	Céfovet
Cloxacilline	Orbenin
Oxacilline	Stapenor

Préparations contenant 2 antibiotiques	Nom commercial
Ampicilline + cloxacilline	Ampiclox
Ampicilline + dicloxacilline	Diclomam
Cloxacilline + gentamicine	Gentamam
Pénicilline G + Dihydrostreptomycine	Masti-péni
Pénicilline G + néomycine	Nemypen
Lincomycine + néomycine	Lincocine
Cloxacilline + colistine	Coliclox, Mammicine, Mammitel
Préparations contenant antibiotiques et anti-inflammatoire	Nom commercial
Amoxicilline + acide clavulanique + prednisolone	Synulox intramammaire
Néomycine + Bacitracine + Tétracycline + prednisolone	Mastijet

- **le traitement hors lactation appelé traitement de tarissement**, qui vise à éliminer les infections subcliniques et à prévenir les nouvelles infections pendant la période sèche (Lescoeur, 2003), cette prévention est obtenue par l'emploi d'antibiotiques à effet retard (Guerin et Guerin-Fauble, 2007) notamment ceux représentés dans le tableau 4.

Selon Anonyme. b (2007), la persistance des antibiotiques après le traitement de tarissement est de :

- 21 jours dans 30% à 90% des quartiers
- 49 jours dans 0 à 30% des quartiers

Tableau n° 4 : antibiotiques utilisés pour le traitement des mammites hors lactation (Guerin et Guerin-Fauble, 2007)

Antibiotiques seuls	Antibiotiques associés
Cloxacilline (Cloxamam, Cloxine HL, Diclomam, Kloxérate DC, Orbenin hors lactation, Orbenor hors lactation, Tarigermel)	Dihydrostreptomycine + Pénicilline G + Nafcilline (Nafpenzal T)
Oxacilline (Stapenor retard)	Pénicilline G + Néomycine (Vonapen HL)
Céfalexine (Rilexine hl)	Cloxacilline + Colistine (Coliclox HL)
Céfazoline (Céfovet)	Rifamixine (Fatrox)
Céphalonium (Cépravin)	Néomycine + Spiramycine (Spéciorlac)
Cefquinome (Cobactan dc)	Cloxacilline + Néomycine (Cloxagel HL 500)

1.2 PHARMACOCINÉTIQUE DES ANTIBIOTIQUES DANS LA MAMELLE

Les études de la pharmacocinétique classique comprennent des dosages du principe actif dans le sang et ou dans le lait sans tenir compte des concentrations atteintes au sein du parenchyme mammaire. Des études plus récentes réalisées sur des mamelles isolées ont montré une certaine diffusion des antibiotiques dans le parenchyme mammaire, de nombreux facteurs peuvent modifier le comportement pharmacocinétique des substances administrées (Gehring et Smith, 2006).

1.3 FACTEURS DE VARIATION DE L'EXCRÉTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

1.3.1 PRINCIPE ACTIF

Le passage dans le lait d'une molécule administrée par voie parentérale est très variable, cela dépend de sa disponibilité dans le sang, de son état d'ionisation (fonction du pKa de la substance et du pH du milieu) et de la liposolubilité (Brouillet, 1994) comme le justifie le tableau 5 pour quelques molécules d'antibiotiques.

Tableau n° 5 : rapports de concentration lait/sérum des antibiotiques en fonction de leur PKa (Guerin et Guerin-Fauble, 2007)

Molécules	Nature	PKa	Liposolubilité	Lait / sérum
Pénicilline G	Acide	2,8	++	0,2
Pénéthamate de pénicilline G	Base	8,5	+++	6,1
Ampicilline	Acide	2,8	+++	0,3
Amoxicilline	Acide	2,8	+++	0,3
Cloxacilline	Acide	2,8	+++	0,2
Céfapirine	Acide	2,6	++	0,2
Streptomycine	Base	8,8	+	0,5
Néomycine	Base	8,8	+	0,5
Gentamicine	Base	8,8	+	0,5
Tétracycline	Amphotère		++	0,6 -1,4
Colistine	Base	10	+	0,3
Spiramycine	Base	8,2	+++	4,6
Tylosine	Base	7,1	+++	4,5
Lincomycine	Base	7,6	+++	4,1

Les antibiotiques bases faibles seront moins ionisés au pH du lait (6,6-6,8) et diffuseront beaucoup mieux que les acides faibles (Sérieys, 2004), (Brouillet, 1994). Les antibiotiques qui ont une forme non ionisée avec un coefficient de partage élevé, c'est à dire une grande liposolubilité, seront mieux absorbés que les acides faibles. Selon Sérieys (2004), Brouillet (1994) et Bouchot (1981) après une injection parentérale on retrouvera donc plus facilement dans le lait :

- les macrolides (spiramycine, érythromycine, tylosine...)
- les tétracyclines
- le chloramphénicol

Les bêta-lactamines, acides faibles, se retrouvent en quantité plus faible, des substances comme la colistine ne se trouvent pratiquement pas dans le lait (Sérieys, 2004), (Brouillet, 1994).

La figure 1 montre le passage des antibiotiques acides faibles et des antibiotiques bases faibles dans le lait

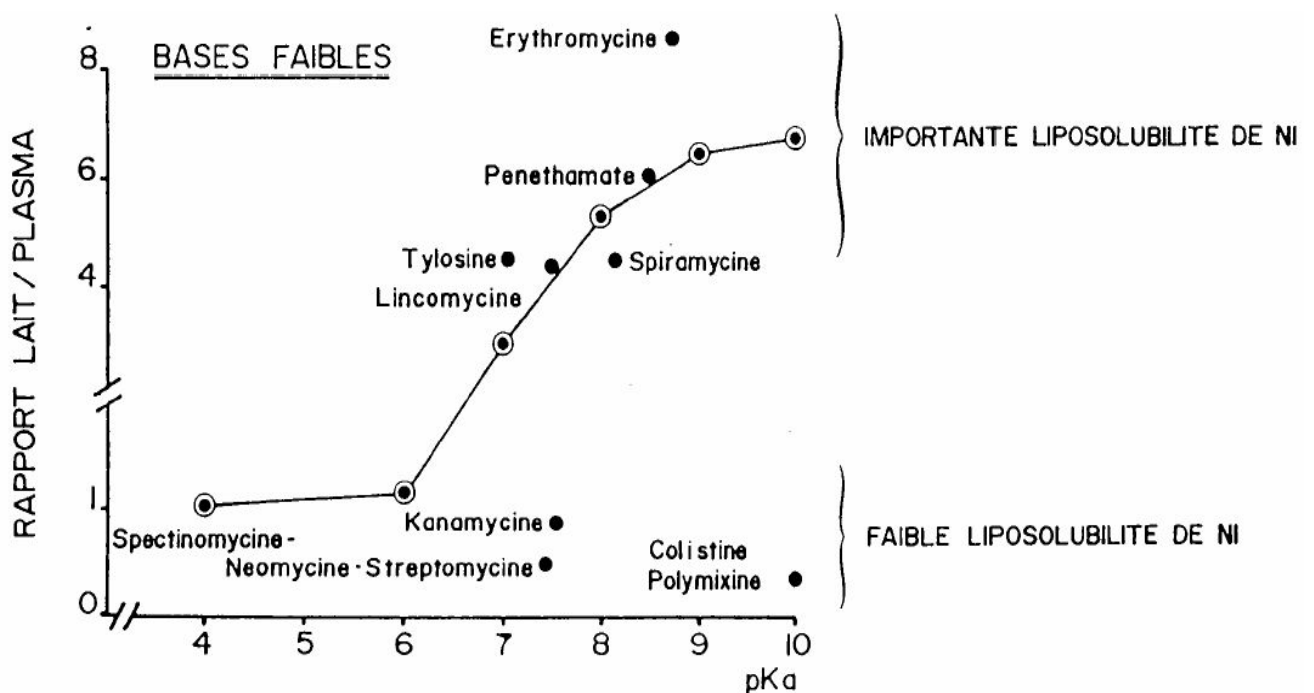


Figure n° 1 : passage sang/lait de l'antibiotique et partition selon pH et pKa (Anonyme. b, 2007),

(Brouillet, 1994)

Lorsque le principe actif est injecté directement dans la mamelle, son affinité pour les tissus de la glande mammaire déterminera en partie sa persistance, les aminosides par exemple ont une affinité toute particulière pour les tissus mammaires (Brouillet, 1994).

1.3.2 RÔLE DE L'EXCIPIENT

Pour les produits injectés par voie parentérale, les excipients huileux entraînent une élimination beaucoup plus longue qu'un excipient aqueux. Une pénicilline procaïne en excipient huileux par exemple aura sa durée d'excrétion majorée de 125 pour cent par rapport à la même pénicilline en milieu aqueux (Brouillet, 1994).

Pour les produits injectés dans la mamelle, le rôle de l'excipient est essentiel, dans la plupart des cas c'est lui qui détermine le délai d'attente (Fabre et al, 2006), (Bouchot, 1981), ce sont les excipients qui entraînent donc la longue rémanence des produits de traitement hors lactation (Brouillet, 1994).

Selon Guerin et Guerin-Faublee (2007), les formes de plus en plus retard par ordre croissant sont les suivantes :

- la solution aqueuse
- la suspension aqueuse
- la solution huileuse
- la suspension huileuse
- la suspension huileuse + adsorbant
- la suspension huileuse + adsorbant + épaississant
- l'ester retard + suspension huileuse + adsorbant + épaississant

La figure 2 illustre le rôle de l'utilisation de quelques l'excipients sur la cinétique de la concentration des antibiotiques dans le lait.

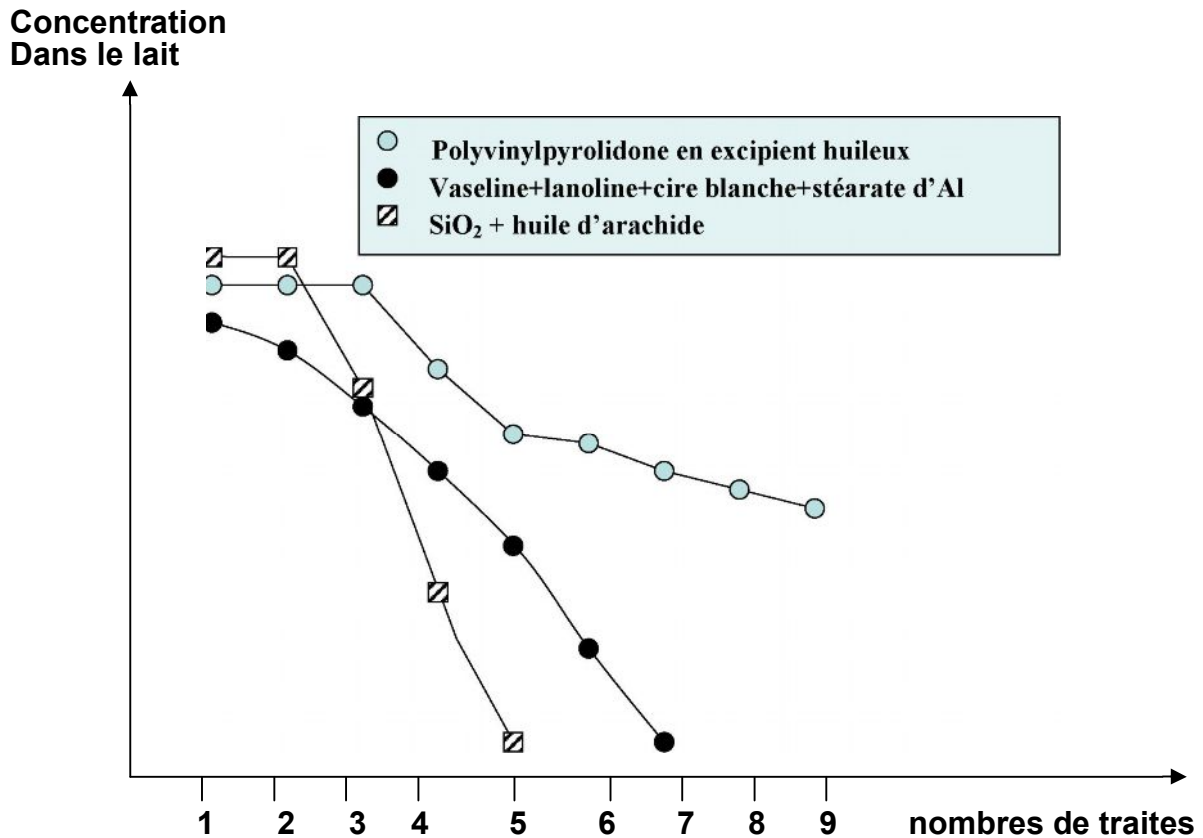


Figure n° 2 : rôle de l'excipient sur la cinétique de la concentration de l'antibiotique dans le lait (Guerin et Guerin-Fauble, 2007)

1.3.3 EFFET DE LA DOSE

L'effet de la dose est important, l'augmentation de celle-ci semble entraîner un allongement systématique de la durée d'excrétion pour les antibiotiques injectés par voie parentérale.

Exemple, lorsque la dose de procaine pénicilline injectée par voie intramusculaire passe de 3.000.000 à 6.000.000 UI, la durée d'excrétion moyenne dans le lait est majorée de 33 pour cent (Brouillet, 1994).

Pour les produits injectés dans la mamelle, une augmentation de la dose peut aussi augmenter la durée d'excrétion mais cela n'est pas systématique (Brouillet, 1994), (Bouchot, 1981).

1.3.4 VOIE D'ADMINISTRATION

Le changement de la voie d'administration peut modifier la concentration d'antibiotique retrouvée dans le lait et la durée de son élimination. D'une manière générale, on remarque que la voie mammaire entraîne une durée d'excrétion beaucoup plus longue que par voie intramusculaire pour un même produit et sa

concentration dans le lait est beaucoup plus importante (Fabre et al, 2006), (Brouillet, 1994), cependant les voies parentérales sont également sources de contamination du lait et ne doivent pas être négligées en raison des hautes doses habituellement utilisées (Lapie, 1981).

L'administration par voie intraveineuse ou intra péritonéale entraîne généralement une durée d'élimination plus courte que par voie intramusculaire (Brouillet, 1994).

Quand les antibiotiques sont apportés par voie orale, on pourrait estimer que le risque d'excrétion par la mamelle ne concerne que les molécules facilement absorbées dans le tube digestif et passent ainsi en majeure partie dans la circulation sanguine (pénicilline, streptomycine, chloramphénicol...) (Lapie, 1981).

1.3.5 DURÉE DE TRAITEMENT

Elle n'entraîne aucune modification de la durée d'élimination, le délai d'attente sera donc le même après la dernière injection d'un traitement multiple qu'après une injection unique du même produit (Brouillet, 1994), (Bouchot, 1981).

1.3.6 FACTEURS LIÉS À L'ANIMAL

L'inflammation du tissu mammaire est responsable de modifications physiques et chimiques à l'origine de variations de la pharmacocinétique des produits administrés. Ainsi, les canaux galactophores peuvent être comprimés par l'inflammation (Sérieys, 2004), la perméabilité vasculaire est également modifiée, on suppose que les principes actifs pénètrent plus aisément en profondeur dans le parenchyme lors des mammites, en raison d'une rupture des jonctions cellulaires de l'épithélium, la composition chimique du lait varie également avec une augmentation du pH, de l'albumine et des leucocytes et une diminution des caséines et des matières grasses (Gehring et Smith, 2006), (Brouillet, 1994).

Ainsi le passage des antibiotiques dans le lait peut être différent par rapport à une vache saine (Brouillet, 1994), (Bouchot, 1981). Il semble également que les vaches à forte production aient une élimination plus rapide que celles à faible production (Gehring et Smith, 2006), (Bouchot, 1981).

2. LES CAUSES DE CONTAMINATION DU LAIT PAR LES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

Le traitement des mammites représente la principale cause de contamination du lait par les antibiotiques (Sraïri et al, 2004), plusieurs causes peuvent ainsi être incriminées :

a) les erreurs commises par l'éleveur, selon Abidi (2004) :

- un mélange accidentel du lait d'une vache traitée avec celui des autres vaches
- une traite, par erreur, d'une vache tarie, récemment traitée par des antibiotiques
- une désinfection défectueuse de la machine à traire
- une non-vérification de l'ancien traitement administré aux vaches en lactation récemment achetées
- un mélange accidentel de l'aliment médicamenteux avec la ration des vaches en lactation.

b) la mauvaise utilisation du médicament, selon Abidi (2004) et Brouillet (1994) :

- non-respect de la dose, car l'augmentation de cette dernière est à l'origine de l'allongement de la durée d'élimination du médicament
- non-respect de la voie d'administration
- utilisation d'une préparation destinée à une vache tarie dans le traitement d'une vache en lactation

c) le non respect du délai d'attente, selon Abidi (2004) et Brouillet (1994)

- défaut de communication entre médecin vétérinaire et éleveurs
- acte volontaire de la part de l'éleveur par ignorance des risques réels de ce geste

d) la contamination par le matériel de traite (Brouillet, 1994), (Abidi, 2004)

e) l'absence d'identification des animaux (Abidi, 2004), (Brouillet, 1994)

f) la mauvaise hygiène lors de la traite, le lait peut être contaminé par les souillures fécales contenant des antibiotiques excrétés par voie digestive (Labie, 1981).

g) l'adjonction volontaire d'antibiotiques dans le lait, après la traite, dans le but d'inhiber le développement de la microflore et d'améliorer la qualité bactériologique du produit (Labie, 1981).

3. LES MESURES DESTINÉES À PRÉVENIR LA PRÉSENCE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Afin de prévenir l'apparition des résidus d'antibiotiques dans le lait, les mesures à entreprendre sont :

- ne pas laisser passer dans le tank le lait d'une vache traitée car il représente la principale cause de contamination (Abidi, 2004)
- respect du délai d'attente (Abidi, 2004)
- la bonne tenue du registre d'élevage, le marquage des animaux traités et des animaux taris (Fabre et Lepoutre, 2002), (Laurentie et Sanders, 2002), (Bouillet, 1994)
- le lait des vaches sous traitement et pendant la période inférieure au délai d'attente doit être recueilli séparément et son élimination doit se faire dans les règles (Abidi, 2004), (Fabre et Lepoutre, 2002)
- en cas de traitement d'un seul quartier atteint de mammite, le lait des quatre quartiers doit être éliminé (Abidi, 2004), (Fabre et Lepoutre, 2002)
- respect de la réglementation et des exigences de l'AMM (Autorisation de la Mise sur Marché), voie d'administration, dose, délai d'attente... (Abidi, 2004)
- lors des traitements hors AMM ; changement de la durée de traitement, dose, etc, le délai d'attente doit impérativement être modifié en prenant une marge supplémentaire de sécurité (Fabre et Lepoutre, 2002), (fabre et al, 2000)
- limiter la surmédication des élevages et favoriser les actions sanitaires et hygiéniques (Bouillet, 1994)

4. LE LAIT

4.1 DÉFINITION

Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante (Lazak et Mâamar, 1978) produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires (Anonyme. h, 2007), il doit être recueilli proprement et ne pas contenir du colostrum (Lazak et Mâamar, 1978).

4.2 COMPOSITION ET CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DU LAIT

Le lait de vache est un liquide opaque de couleur blanche, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène de sa matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur faible mais identifiable (Anonyme, 1998).

C'est un liquide légèrement visqueux dont la composition et les caractéristiques physicochimiques varient sensiblement selon les espèces animales et selon les races. Ces caractéristiques varient également au cours de la période de lactation ainsi qu'au cours de la traite (Anonyme. h, 2007). Le tableau 6 résume la composition chimique du lait chez trois espèces animales.

Tableau n° 6 : composition chimique du lait chez divers mammifères ; composition moyenne du lait en gramme par litre (g/l) (Anonyme. h, 2007), (Anonyme, 2004), (Lazak et Mâamar, 1978)

	Eau	Extrait sec	Matière grasse	Protéines			Glucide : Lactose	Matières minérales
				Totales	caséine	albumine		
Vache	900	130	35-45	30-35	27-30	3-4	45-50	8-10
Chèvre	900	140	40-45	35-40	30-35	6-8	40-45	8-10
Brebis	860	190	70-75	55-60	45-50	8-10	45-50	10-12

Le lait de vache a une densité moyenne égale à 1,032. C'est un mélange très complexe et très instable, il contient une forte proportion d'eau d'environ 87 % (Anonyme. h, 2007).

Sur le plan physique, c'est à la fois une solution (lactose, sels minéraux), une suspension (matières azotées) et une émulsion (matières grasses) (Anonyme. h, 2007), (Anonyme, 1998).

Son pH est légèrement acide (pH compris entre 6,4 et 6,8 pour le lait de vache), l'acidité du lait augmente avec le temps car le lactose va être dégradé en acide lactique (Anonyme. h, 2007).

Le tableau 7 récapitule les principales caractéristiques physicochimiques du lait de vache.

Tableau n° 7 : caractéristiques physicochimiques du lait de vache (Anonyme, 1998)

Constantes	Moyennes	Valeurs extrêmes
(kcal/litre)	701	587 - 876
(MJ/litre)	2 930	2 454 - 3 662
Densité du lait entier à 20 °C	1,031	1,028 - 1,033
Densité de la matière grasse	-	0,94 - 0,96
pH à 20°C	6,6	6,6 - 6,8
Acidité titrable (°Dornic)	16	15 - 17
Point de congélation (°C)	-	-0,520 - 0,550
Tension superficielle du lait entier à 1 5 °C (dynes/cm)	50	47 - 53
Viscosité du lait entier à 20 °C (centipoises)	2,2	-
Conductivité électrique à 25°C (siemens) b	45×10^{-4}	$40 - 50 \times 10^{-4}$
Point d'ébullition (°C)	-	100,17- 100,15
Potentiel d'oxydoréduction	0,25 V	(+0,20) - (+0,30)
Point de fusion des graisses (°C)	36	26 - 42

4.3 VALEUR NUTRITIVE DU LAIT

Le lait est généralement considéré comme un aliment très complet du point de vue nutritionnel car il apporte à la fois des protéines, des glucides, des lipides et des minéraux (Anonyme. h, 2007).

4.3.1 APPORTS EN PROTÉINES

Un litre de lait de vache, qu'il soit entier ou écrémé apporte 35 g de protéines. Il s'agit principalement de caséine, de lactalbumine et de lactoglobuline. Tous les acides aminés indispensables sont présents, ces protéines sont très bien assimilées par l'organisme (Anonyme, 2004).

4.3.2 APPORTS EN LIPIDES

La teneur en lipides du lait de consommation courante est standardisée à un taux minimum de 36 g par litre de lait entier. Cette teneur en lipides confère au lait entier une valeur énergétique importante (700 Kcal soit 2 930 KJ pour 1 litre). Les laits demi écrémé et écrémé apportent respectivement 15 à 18 g et 1 g de lipides par litre. Les triglycérides du lait comportent essentiellement des acides gras saturés (60 à 65 %) et monoinsaturés (32 %). Le lait est pauvre en acides gras essentiels (environ 3 %) et comporte 11 à 15 % d'acides gras à chaîne courte ou moyenne (C4 à C12).

Le lait contient également du cholestérol (lait entier : 140 mg/litre, lait 1/2 écrémé : 90 mg/litre) (Anonyme, 2004).

4.3.3 APPORTS EN GLUCIDES

Le lactose, glucide essentiel du lait, favorise l'absorption du calcium contenu dans cet aliment. Un litre de lait, qu'il soit entier ou écrémé, apporte 50 g de lactose (Anonyme, 2004).

4.3.4 APPORTS EN MINÉRAUX ET OLIGO-ÉLÉMENTS

Le lait est une source importante de calcium : 1 200 mg par litre (les besoins journaliers de l'adulte sont de 900 mg). Le calcium du lait est mieux absorbé que celui de toute autre source grâce à la présence d'éléments favorables (protéines, graisses et un peu d'acide lactique). Il est mieux utilisé par l'organisme car le lait apporte en même temps du phosphore (rapport Ca/P = 1,4) et de la vitamine D. Le lait apporte en outre du chlorure de sodium, du chlorure de potassium, du zinc et de faibles quantités de soufre, de magnésium et de cuivre. Il ne contient pas de fer (Anonyme, 2004), (Enjalbert, 2002).

4.3.5 APPORTS EN VITAMINES

Le lait entier est une source appréciable en vitamine A, la teneur en vitamine D est variable (plus élevée dans le lait d'été que dans le lait d'hiver). Presque toutes les vitamines du groupe B sont présentes, en particulier la vitamine B12 (Anonyme, 2004).

4.4 IMPORTANCE DE LA CONSOMMATION DU LAIT

Selon Enjalbert (2002) le lait et les produits laitiers participent à la couverture des besoins alimentaires, certains composants peuvent jouer un rôle de promoteur de croissance ou de protecteur à l'égard de maladies notamment :

- la casoplatéline et la casoplastrine, inhibent l'agrégation plaquettaire ou la fixation des fibrinogènes
- les phosphopeptides, chélateurs de calcium, qui expliquaient en partie la forte digestibilité du calcium chez le jeune consommant du lait
- les casokinines, à rôle immunomodulateur et antihypertenseur
- les casomorphines, à propriétés opioïdes

- les casoxines, antagonistes des opioïdes
- la lactoferrine, glycoprotéine de transport du fer, possède des fonctions antimicrobiennes

De nombreuses études ont montré que la consommation des produits laitiers pouvait diminuer le risque d'apparition de certains cancers (Enjalbert, 2002).

4.5 IMPORTANCE DE LA CONSOMMATION DU LAIT DANS LE MONDE

La consommation du lait et des produits laitiers n'est connue avec précision que pour les pays développés. Par contre, la FAO dispose pour tous les pays des statistiques des quantités disponibles, par personne et par an, de lait et produits laitiers (le beurre étant exclu) exprimés en équivalent lait, ainsi que la quantité disponible de beurre (Anonyme, 1998) comme le montre le tableau 8.

Tableau n° 8 : les quantités disponibles de lait et de produits laitiers (beurre exclu), par pays (kg/personne/an) (Anonyme, 1998)

Pays	Quantité disponible
Quantité supérieure à 243,4 kg/an (soit 666 g/jour)	
Autriche	251,3
Finlande	337,7
France	277,7
Allemagne (nouveaux länder)	251,8
Allemagne (ex-RFA)	243,5
Islande	302,2
Irlande	323,1
Pays-Bas	298,5
Italie	261,7
Nouvelle-Zélande	267,4
Norvège	278,5
Suède	324,7
États-unis	247,0
Quantité comprise entre 182,6 d 243,4 kg/an (soit entre 500 et 666 l/jour)	
Australie	216,6
Belgique Luxembourg	207,8
Bulgarie	201,3
Canada	228,7
Tchécoslovaquie	1 96,7
Danemark	205,6
Grèce	229,4
Malte	1 83,0
Pologne	234,7
Somalie	206,6
Royaume-Uni	232,7
Uruguay	206,6

4.6 IMPORTANCE DE LA CONSOMMATION LAITIÈRE EN ALGÉRIE

L'Algérie est le premier consommateur laitier du Maghreb avec un marché annuel estimé, en 2004, à 1,7 milliard de litres (Benelkadi, 2007) plus de trois milliards de litres en 2007 (Griffoul, 2007), (Mamart , 2007) et une consommation moyenne de l'ordre de 100 à 110 l/habitant/an. Cette consommation augmente encore régulièrement et devrait atteindre au moins 115 l par habitant et par an en 2010 (Benelkadi, 2007), (Bernard Griffoul, 2007).

La production locale est évaluée à un peu moins de deux milliards (Mamart , 2007), l'Algérie est donc contrainte d'importer des quantités massives de lait, dont la plus grande partie sous forme de lait de poudre qui coûte de plus en plus cher (Griffoul, 2007).

En Algérie, le lait occupe une place importante dans la ration alimentaire car il représente la principale source de protéines d'origine animale, en 1990 par exemple, on estime que le lait a compté pour 65,5 % dans la consommation de protéines d'origine animale, devançant largement la viande (22,4 %) et les oeufs (12,1 %) et cela est due surtout au coût car un gramme de protéines à partir du lait coûte huit fois moins cher que la même quantité à partir de la viande ; en termes énergétiques, une calorie obtenue à partir de la viande est vingt fois plus chère que celle du lait (Amellal, 1995).

CHAPITRE III

LES PROBLÈMES CAUSÉS PAR LES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

L'antibiotique destiné à l'animal est un médicament au même titre que celui destiné à l'homme ; les deux sont soumis à une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) mais le médicament vétérinaire a une exigence supplémentaire ; la fixation d'un temps d'attente. En effet, l'utilisation d'antibiotique pourrait amener à une présence anormale de résidus dans les denrées d'origine animale (Follet, 2007), (Oliveira et al, 2006), (Moretain, 2000).

Selon Moretain (2000), Rexach et Petransxiene (1987), les résidus d'antibiotiques dans le lait peuvent causer des problèmes à deux niveaux :

- hygiénique : toxicité des résidus pour le consommateur
- technologique : entrave la transformation industrielle du lait

1. ORIGINE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

Les résidus d'antibiotiques sont dus aux traitements, ces derniers peuvent être utilisés à titre curatif, préventif ou comme facteur de croissance.

1.1 UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES À TITRE CURATIF OU PRÉVENTIF

Au cours de leur vie, les animaux doivent parfois être traités avec des médicaments destinés à prévenir ou à guérir certaines maladies. Il arrive que des résidus de ces médicaments aboutissent dans des produits alimentaires (viande, lait ou œufs, par exemple) provenant d'animaux producteurs d'aliments tels que bovins, ovins, volailles et poissons (Châtaigner et Stevens, 2005).

En France ce sont les antibiotiques qui représentent la première cause d'inhibiteurs dans le lait (Fabre et al, 2000), (Fabre et al, 1996) et les pics d'antibiotiques sont dus aux traitements par voie intramammaire plutôt qu'aux traitements par voie générale (Sérieys, 2004).

1.2 UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES COMME ADDITIFS ALIMENTAIRES

Les antibiotiques sont utilisés comme facteurs de croissance afin d'améliorer la productivité des élevages (Sanders, 2005), (Bories et Louisot, 1999).

Dans son avis du 28 mai 1999, le comité scientifique directeur de la direction générale de la commission européenne, a déclaré que l'utilisation en tant que facteurs de croissance d'antimicrobiens appartenant aux catégories utilisées en médecine humaine et animale, ou susceptibles de l'être devrait être réduite le plus vite possible et à terme proscrite. Dans un deuxième avis, adopté en mai 2001, ce comité directeur soulignait que ce processus d'élimination devait être planifié et coordonné.

Le règlement n° 1831/2003 du 22/11/2003 de la commission européenne prévoyait la suppression définitive de l'usage des antibiotiques comme additifs en alimentation animale à la fin de l'année 2005 et c'est en 2006 que l'usage d'antibiotiques en tant qu'additifs en vue d'améliorer la croissance et les performances des animaux était banni dans l'union européenne (Guillemot, 2006).

2. DÉFINITION DES RÉSIDUS

Les résidus sont définis comme toutes substances pharmacologiquement active, qu'il s'agit de principes actifs, d'excipients ou de métabolites présents dans les liquides et tissus des animaux après administration des médicaments et susceptibles d'être retrouvés dans les denrées alimentaires produites par ces animaux (Kölbener et al, 2005), (Anonyme, 2003), (Laurentie et Sanders, 2002). Il s'agit de traces indésirables de médicaments ou de produits phytopharmaceutiques ou de dérivés de ceux-ci dans le produit final susceptibles de nuire à la santé humaine (Châtaigner et Stevens, 2005).

3. LE DÉLAI D'ATTENTE ET LA LIMITE MAXIMALE DES RÉSIDUS

La composition du médicament vétérinaire ainsi que ses conditions d'emploi (voie d'administration, posologie) influencent la pharmacocinétique des résidus, par conséquent, le moment où les concentrations dans les denrées alimentaires sont inférieures à la limite maximale des résidus doit être déterminé. Cet intervalle de temps entre l'administration du médicament et ce moment précis constitue le temps d'attente (Laurentie et Sanders, 2002), (Delatour, 1981).

3.1 LE DÉLAI D'ATTENTE

3.1.1 DÉFINITION

Selon la directive 81/851/CEE émise par la communauté européenne, le temps d'attente est défini comme le délai entre la dernière administration à l'animale de l'antibiotique et le moment où celui-ci ne présente plus de résidus dans ses tissus ou dans ses productions (lait, œuf) (Follet, 2007), (Guillemot, 2006), (Abidi, 2004), (Anonyme, 2003), (Puyt, 2003), (Ryckaert et al, 2003), (Laurentie et Sanders, 2002).

Le délai d'attente correspond donc à la durée minimale requise entre le dernier traitement de médicaments recommandé et l'abattage ou la collecte d'aliments (exemple : lait et œufs) (Mitchell, 2005), il est établi pour un schéma thérapeutique bien précis : espèces animales concernées, dose, rythme d'administration, voie d'administration, durée du traitement, etc (Moulin, 2007), (Fabre et al, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Brouillet, 1994).

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 (Moulin, 2007), (Abidi, 2004), (Ryckaert et al, 2003), (Laurentie et Sanders, 2002).

3.1.2 MÉTHODES DE CALCUL DU TEMPS D'ATTENTE DANS LE LAIT

Le calcul du temps d'attente est fondé sur le principe que dans 95 pour cent des groupes d'animaux traités, 95 pour cent des individus produisent un lait avec une concentration inférieure à la limite maximale des résidus (LMR), cependant le risque d'avoir une concentration dans le lait supérieure à la LMR n'est pas nulle mais reste sans danger pour le consommateur (Fabre et Lepoutre, 2002), (Laurentie et Sanders, 2002), (Sachot et Puyt, 2001).

- les méthodes simples de calcul

C'est la méthode traditionnelle où les animaux sont abattus à différentes dates après la dernière administration effectuée selon un schéma prévu dans la demande de l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). Les résidus sont dosés dans les différents tissus, la date d'abattage la plus proche pour laquelle toutes les concentrations résiduelles sont inférieures aux limites maximales des résidus, additionnée d'une marge de sécurité (souvent de l'ordre de 30 pour cent), détermine le temps d'attente. Ce principe simple présente cependant des limites car il est peu

reproductible (l'augmentation du nombre d'animaux allonge le temps d'attente) (Sachot et Puyt, 2001).

- les méthodes européennes de calcul

Largement inspirées des pratiques de l'agence américaine Food and Drug Administration (FDA), le principe de détermination statistique des temps d'attente repose sur l'hypothèse que les quantités de résidus dans les tissus décroissent à vitesse constante. En utilisant la formule suivante : $C_t = C_0 e^{-kt}$.

C_t étant la concentration résiduelle au temps t , C_0 étant la concentration résiduelle virtuelle au temps $t = 0$ et k étant la constante de la vitesse d'élimination (Sachot et Puyt, 2001).

Trois méthodes principales pour le calcul statistique du temps d'attente peuvent être distinguées :

- la méthode dénommée « **Time to Safe concentration (TTSC)** » : consiste à calculer les limites de tolérance du nombre de traites, c'est la méthode recommandée par l'Agence Européenne de l'Evaluation du Médicament (EMA) et généralement utilisée par les industriels (Laurentie et Sanders, 2002), (Sachot et Puyt, 2001).

- la méthode dénommée « **Safe Concentration based on Linear Regression (SCLR)** » : qui dérive de la méthode utilisée par la FDA (Food and Drug Administration) (Laurentie et Sanders, 2002).

- la méthode dénommée « **Safe Concentration per Milking (SCPM)** » : fondée sur la détermination de la limite de tolérance pour chaque point de traite (Laurentie et Sanders, 2002), (Sachot et Puyt, 2001).

3.1.3 EXPRESSION DU TEMPS D'ATTENTE

Initialement : le temps d'attente était exprimé sous forme d'un nombre de traite à éliminer avant de pouvoir commercialiser le lait.

Actuellement : compte tenu des différents types de traites rencontrées, le temps d'attente est exprimé en multiple de 12 heures, par conséquent, il est exprimé en heures ou en jours éventuellement.

Le temps d'attente est noté « zéro » lorsqu'il n'est pas nécessaire d'éliminer le lait après un traitement (Laurentie et Sanders, 2002).

3.2 LA LIMITE MAXIMALE DES RÉSIDUS (LMR)

La fixation des LMR est obligatoire pour tous les principes actifs qui entrent dans des médicaments administrés aux animaux de production. Elle signifie que le potentiel toxique du médicament est parfaitement connu et que le consommateur n'encourt aucun risque si le temps d'attente est respecté et donc si les LMR ne sont pas dépassées (Puyt, 2003).

La fixation de la LMR s'appuie sur les notions suivantes :

- la dose sans effet (DSE)

C'est la plus forte dose ingérée régulièrement et à long terme qui ne produit aucun effet décelable chez l'animal d'expérience, les résultats sont ensuite extrapolés à l'homme. Cette évaluation conduit à définir la dose sans effet (DSE), dénommée par les anglo-saxons « No Effect Level » (NOEL) (Puyt, 2003), (Laurentie et Sanders, 2002), (Delatour, 1981). Partant de cette DSE on calcule la Dose Journalière Admissible (DJA) (Fabre et al, 2006), (Moretain, 2000).

- la dose journalière acceptable (DJA)

À partir de la dose sans effet, on détermine une dose journalière acceptable (DJA) pour l'homme en divisant la dose sans effet par un facteur de sécurité arbitraire de 100 (un premier facteur de 10 en supposant que l'homme est 10 fois plus sensible que l'espèce animale la plus sensible testée multiplié par un second facteur de 10 pour tenir compte des différences de sensibilité entre les individus) à 1 000, selon la nature des effets expérimentaux observés. Cette dose journalière acceptable exprimée en mg/kg par jour 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 (Puyt, 2003), (Laurentie et Sanders, 2002), (Anonyme, 1995), (Delatour, 1981).

En tenant compte d'une répartition théorique des consommations quotidiennes des différentes denrées d'origine animale (foie, rein, muscle, peau, laits, œufs, miels) connue sous le nom de « panier de la ménagère », et sur la base des informations pharmacocinétiques disponibles sur le devenir des substances dans les espèces animales, les experts de l'Agence Européenne de l'Évaluation du Médicament

(EMEA) proposent les limites maximales des résidus (Fabre et al, 2006), (Puyt, 2003), (Laurentie et Sanders, 2002).

3.2.1 DÉFINITION DE LA LIMITE MAXIMALE DES RÉSIDUS (LMR)

C'est la concentration maximale en résidus, résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire considéré comme sans risque sanitaire pour le consommateur et qui ne doit pas être dépassée dans ou sur les denrées alimentaires (Fabre et al, 2006), (Abidi, 2004), (Laurentie et Sanders, 2002).

Le terme LMR peut être défini aussi comme la concentration maximale d'un résidu de médicament vétérinaire, exprimée en parties par million (ppm) ou parties par milliard (ppb) qui est autorisée par la loi ou qui est reconnue comme acceptable dans les aliments ou sur ces derniers (Mitchell, 2005), (Abidi, 2004), (Anonyme, 2003).

Les LMR sont calculées en prenant compte de la santé du consommateur ; le risque toxicologique, le risque microbiologique sur la flore digestive humaine et surtout le risque économique d'inhibition de la transformation du lait (Fabre et al, 2006), (Verhnes et Vandaele, 2002), (Anonyme, 1995), (Brouillet, 1994), le tableau 9 résume les LMR en Europe des principales molécules d'antibiotiques susceptibles d'être retrouvées dans le lait et le tableau 10 démontre une comparaison entre les LMR de l'Europe, des états unis et du codex alimentarius.

Tableau n° 9 : Limite Maximale des Résidus (LMR) des principaux antibiotiques (exprimées en µg/kg ou ppm) (Fabre et al, 2006)

Molécules	Familles d'antibiotique	LMR dans le lait
L'acide Oxolinique	Fluoroquinolones	(0)
Amoxicilline	Bétalactamines	4
Ampicilline	Bétalactamines	4
Bacitracine	Polypeptides	100
Cefacetrile	Bétalactamines	125
Cephalexine	Bétalactamines	100
Cefalonium	Bétalactamines	20
Cefapirine	Bétalactamines	60
Cefazoline	Bétalactamines	50
Cefopérazone	Bétalactamines	50
Cefquinome	Bétalactamines	20
Ceftiofur	Bétalactamines	100
Chloramphenicol	Phenicolés	(0)
Cloxacilline	Bétalactamines	30
Colistine	Polypeptides	50
Chlortétracycline	Tétracycline	100
Danofloxacine	Fluoroquinolones	30
Streptomycine	Aminoglycosides	200
Dicloxacilline	Bétalactamines	30

Difloxacin	Fluoroquinolones	0
Doxycycline	Tétracycline	-
Enrofloxacin	Fluoroquinolones	100
Érythromycine	Macrolides	40
Flumequine	Fluoroquinolones	50
Gentamicine	Aminoglycosides	100
Kanamycine	Aminoglycosides	150
Lincomycine	Macrolides	150
Marbofloxacin	Fluoroquinolones	75
Nafcilline	Bétalactamines	30
Néomycine	Aminoglycosides	1500
Nitrofurane / Furazolidone	Nitrofuranes	(0)
Novobiocine	Macrolides	50
Oxytétracycline	Tétracycline	100
Oxacilline	Bétalactamines	30
Pénicilline (benzylpenicilline)	Bétalactamines	4
Pirlimycine	Macrolides	100
Rifaximine	Ansamycine	60
Spectinomycine	Aminoglycosides	200
Spiramycine	Macrolides	200
Sulfadiazine	Sulfamides	100
Sulfadiméthoxine	Sulfamides	100
Sulfadimidine	Sulfamides	100
Sulfadoxine	Sulfamides	100
Sulphonamides	Sulfamides	100
Sulphafurazole	Sulfamides	100
Sulphamerazine	Sulfamides	100
Sulphaméthazine	Sulfamides	100
Sulphaméthoxazole	Sulfamides	100
Sulphaquinoxaline	Sulfamides	100
Sulphathiazole	Sulfamides	100
Tétracycline	Tétracycline	100
Tilmicosine	Macrolides	50
Tylosine	Macrolides	50

Tableau n° 10 : exemples de LMR du lait en Europe, au États Unis et dans le codex alimentarius (exprimées en µg/kg ou ppm) (Fabre et al, 2006)

Familie d'antibiotique	Molécule	Lait		
		LMR Europe	LMR Codex	LMR USA
Bétalactamines	Pénicilline G	4	4	5
	Ampicilline	4		10
	Cloxacilline	30		10
	Oxacilline	30		50
	Céphaléxine	100		
	Céfalonium	20		
Aminoglycosides	Néomycine	1500	500	150
	Gentamicine	100	200	30
	Streptomycine	200	200	125
	Oxytétracycline	100	100	300
	Chlortétracycline	100	100	300
Macrolides	Spiramycine	200	100/200	
	Tylosine	50		50

3.2.2 LA LÉGISLATION EUROPÉENNE

Au sein de l'Europe, les résidus de médicaments sont réglementés essentiellement par la directive 2001/82/ec et le règlement du conseil 2377/90 (Ed Robb, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Gatermann et Bruns, 2004), (Cinquina et al, 2003), (Maghuin-Rogister et al, 2001).

Ces documents concernent environ 700 substances ou classes de composés dont environ 200 sont soumises aux limites maximales de résidus (LMR), les 500 autres composés ne sont pas associés à des LMR. Une tolérance zéro est appliquée à dix résidus interdits à l'intérieur de l'union européenne dont le chloramphénicol, les nitrofuranes, les nitroimidazolés, les dimetridazoles, les metronidazoles et les ronidazoles. Les autres substances non explicitement mentionnées sont interdites (Gatermann et Bruns, 2004).

Selon Romnée (2007), Berthe et al (2007), anonyme. e (2006) et Aghuin-Rogister (2005), le règlement CEE n° 2377/90 de la communauté européenne définit les limites maximales de résidus (LMR) et comporte quatre annexes :

- annexe I : substances à LMR définitive
- annexe II : substances sans risques (LMR inutile)
- annexe III : substances à LMR provisoire
- annexe IV : substances interdites (risque pour le consommateur)

3.2.3 LA LÉGISLATION ALGÉRIENNE

La législation algérienne dans sa définition du lait, dans l'article 6 de l'arrêté interministériel (le ministère de l'économie, le ministère de l'agriculture et le ministère de la santé et de la population) du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation (Anonyme, 1993), mentionne le fait qu'un lait propre à la consommation humaine ne doit pas contenir des résidus d'antibiotiques mais ne précise pas explicitement des limites maximales de résidus .

4. LES PROBLÈMES LIÉS A LA PRÉSENCE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

Les problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques sont de deux ordres :

- sanitaires
- technologiques

Il faut toutes fois distinguer la notion d'inhibiteurs qui correspond à un problème technologique et la notion de résidus qui correspond à un problème de santé publique (Fabre et al, 2002).

4.1 LES PROBLÈMES SANITAIRES

4.1.1 PROBLÈMES D'ALLERGIE

En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des bêta-lactames (car ces dernières sont à la fois très immunogènes et souvent utilisées (Fabre et al, 2006), (Boatto et al, 1998), (Pepin et Boudene, 1977), (Châtaigner et Stevens, 2005)).

Cependant, compte tenu de très faibles taux de résidus présents dans l'organisme, comparés aux concentrations d'antibiotiques administrées lors de traitement ou de prophylaxie, il est très improbable qu'ils soient à l'origine d'une sensibilisation primaire de l'individu (Châtaigner et Stevens, 2005), (Brouillet, 1994), (Burgat-Sacaze, 1981), (Labie, 1981). D'autant plus, lorsque les antibiotiques sont administrés par voie orale, ils subissent des modifications qui tendent à diminuer leur pouvoir allergène. Les résidus de pénicilline en particulier forment des complexes avec certaines protéines (albumines) par liaisons covalentes, ils sont alors masqués par la structure tertiaire de l'albumine et deviennent inaccessibles aux anticorps. Il est donc peu probable que des dérivés significativement immunogènes puissent être formés (Châtaigner et Stevens, 2005).

Cependant des cas d'allergies aux résidus de pénicilline dans les aliments d'origine animale ont été scientifiquement prouvés, ceux-ci restent extrêmement rares (quelques cas seulement d'allergie à la pénicilline suite à la consommation des produits laitiers, ont été déclarés dans le monde en plusieurs décennies) (Federicci-Mathieu, 2000).

Les réactions allergiques ont été observées chez des personnes déjà sensibilisées, (Cinquina et al, 2003), (Maghuin-Rogister et al, 2001), (Burgat-Sacaze, 1981), (Pepin et Boudene, 1977), avec la pénicilline par exemple, chez des sujets déjà sensibilisés des doses de 0.03 UI/ml dans le lait peuvent être suffisantes pour entraîner des réactions allergiques : urticaires, dermatoses, prurit, choc, etc (Pepin et Boudene, 1977).

4.1.2 RISQUES TOXIQUES

La toxicité directe des antibiotiques est dans l'ensemble extrêmement limitée, le cas de toxicité potentielle fréquemment cité est celui du chloramphénicol (Guy et al, 2004), (Maghuin-Rogister et al, 2001), (Fabre et Joyes, 2000) qui a été responsable d'anémies aplasiques chez l'homme (liées à son utilisation en médecine humaine) (Fabre et al, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Guy et al, 2004), (Labie, 1985), (karst, 1984), (Mihaud, 1981), (Labie, 1981), l'utilisation vétérinaire de cette molécule est désormais interdite un peu partout dans le monde (Fabre et al, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Guy et al, 2004), (Maghuin-Rogister et al, 2001), (Labie, 1985), (karst, 1984).

4.1.3 MODIFICATIONS DE LA FLORE DIGESTIVE DU CONSOMMATEUR

Dans le tube digestif vivent en effet des milliards de bactéries saprophytes et commensales (surtout des bactéries anaérobies : bactéroïdes, fusobactérium (Person, 1981)).

La consommation de produits contenant des résidus d'antibiotiques (cycline, sulfamides) perturbe cette flore intestinale (Moulin, 2007), (Broutin et al, 2005), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Fabre et Joyes, 2000), en modifiant sa composition par inhibition sélective (ils dévastent la flore normale et laissent place à d'autres espèces tel que E. coli, levures...(Person, 1981)) (Abidi, 2004), (Corpet et Brugere, 1995), diminuent ainsi l'immunité naturelle préétablie, ce qui peut entraîner une atteinte du système nerveux, des os, des dents (coloration des dents en jaune), du foie, du sang (Broutin et al, 2005) ainsi que l'apparition de bactéries mutantes résistantes aux antibiotiques, engendrant des échecs thérapeutiques (Moulin, 2007), (Broutin et al, 2005), (Corpet et Brugere, 1995), (Labie, 1981).

4.1.4 RISQUES D'ANTIBIORESISTANCES

Au cours des deux dernières décennies, les agents pathogènes résistants aux antibiotiques sont devenus un sérieux problème de santé publique. Une des raisons de l'augmentation de cette résistance pourrait résider dans l'utilisation préventive et thérapeutique d'antibiotiques en production animale (Gysi, 2006), (Cloeckaert, 2003), (Siousarran, 2003), (Aarestrup, 1999), (Davies, 1997) car les médicaments vétérinaires contiennent en partie les mêmes matières actives qu'en médecine humaine (Gysi, 2006), (Sanders, 2005), (Gaynes et Monnet, 1997). Les bactéries

résistantes sont potentiellement transmissibles à l'homme via les denrées alimentaires (Fabre et al, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Sanders, 2005).

L'apparition de cette résistance peut être liée à des mauvaises pratiques thérapeutiques (posologie inadaptée, fréquence d'administration, non respect de la prescription...) (Fabre et al, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Maghuin-Rogister et al, 2001) ou à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance (sous forme d'additifs alimentaires), favorisant ainsi le développement rapide du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Châtaigner et Stevens, 2005), (Sanders, 2005), (Bories et Louisot, 1999).

Il est important de préciser que la problématique de l'antibiorésistance doit être différenciée de celle des résidus d'antibiotiques. Ceux-ci peuvent avoir des répercussions sur la santé des consommateurs (allergies, etc.) mais ne sont pas en cause dans le développement de l'antibiorésistance. Par ailleurs, il faut souligner que ce ne sont pas les animaux où les humains qui deviennent résistants aux antibiotiques mais bien les bactéries qui les affectent (Follet, 2007), (Fabre et al, 2006), (Châtaigner et Stevens, 2005), (Broes et Boutin, 2003). La figure 3 illustre clairement le réseau de transfert de la résistance aux antibiotiques.

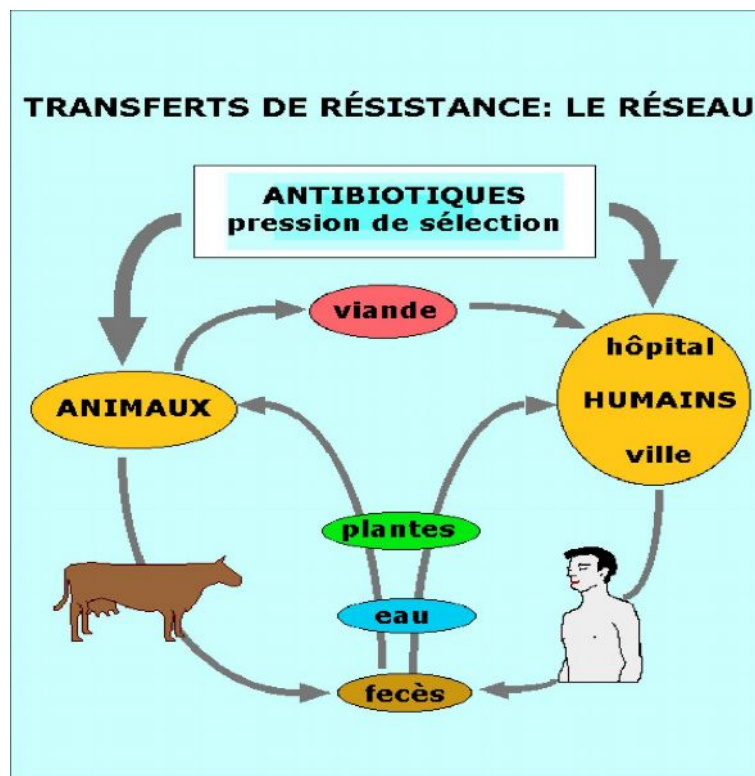


Figure n° 3 : réseau de transfert de la résistance aux antibiotiques (Courvalin, 1998)

4.2 LES PROBLÈMES TECHNOLOGIQUES

Les résidus représentent un réel problème pour les transformateurs laitiers par leurs conséquences néfastes sur les fermentations lactiques (Brouillet, 2002), (Maghuin-Rogister et al, 2001), (Moretain, 2000), (Gaudin, 1999), (Labie, 1981), (Mourot, 1981), (Giraudet, 1978) et constituent le problème majeure des accidents de fabrication (Oliveira et al, 2006), (Ouellette, 2004), (Weisen, 1974).

Les bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*... (Mietton et al, 1994), (Mourot, 1981)) jouent un rôle essentiel comme ferment en acidifiant le lait (car ils transforment le lactose du lait en acide lactique et la présence de cet acide entraîne une baisse du pH (Robb, 2006), (Mietton et al, 1994)) ce qui permet la précipitation des protéines, le développement des arômes et l'inhibition de flores indésirables (Fabre et al, 2006), (Abidi, 2004), (Brouillet, 1994), (Luquet, 1985).

Les bactéries lactiques sont sensibles à de très faibles doses d'antibiotiques (Brouillet, 2002), (Fabre et Joyes, 2000), ainsi la présence de résidus d'antibiotiques inhibent de manière partielle ou totale la croissance de ces ferments et se traduit par de nombreux défauts (Fabre et al, 2006), (Robb, 2006), (Ouellette, 2004), (Siousarran, 2003), (Labie, 1981), (Anifantakis, 1980), (Resi et Johnstone, 1952), notamment les accidents de fabrication du fromage, du yaourt et autres produits de fermentation du lait (Zinedine et al, 2007), (Broutin et al, 2005), (Ryckaert et al, 2003), (Brouillet, 1994).

Les accidents les plus connus sont les défauts de coagulation du lait, l'insuffisance de l'égouttage et les risques de prolifération incontrôlée de germes gazogènes, insensibles aux antibiotiques (Abidi, 2004), (Fabre et Joyes, 2000), (Labie, 1981), (Mourot et Loussouarn, 1981), (Giraudet, 1978), (Weisen, 1974) telles que les Coliformes, Bacillus, Clostridium, Proteus, Aerobacter (Labie, 1981).

Ainsi, Thomas et Panes (1955) ont étudié la fabrication de différents fromages avec du lait de vache et ont constaté que la présence de 0,04 à 0,15 U.I de pénicilline/ml de lait donnait des fromages d'une qualité inférieure à celle des témoins avec une acidité anormale, une humidité élevée, une texture spongieuse et parfois un goût amer ou doux (Anifantakis, 1980).

De ce fait un lait contenant des antibiotiques ou des résidus d'antibiotiques n'est pas apte à la transformation (Broutin et al, 2005).

Les résidus sont responsables de grandes pertes financières qui se répercutent tout le long de la filière laitière (Mitchell, 2005), (Abidi, 2004), (Fabre et Joyes, 2000), (Raskin et al, 1997), (Brouillet, 1994), (Le Talec, 1981).

Exemple : un seul traitement intramammaire peut rendre inutilisable plus de 100 000 litres de lait (Fabre et al, 2006).

CHAPITRE IV

LES MÉTHODES DE DÉTECTION DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES

1. HISTORIQUE ET ÉVOLUTION DES MÉTHODES DE DÉTECTION DANS LE TEMPS

L'utilisation des tests de détection des inhibiteurs est très ancienne, les premiers tests ont été utilisés quelques années après l'apparition des antibiotiques (Brouillet, 2002).

Dés 1952, le premier test de détection des inhibiteurs dans le lait était mis au point, ils étaient fondés sur l'inhibition du développement de différentes souches de bactéries (Fabre et al, 2002), selon ce dernier, deux voies de recherche ont été explorées :

- les recherches microbiologiques ont été améliorées en sélectionnant des souches et en modifiant les milieux de culture pour augmenter la sensibilité à certains antibiotiques et élargir le spectre,
- de nouvelles méthodes (immuno-enzymatique, ...) ont été mises au point pour diminuer le temps d'analyse

Le tableau 11 montre l'évolution des méthodes de détection dans le temps.

Tableau n° 11 : évolution des méthodes de détection dans de temps (Romnée, 2007)

Année	Événements
1952	Développement d'un test de recherche des inhibiteurs dans le lait : <i>Bacillus subtilis</i>
1961	Développement du Br Test utilisant <i>Bacillus stearothermophilus</i>
1975	Développement du Delvotest SP utilisant <i>Bacillus stearothermophilus</i>
1978	Développement du Penzym - test enzymatique
1991	Proposition d'une méthode de détection utilisant <i>Bacillus steathermophilus</i> décision (91/180/CEE)
1994	Passage à la méthode de diffusion en tube
1997	Premier monitoring
2000	Texte relatif aux performances analytiques des méthodes mises en œuvres (Draft SANCO/1085/2000)
2000	Uniformisation : Delvotest MCS sur toutes les livraisons
2004	Abandon de la lecture visuelle au profit de la lecture réflectométrique

2005	Utilisation du Copan Milk Test
2007	Modification de la méthode de confirmation - introduction des tests rapides

2. LES TESTS DE DÉPISTAGE

Le dépistage est effectué au moyen d'une méthode d'analyse qui donne une indication forte de la présence d'un résidu dans un échantillon (Aghuin-Rogister, 2005), les tests de dépistage ont pour objectifs de détecter un maximum de substances différentes à un seuil proche ou inférieur à la limite maximale des résidus. Ils doivent aussi permettre de faire rapidement des analyses sur un grand nombre d'échantillons afin de retenir qu'un faible nombre suspects à soumettre à une méthode de confirmation.

Pour le dépistage, les tests microbiologiques présentent l'intérêt d'avoir un spectre large, néanmoins ils présentent des inconvénients tels que le manque de sensibilité à certains antibiotiques et l'éventuelle sensibilité à des inhibiteurs naturels (Fabre et al, 2002).

Selon Aghuin-Rogister (2005), les tests de dépistage doivent répondre aux critères suivants :

- sensibilité suffisante
- peu coûteux
- rapides
- préparation de l'échantillon réduite au minimum
- applicables à de nombreux échantillons en même temps
- détection de multirésidus
- pas de faux négatifs
- peu de faux positifs

2.1 LA MÉTHODE D'ACIDIFICATION

C'est une méthode d'acidification au *Streptococcus thermophilus*, suivie de la confirmation par la méthode de diffusion sur gélose au *Bacillus stearothermophilus*. Le test officiel français d'acidification est un test de dépistage pour l'ensemble des résidus d'antibiotiques capables d'inhiber le développement de *Streptococcus thermophilus* dans le lait (Anonyme. b, 2005).

Principe :

L'échantillon de lait est préalablement chauffé afin de réduire au maximum sa flore microbienne et de détruire les inhibiteurs naturels. Il est ensuiteensemencé avec une souche de *Streptococcus thermophilus* sensible aux antibiotiques et, en présence du triméthoprim, aux sulfamides ; l'addition d'extrait de levure permet d'accélérer la croissance de l'organisme-test. Après incubation de la culture, la production d'acide par les germes (qui transforment le lactose en acide lactique), révélée par un indicateur de pH et mise en évidence par changement de couleur d'un indicateur ajouté au milieu, est comparée à celle d'une culture témoin préparée à partir de lait exempt d'antibiotiques.

En présence d'antibiotiques ou de sulfamides, la production d'acide de l'organisme-test est ralentie ou complètement inhibée (Anonyme. b, 2005), (Tainturier, 1981) donc il n'y a pas de production d'acide dans l'échantillon, ce qui ne fera pas coaguler le lait et l'indicateur de pH ne changera pas de couleur (Anonyme. a, 1997), (Brouillet, 1994) de ce fait les résultats sont exprimés selon Brouillet (1994) et Tainturier (1981) de la manière suivante :

- résultat positif, lorsque l'échantillon de lait à examiner présente une coloration bleue
- résultat négatif, lorsque l'échantillon de lait à examiner présente une coloration jaune
- résultat douteux, lorsque le lait présente une coloration intermédiaire entre celle du témoin positif et celle du témoin négatif

Seuls les résultats positifs ou douteux sont alors soumis à la confirmation par les tests de diffusion sur gélose (Anonyme. b, 2005) ; faisant intervenir trois germes différents : *Bacillus steatermophilus*, *Bacillus subtilus* et *Bacillus megaterium*.

Les trois tests reposent sur le même principe : un disque de papier filtre imprégné de lait à tester est déposé à la surface d'une gélose ensemencée. Les éventuels résidus diffusent concentriquement dans la gélose autour du disque, ce qui donne, après incubation, une zone dans laquelle le développement du germe a été inhibé (Anonyme. b, 2005), si le diamètre de cette zone d'inhibition est supérieur à 10 mm, le résultat est considéré comme positif (Abidi, 2004), (Brouillet, 1994).

2.2 DELVOTEST

C'est le test le plus utilisé, plusieurs versions sont proposées. C'est un test biologique simple, standardisé, fondé sur la multiplication d'un germe : *Bacillus steatermophilus* var. *calidolactis* (Zinedine et al, 2007), (Reybroeck, 2004), (Brouillet, 2002), (Fabre et al, 2000), (Romnee et al, 1999), (Brouillet, 1994), (Billon, 1981), très utilisé par les laiteries, ce test n'est pas spécifique et offre un large spectre de détection et une bonne sensibilité vis-à-vis des pénicillines (qui représentent le plus grand risque technologique). Le principal inconvénient de ce test est sa durée d'incubation de 2 h 30 à 3 h (Brouillet, 2002), (Verhnes et Vandaele, 2002).

2.2.1 DELVOTEST SP

Présentation et principe

Le Delvotest SP (et ses variantes Delvotest *Mini* ou Delvotest SP 5PACK) est un test de sélection microbiologique à large spectre, permettant de déceler les résidus de substances anti-infectieuses dans le lait à des niveaux proches des limites maximales des résidus, il est particulièrement sensible vis-à-vis des pénicillines, des céphalosporines et des sulfamides (Reybroeck, 2004), (Verhnes et Vandaele, 2002).

Le test se présente sous la forme d'ampoules contenant un milieu géloséensemencé par le germe test (spores de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), avec un indicateur coloré de pH, du triméthoprime et des comprimés de milieu nutritif à incorporer dans les ampoules au moment de leur utilisation, (Reybroeck, 2004), (Abidi, 2004), (Brouillet, 2002).

Un échantillon de 0.1 ml de lait est laissé à diffuser dans le milieu gélosé, l'ampoule est fermée par un ruban adhésif et placée pendant 2 h 30 à 3h dans un petit incubateur à 64 plus au moins 1°C, si le lait ne contient aucune substance inhibitrice, l'indicateur de pH vire du violet au jaune en raison de la production d'acide par le germe. En présence de substances inhibitrices, la couleur du milieu gélosé reste pourpre (violet) car ces dernières empêchent la croissance du germe et par conséquent la production d'acide (Scippo et Maghuin-Rogister, 2006), (Abidi, 2004), (Reybroeck, 2004), (Brouillet, 2002), (Moretain, 2000), (Archimbault et al, 1978), les résultats sont présentés sur la figure 4.

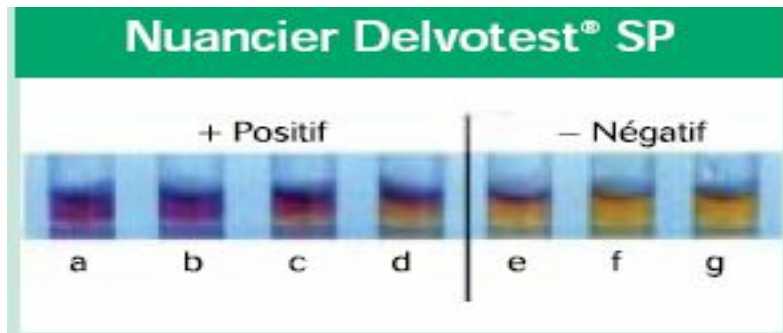


Figure n° 4 : expression des résultats de Délvotest SP (Reybroeck, 2004)

2.2.2 LE DELVO X PRESS

C'est un test rapide, immuno-enzymatique, qui détecte les résidus de bêta-lactamines présents dans le lait en 10 min. Ce test est fondé sur le dosage de l'excès d'un réactif spécifique et l'interprétation est effectuée par une mesure colorimétrique.

Principe :

Le test consiste à faire réagir une quantité déterminée de lait avec une quantité précise d'une solution appelée "Tracer" (qui a pour fonction de complexer les bêta-lactamines). Après un certain temps de contact suffisant, le mélange est versé dans un tube contenant un enduit qui réagit avec l'excédent de traceur libre. Le complexe bêtalactamine-Tracer est éliminé par rinçages successifs.

Un développeur colorimétrique réagit ensuite avec le tracer fixé sur la paroi du tube et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration des bêtalactamines dans le lait testé.

La lecture s'effectue avec un lecteur de densité optique (spectrophotomètre) qui compare la couleur du tube avec celle d'un tube standard (Abidi, 2004), (Brouillet, 2002), (Moretain, 2000).

2.3 COPAN MILK TEST

Le Copan milk est un test microbiologique, très proche de Delvotest, il utilise aussi *Bacillus steatermophilus var. calidolactis*, nécessite la même durée et la même température d'incubation, le même réactif coloré mais il est prêt à l'emploi, son milieu gélosé contient tous les ingrédients pour la réaction (Brouillet, 2002).

Principe :

0.1 ml de lait à tester est introduit dans une ampoule à l'aide d'une pipette à embout jetable, l'ampoule est fermée au moyen d'un ruban adhésif et placée pendant trois heures à 64 plus au moins 0.5°C dans un petit incubateur, il y a virage au jaune du milieu s'il y'a absence de substances antibiotiques alors que le milieu reste violet en présence de cette dernière (Reybroeck, 2004) comme le montre la figure 5.

Le Copan milk test présente un haut degré de sensibilité permettant ainsi la détection d'un large spectre d'antibiotiques (Reybroeck, 2004).

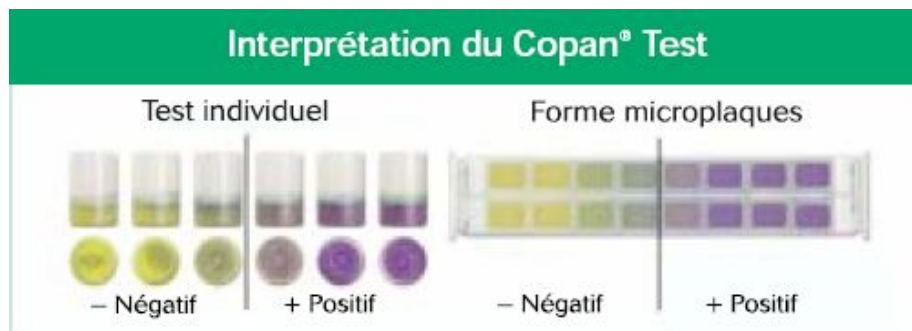


Figure n° 5 : interprétation des résultats de Copan milk test (Reybroeck, 2004)

2.4 VALIO T101

Il présente le même principe que Delvotest mais utilise *Streptococcus thermophilus* (bactérie mise en œuvre dans la fabrication du yaourt et dans les tests d'inhibition de l'ancienne méthode officielle). Le révélateur d'acidification est aussi un réactif coloré. La sensibilité du test avait l'avantage d'être très voisine de celle de Delvotest (Brouillet, 2002), (Moretain, 2000) mais il est plus long dans son opération, ce qui en limite davantage l'intérêt (Verhnes et Vandaele, 2002).

2.5 β -STAR

C'est un test rapide, simple d'emploi, du type Récepteur Assay. Le test est basé sur l'emploi d'un récepteur spécifique lié à des particules d'or (Scippo et Maghain-Rogister, 2006), (Anonyme. b, 2005), (Reybroeck, 2004), (Brouillet, 2002), (Maghain-Rogister et al, 2001), (Moretain, 2000). Il permet la détection rapide, dans le lait, des résidus de pénicillines et de céphalosporines (Anonyme. b, 2005), (Moretain, 2000).

Principe

0.2 ml de lait est aspirée à l'aide d'une pipette et déposée dans le flacon contenant le lyophilisat (récepteur spécifique lié à des particules d'or), le flacon est refermé au moyen du bouchon en caoutchou puis retourné et secoué afin de dissoudre complètement le lyophilisat. Le flacon est mis à incuber pendant trois minutes à 47 plus au moins 1°C dans l'incubateur, la bandelette est alors placée dans le flacon qui est laissé à incuber pendant deux minutes supplémentaires, le résultat est lu sur la bandelette (Reybroeck, 2004), (Brouillet, 2002).

Au cours de la première incubation, les antibiotiques du type β -lactames présents dans le lait se lient au récepteur.

Pendant la deuxième incubation, le lait migre sur un support immunochromatographique qui présente deux bandes de capture ; la première bande retient tous les récepteurs non liés aux antibiotiques pendant la première étape, faisant apparaître une coloration rouge intense lors de l'absence de résidus et une absence de coloration en cas de présence de bêta-lactamines en excès car les complexes récepteurs-antibiotiques formés ne peuvent pas se lier à cette bande ; donc plus il y aura d'antibiotiques présents dans l'échantillon moins il y aura de récepteurs libres susceptibles de migrer sur le support, par conséquent la première bande de capture sera moins visible.

La seconde bande est dite de référence, basée sur la fixation d'un anticorps, elle fait apparaître dans tous les essais une coloration rouge d'égale intensité, elle permet donc de contrôler le bon déroulement du test (Anonyme. b, 2005), (Maghuin-Rogister et al, 2001), le principe des réactions du β -STAR est résumé sur la figure 6.

Le résultat est exprimé en comparant l'intensité des deux bandes, si le lait est négatif la bande-test se colore en rouge plus intense que la bande-témoin, s'il est positif la bande-test est totalement absente (Scippo et Maghuin-Rogister, 2006), (Reybroeck, 2004) comme le montre la figure 7.

Le β -STAR étant un test qualitatif, voire semi-quantitatif (Maghuin-Rogister et al, 2001).

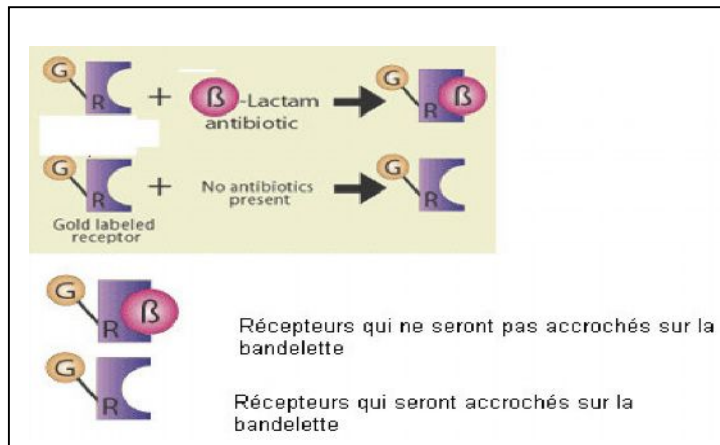


Figure n° 6 : principe de réaction du β -STAR (Anonyme. b, 2005)

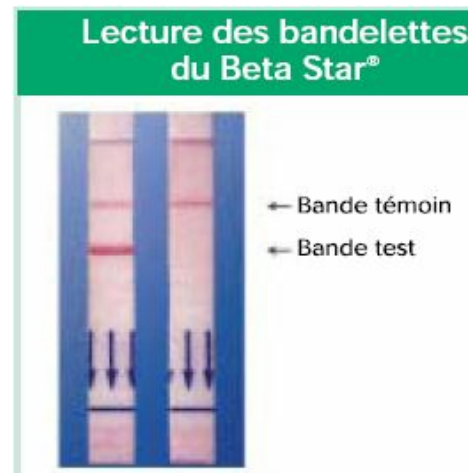


Figure n °7 : interprétation des résultats du β -STAR (Reybroeck, 2004)

2.6 PENZYM TEST

Le Penzym est un test qualitatif, facile d'emploi, très rapide et spécifique des antibiotiques de la famille des bêtalactames et se base sur une réaction enzymatique et colorimétrique (Brouillet, 1994).

Principe

L'enzyme DD-carboxypeptidase est mélangé au lait par simple pipetage et mis à incuber à 47°C, après 5 min, un comprimé qui contient tous les réactifs nécessaires est ajouté, 15 min plus tard, la coloration du tube est comparée à une carte de couleur. Le développement d'une coloration rose indique que le prélèvement est négatif (Abidi, 2004), (Brouillet, 2002), (Moretain, 2000), (Brouillet, 1994).

Le principe est le suivant :

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

En résumé :

Lait + antibiotique + enzyme (DD-carboxypeptidase) --> {AB-Enzyme} donne un complexe stable

Enzyme en excès + substrat (R-D-Ala-D-Ala) --> D-Ala hydrolysée

D-Ala + D-amino acide oxydase --> acide pyruvique + H₂O₂

H₂O₂ + o-dianisidine + peroxydase ---> indicateur organique redox

Selon Maghuin-Rogister et al (2001) et Moretain (2000), si la couleur finale est :

- rose orange --> l'échantillon est négatif
- orange --> l'échantillon est douteux
- jaune --> l'échantillon est positif

2.7 SNAP TEST

Il utilise une méthode immuno-enzymatique, les récepteurs peuvent se lier soit à l'antibiotique contenu dans le lait, soit aux antibiotiques fixés à la surface du test.

Chaque kit individuel prêt à l'emploi comprend une pipette pour le prélèvement du lait, un tube à essai contenant une pastille réactif (récepteur), un dispositif snap « encliquetable » et un bloc chauffant pouvant contenir de deux à six tests.

Principe

Le lait et le récepteur sont mis en contact pendant 5 min à 45 °C et sont ensuite versés dans le puit de l'échantillon du dispositif Snap. Le liquide migre ensuite sur le cercle d'activation bleu qui se décolore. Pendant cette migration, les récepteurs encore libres se lient aux antibiotiques fixés au niveau de la tache échantillon.

La lecture est réalisée après 4 min soit visuellement soit à l'aide d'un lecteur automatique en comparant la tache témoin et la tache échantillon (Reybroeck, 2004), (Brouillet, 2002), (Moretain, 2000) comme le résume la figure 8.

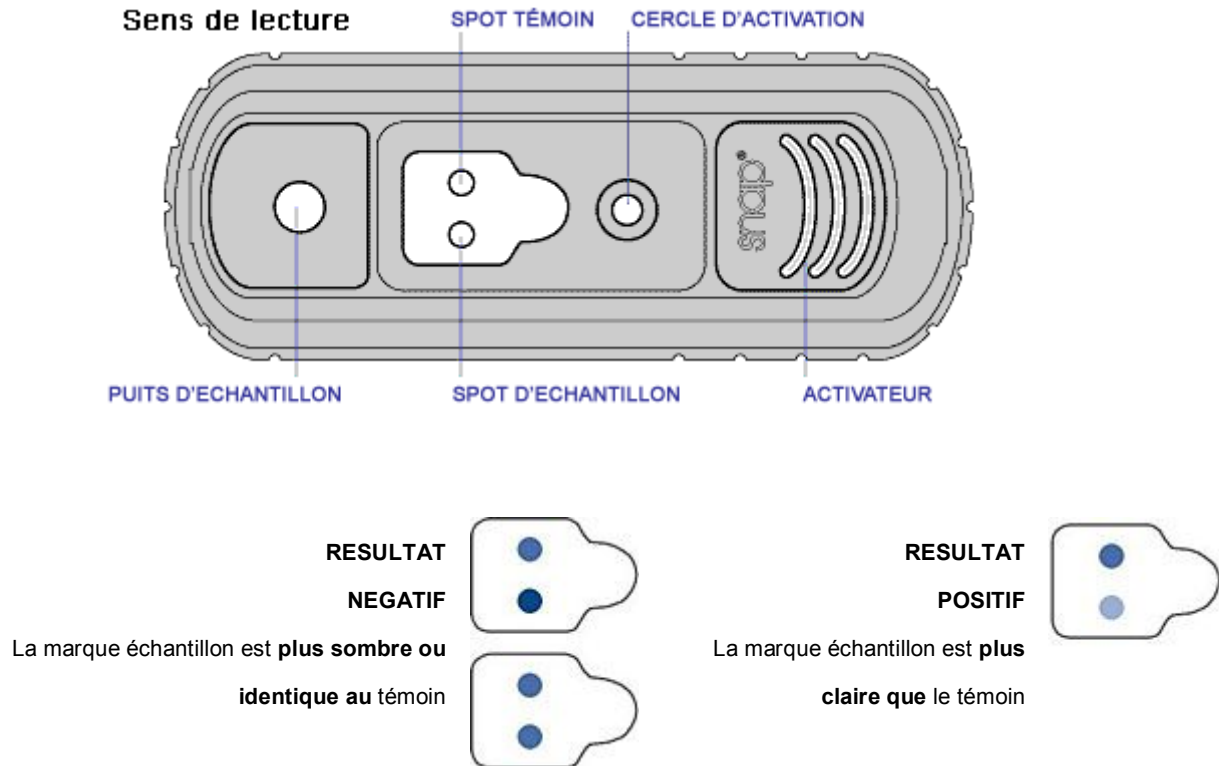


Figure n° 8 : lecture du Snap test (Reybroeck, 2004)

2.8 CHARM TEST

Il permet la détection de nombreux antibiotiques (pénicilline, tétracycline, macrolides, sulfamides, aminoglycosides...) par une réaction d'immunocompétition entre la molécule à rechercher et une molécule marquée au C14 ou H3 (Brouillet, 2002), (Moretain, 2000).

C'est un test de compétition mesuré par radioactivité (propriétés de scintillement du lait contaminé) qui permet une identification précise et un dosage, qui peut être calé sur les seuils des limites maximales des résidus. Il nécessite un investissement important mais permet d'identifier l'inhibiteur présent (Brouillet, 2002), (Verhnes, 2002).

Principe :

Le principe est simple, on met en contact une culture de bactéries (récepteur) avec un antibiotique marqué qui se fixe sur le site spécifique des bactéries. Si le même antibiotique est présent dans le lait à tester il y'a compétition et une partie des molécules marquées ne se fixe pas. Après centrifugation et filtration, on effectue le dosage avec un compteur de particules, par comparaison avec un témoin négatif

(Brouillet, 2002) ce qui est illustré sur la figure 9.

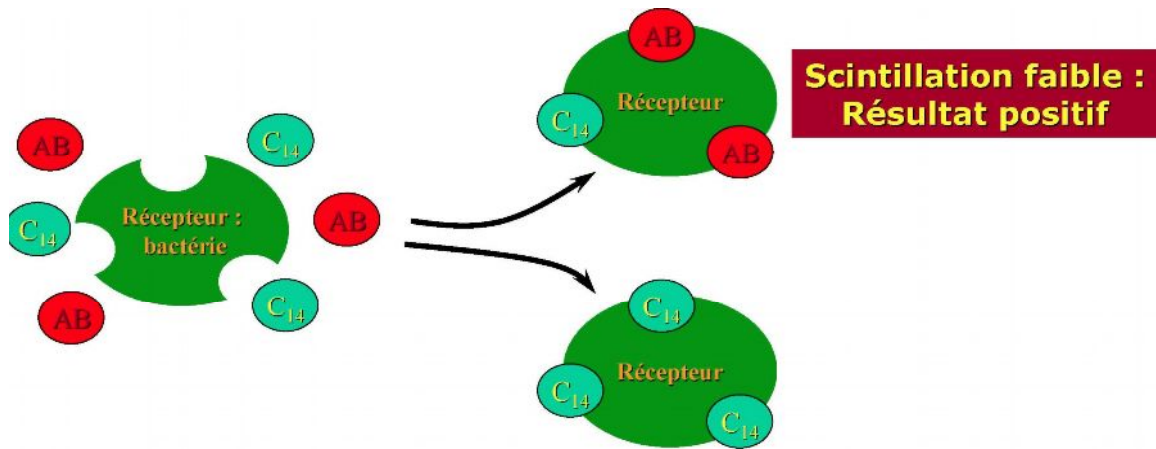


Figure n° 9 : principe de Charm test II (Verhnes, 2002)

2.9 TESTS ELISA

Il est rapide (de quelques minutes à 20 minutes) mais onéreux. Il est spécifique pour une famille d'antibiotiques (souvent les β lactamines) et sensible pour cette dernière, sa limite de détection est souvent inférieure à la limite maximale des résidus (Abidi, 2004), (Verhnes, 2002).

2.10 LE SYSTÈME DE DÉTECTION BASÉ SUR DES MICROBILLES MAGNÉTIQUES

Pour détecter la présence d'antibiotiques dans le lait, des laboratoires européens ont mis au point un système basé sur des microbilles magnétiques sur lesquelles sont greffés des anticorps. Rapide et précis, il peut servir à détecter tous types de contaminants dans les liquides.

Le principe de détection retenu pour ce système est le suivant :

Premier temps : des billes magnétiques sont mises en suspension dans le lait à tester. Des anticorps spécifiques de l'antibiotique à détecter ont été greffés sur ces billes ; l'antibiotique va donc "s'accrocher" aux billes partout où il est présent.

Deuxième temps : les billes lavées et rincées sont dirigées grâce à un aimant jusqu'à un guide d'onde transparent, sur lequel ont été greffés d'autres anticorps spécifiques de l'antibiotique. Ce dernier, déjà accroché à la bille par l'un de ses site, s'accroche également au guide d'onde qui se trouve alors recouvert d'un agglomérat

plus ou moins dense (selon la teneur en antibiotique du lait) de billes.

Troisième temps : un système optique vient mesurer le changement d'indice de réfraction du guide d'onde et déduit la densité de billes et la concentration en antibiotiques du lait.

La détection est rapide (10 minutes) et précise : 10 ng/ml de limite maximale de détection (Caillat, 2007).

3. SEUILS DE SENSIBILITÉ DES DIFFÉRENTS TESTS DE DÉPISTAGE

Les différents tests de dépistage présentent des seuils de sensibilités variés qui sont représentés dans le tableau 12.

Tableau n° 12 : sensibilité des différents tests de dépistages aux antibiotiques (Brouillet, 2002) (les valeurs sont exprimées en µg/ml)

	LMR Europe	Delvo SP	Delvo X Press	Penzym	Charm II	Snap	Copan milk	β-STAR
Pénicilline	4	2 - 2,5	2-4	4-9	3	2-3	2	2-4
Amoxicilline	4	4	4-8			6	2	2-4
Ampicilline	4	5	4-6	3-7	2	6-10	2	2-4
Cloxacilline	30	15-25	30-40	30-100	30	30	15	5-10
Tétracycline	100	100-600	Nd	Nd	30	30	250-500	Nd
Néomycine	500	100-2000	Nd	Nd	10	Nd	1000	Nd
Céfalonium	32	5-25	4	10-20	*	*	*	7,5
Céftiofur	100	4-8	*	*	*	6	50	2
Céfalrxine	20	40-100	25-50	20-25	*	*	*	*
Spiramycine	200	200	Nd	Nd	50	Nd	>800	Nd
Tylosine	50	10-100	Nd	Nd	50	Nd	50	Nd

Nd : non détecté, * : donnée non connue.

CHAPITRE V

LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

1. HISTORIQUE

Après les travaux de Mikhail Semenovitch Tswett du début du siècle, c'est dans un premier temps la chromatographie sur colonne qui prend un essor considérable. Ainsi, Reichstein en 1938 montre le principe de l'élution des composés dans une colonne après leur séparation. En 1952, l'utilité des gradients d'élution est montrée puis, vers les années 1960, la chromatographie par perméation sur gel se développe. On peut situer en 1967, grâce aux travaux de Huber et Huzsman, le début de la chromatographie liquide à haute vitesse, plus tard appelée à juste titre chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Anonyme. f, 2007).

2. DÉFINITION ET GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie est une méthode analytique, physicochimique qui a pour but la séparation des différents constituants d'un mélange même très complexe (Anonyme. b, 2006), (Anonyme. c, 2006), (Canadas, 2006), (Panaiva, 2006).

Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (un liquide ou un gaz) que l'on appelle la phase mobile ; elles interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec un support fixe (un solide ou un liquide fixé) que l'on appelle la phase stationnaire. Il y a donc une distribution ou partition des composants entre ces deux types de phases (Dubreuil, 2007), (Panaiva, 2006), (Anonyme. a, 2005), le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe qui va les séparer les unes des autres (Anonyme. i, 2007), (Anonyme. b, 2006), (Anonyme. a, 2005), la chromatographie permettra donc l'identification et la quantification de chacun des solutés initialement présents dans la solution analysée (Anonyme. i, 2007), (Anonyme. b, 2006).

3. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Une analyse HPLC permet la séparation de composés en solution élués à travers une colonne chromatographique à l'aide d'une phase mobile liquide, elle même percolée grâce à une pression élevée. Il existe une réelle interaction triple entre l'analyte, la phase stationnaire et la phase mobile basée sur l'affinité physicochimique entre les trois (Marcoz, 2003).

3.1 PRINCIPE

La phase mobile parcourt un tube appelé colonne, cette colonne peut contenir des granulés poreux (colonne remplie) ou être recouverte à l'intérieur d'un film mince (colonne capillaire). Dans les deux cas, la colonne est appelée phase stationnaire (Anonyme. c, 2006).

Le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il se dilue dans la phase mobile qui l'entraîne à travers la colonne (Anonyme. f, 2007), (Anonyme. c, 2006), ce mélange doit être poussé à haute pression afin d'assurer un débit constant dans la colonne et y éviter toute perte de charges (Anonyme. f, 2007).

Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange appelés généralement les solutés, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne (Anonyme. c, 2006).

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 (Anonyme. c, 2006). Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile) (Anonyme. b, 2006), (Panaiva, 2006).

Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme, en effet, il dirige sur un enregistreur un signal constant appelé ligne de base en présence du fluide porteur seul ; au passage de chaque soluté séparé, il conduit dans le temps à l'enregistrement d'un pic (Anonyme. c, 2006).

Dans des conditions chromatographiques données, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté), caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire limitée par

ces pics et la prolongation de la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté (Anonyme. c, 2006).

Le principe est donc d'exploiter les interactions entre les solutés et les deux phases (mobile et stationnaire) pour séparer ces solutés en fonction de leurs affinités et ainsi de les identifier et ou de les doser (Panaiva, 2006).

La chromatographie liquide haute performance classique fait intervenir des mécanismes d'échange soluté, phase mobile et phase stationnaire, basés sur les coefficients de partage ou d'adsorption selon la nature des phases en présence (Anonyme. f, 2007), (Marcoz, 2003).

3.2 INSTRUMENTATION

Selon Anonyme. e (2007), Anonyme. f (2007), Anonyme. g (2007), dans tous les appareils de chromatographie liquide haute performance, on retrouve un ensemble de modules reliés entre eux par des tubes de faible diamètre :

- un ou plusieurs réservoirs de phase mobile
- une ou plusieurs pompes
- un système d'injecteur
- des colonnes
- un ou plusieurs détecteurs
- et un ordinateur (enregistreur)

Ces modules sont illustrés sur la figure 10.

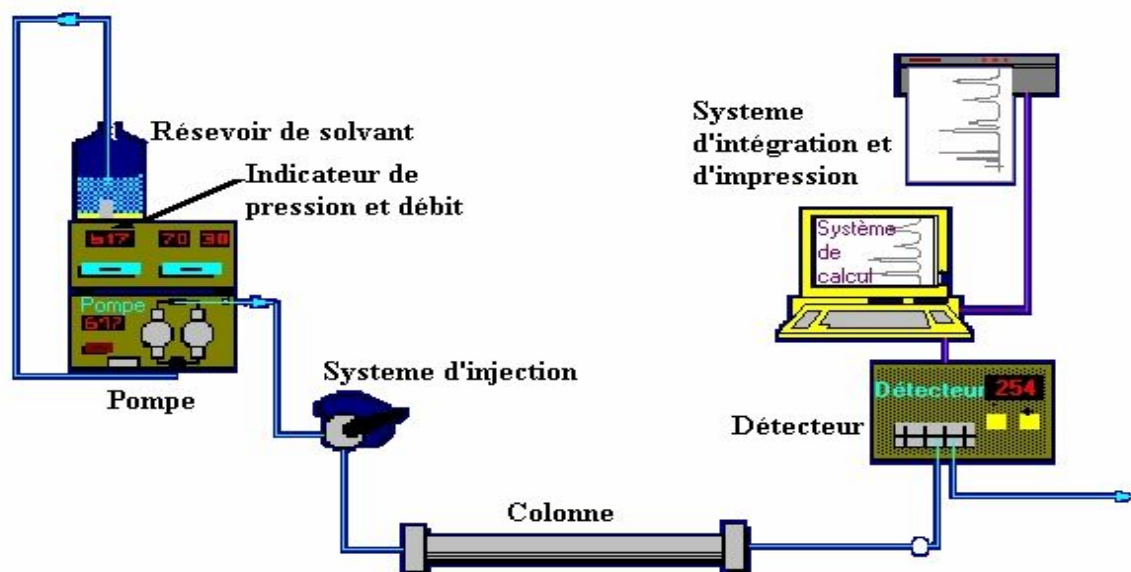


Figure n° 10 : instrumentation de l'HPLC (Anonyme. d, 2007)

3.2.1 RÉSERVOIRS DES SOLVANTS

Ils contiennent la phase mobile en quantité suffisante, plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide des pompes (Anonyme. c, 2006).

3.2.2 POMPES

Les pompes utilisées en HPLC permettent de délivrer les solvants à débit constant sous de fortes pressions pouvant atteindre quelques centaines de bar (70 bars, 1000 psi) (Anonyme. g, 2007), elles sont munies d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elles permettent donc de travailler en mode isocratique (avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse) ou en mode gradient (une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants) (Anonyme. c, 2006).

Les pompes actuelles ont un débit variable de quelques μl à plusieurs ml/min (Anonyme. c, 2006).

Par définition le débit correspond au volume de la phase mobile circulant au travers de la colonne chromatographique par unité de temps ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) (Anonyme. b, 2006).

3.2.3 INJECTEUR OU VANNE D'INJECTION

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes : 10, 20, 50, ... μl . Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, sans variation importante de la pression, dans le circuit allant des pompes vers l'entrée de la colonne ; ce qui est important pour l'analyse quantitative (Anonyme. g, 2007), (Anonyme. c, 2006) la figure 11 montre le mécanisme de fonctionnement des boucles d'injection.

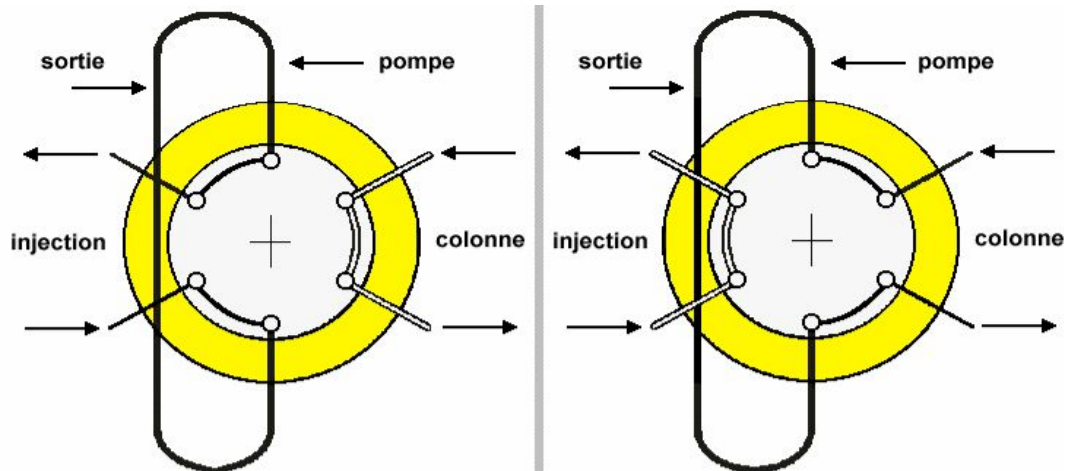


Figure n° 11 : Injecteur à boucle à gauche, le remplissage de la boucle à droite, l'injection dans la colonne (Dubreuil, 2007)

3.2.4 COLONNE

C'est un tube qui doit être en inox ou en verre (inerte aux produits chimiques). Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm (Anonyme. c, 2006), il renferme la phase stationnaire qui peut être polaire (phase normale) ou non polaire (phase inverse) (Anonyme. b, 2006).

La phase normale : elle est constituée de gel de silice ; ce matériau est très polaire, il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaires qui sortent en tête (Anonyme. c, 2006).

L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations (Anonyme. c, 2006).

La phase inverse : elle est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C_8 et C_{18}). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (acétonitrile, méthanol, eau). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier (Anonyme. c, 2006).

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

3.2.5 DÉTECTEURS

Placé en sortie de colonne, le détecteur enregistre un signal (électrique ou optique) en fonction du temps caractéristique du passage progressif des solutés (Anonyme. b, 2006).

Deux types de détecteurs sont classiquement utilisés :

Le détecteur UV-visible : il mesure l'absorption de la lumière par le produit à la sortie de la colonne et opère à longueur d'onde constante, celle-ci étant fixée par l'opérateur. La lampe Deutérium est utilisée pour des longueurs d'ondes variant de 190 à 350 nm et la lampe à vapeur de mercure est utilisée à la longueur d'onde non variable de 254 nm (Anonyme. b, 2006), (Anonyme. c, 2006).

Selon Anonyme. b (2006) et Anonyme. c, (2006), pour que ce type de détecteur soit utilisable, il faut que :

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

Le réfractomètre : il mesure la variation de l'indice de réfraction du liquide à la sortie de la colonne. Cette mesure, extrêmement précise, dépend néanmoins de la température du liquide. On compare cet indice avec celui de la phase mobile pure : il y a donc une référence d'où le terme de variation de l'indice.

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

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

3.3 LE CHOIX DES SOLVANTS

Le choix du solvant organique dépend grandement de l'hydrophobicité des molécules à séparer ; pour des molécules très hydrophobes, on peut choisir d'utiliser une forte concentration d'un solvant organique de polarité moyenne ou une faible concentration d'un solvant organique de polarité faible.

Les solvants organiques ne doivent pas comporter d'impuretés ni avoir une forte absorbance aux faibles longueurs d'onde (ultra-violet) pour ne pas interférer avec les propriétés optiques des molécules à séparer. De plus selon sa qualité, on peut ou non utiliser un solvant organique pour un type d'analyse donné. En conséquence, il faut prendre des solvants certifiés ultra-purs (Anonyme. a, 2005).

L'équilibre en adsorption est un phénomène de compétition, les molécules de la phase mobile entrent en compétition avec les molécules de solutés pour les sites polaires d'adsorption (séparation liquide-solide). Plus l'interaction entre la phase mobile et la phase stationnaire est forte moins l'adsorption du produit en solution sera importante et vice-versa. Les solvants sont donc classés selon leur force qui va dans le même sens que leur polarité (Dubreuil, 2007), cette classification est démontrée dans le tableau 13.

Tableau n°13 : Propriétés de quelques solvants utiles pour la chromatographie en phase liquide (Dubreuil, 2007)

Solvant	UV cutoff (nM)	Polarité (P)
Isooctane	215	0,1
Hexane	195	0,1
Toluène	284	2,4
Méthyl-t-butyléther	210	2,5
Dichlorométhane	233	3,1
Propanol-1	210	4,0
Tétrahydrofurane	212	4,0
Chloroforme	245	4,1
Éthanol	210	4,3
Acétate d'éthyle	256	4,4
1,4-Dioxane	215	4,8
Acétone	330	5,1
Méthanol	205	5,1
Acétonitrile	190	5,8
Acide acétique	-	6,0
Eau	190	10,20

3.3.1 LA POLARITÉ

Les polarités des phases mobiles et stationnaires sont déterminantes pour obtenir une bonne séparation des solutés. Selon Anonyme. e (2007), Anonyme. b (2006) et Anonyme. c (2006), il existe deux possibilités :

- **la chromatographie en phase normale** : la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est non polaire. Les solutés sont séparés dans l'ordre de leur polarité croissante.
- **la chromatographie en phase inverse** : la phase stationnaire est non polaire et la phase mobile est polaire. Les solutés polaires seront entraînés rapidement par la phase mobile polaire tandis que les solutés peu polaires seront retenus par la phase stationnaire non polaire.

3.3.2 LES GRADIENTS D'ÉLUTION

Les interactions moléculaires ont lieu entre le soluté et les phases mobiles et stationnaires simultanément.

Si la composition de la phase mobile est maintenue constante durant toute l'analyse, la séparation sera dite mode isocratique. Si la composition est modifiée progressivement, la séparation sera dite mode avec gradient d'éluion (Dubreuil, 2007), (Anonyme. b, 2006), qui en phase normale est utile pour la séparation de solutés de polarités très différentes. En phase inverse il sert à la séparation des substances de masses molaires différentes d'une série homologue (Dubreuil, 2007).

3.4 ANALYSES DES CHROMATOGRAMMES

Une bonne séparation se traduira par une séparation distincte des pics correspondant à chacun des produits, la figure 12 montre la différence entre un bon et un mauvais chromatogramme.

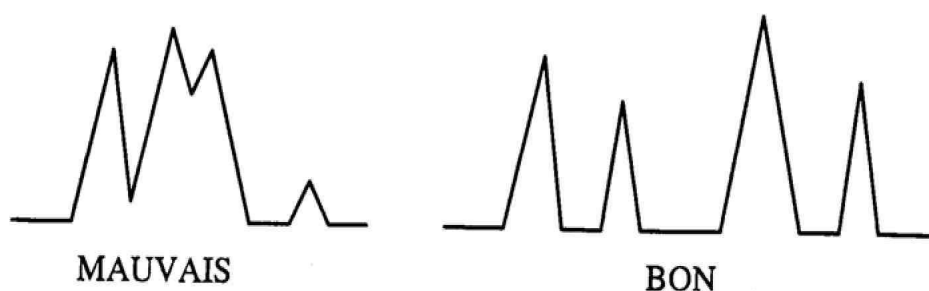


Figure n° 12 : l'analyse qualitative d'un chromatogramme (Anonyme. c, 2006)

Un chromatogramme doit être parfaitement reproductible, pour cela, il faut préciser pour chaque analyse selon Anonyme. c (2006) :

- le type de colonne : marque, nature, diamètre, longueur, support...
- la nature de l'éluant : solvant, si c'est un mélange préciser sa composition, son débit et le mode de détection λ en nm
- la quantité injectée, le début de l'injection sur le chromatogramme, la sensibilité du détecteur, etc

3.4.1 ANALYSE QUALITATIVE

- le temps de rétention

Le temps de rétention (t_R en min) est une caractéristique de chaque soluté dans les conditions opératoires fixées ainsi l'interaction plus ou moins forte entre la phase mobile et la phase stationnaire (normale ou à polarité inversée) se répercute sur les temps de rétention des solutés (Anonyme. c, 2006).

Le temps de rétention (t_R) = temps écoulé entre l'injection et le point maximal du pic.

Le temps mort (t_M) = temps écoulé pour qu'un constituant non retenu traverse la colonne (Anonyme. b, 2006).

Selon Anonyme. e (2007), le temps de rétention est habituellement utilisé à la place du volume de rétention et sa grandeur dépend :

- de la nature de la phase stationnaire
- de la nature de la phase mobile
- du débit de la phase mobile
- de la longueur de la colonne

3.4.2 ANALYSE QUANTITATIVE

La chromatographie est aussi une technique analytique quantitative, basée sur une relation entre la quantité massique du soluté injecté et l'aire du pic du chromatogramme donné par le détecteur (Anonyme. b, 2006), c'est à dire que l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé (Anonyme. c, 2006).

La masse m_i de la soluté i détectée est proportionnelle à l'aire A_i du signal mesuré par le détecteur :

$$m_i = K_i.A_i$$

K_i est le coefficient de réponse du détecteur pour le soluté **i** , **K_i** dépend de la colonne utilisée, de la sensibilité du détecteur vis-à-vis du soluté **i** et des conditions expérimentales.

A_i c'est l'aire du pic d'éluion du soluté **i** sur le chromatogramme. Cette aire de pic est déterminée automatiquement grâce à un enregistreur-intégrateur (Anonyme. b, 2006).

Dans la pratique, il faut donc déterminer **K_i** et **A_i** pour un soluté **i** donné dans les conditions d'analyses données (Anonyme. b, 2006).

3.5 LES AVANTAGES DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Selon Anonyme. b (2006) la chromatographie en phase liquide présente les avantages suivants :

- utilisée pour des solutés de masse moléculaire élevée, peu volatils, sensibles aux températures élevées
- les solutés peuvent être non polaires, polaires ou ioniques

Et selon Anonyme. i (2007) la chromatographie liquide haute performance :

- analyse de très petites quantités
- présente une extrême sensibilité
- possède un grand pouvoir de séparation
- et une excellente reproductibilité

3.6 DOMAINES D'APPLICATION DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

3.6.1 EXEMPLE DE L'ANALYSE DES RÉSIDUS D'ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

L'HPLC est une méthode physicochimique qui permet la détection et la quantification des résidus d'antibiotiques, c'est une méthode nettement plus sélective et plus sensible que les méthodes microbiologiques car elle permet d'identifier les molécules séparément et donc évite les problèmes d'interférences possibles entre les substances (Boatto et al, 1998).

La chromatographie liquide haute performance est reconnue comme une méthode de choix pour l'analyse quantitative des résidus d'antibiotiques dans le lait, la préparation

de l'échantillon est habituellement nécessaire afin d'éliminer les composants importun et d'extraire les antibiotiques présents dans le lait.

Différentes méthodes d'extraction peuvent être appliquées telles que : l'extraction liquide-liquide, l'ultrafiltration, la précipitation des protéines et l'extraction en phase solide (Oliveira et al, 2006).

PARTIE EXPERIMENTALE

Afin de détecter et de quantifier les résidus de pénicilline et de chloramphénicol dans le lait par chromatographie liquide haute performance (HPLC), il est fondamental :

- d'optimiser les paramètres d'analyse suivants :
 - solvant de dilution du standard
 - phase stationnaire
 - phase mobile
 - longueur d'onde
 - débit
 - volume d'injection

- d'examiner la fiabilité de la méthode d'analyse par les tests statistiques.

Notre étude est réalisée dans le laboratoire de Pathologie Animale, Développement des Élevages et Surveillance de la Chaîne Alimentaire des denrées animales ou d'origine animale (PADESCA) du département des sciences vétérinaires d'El Khroub.

Nous avons effectué 700 essais grâce aux standards obtenus par la firme SIGMA-ALDRICH.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 MATÉRIEL UTILISÉ

1.1.1 DESCRIPTION DE L'HPLC DE L'ETUDE

L'appareil est composé de :

- UN DÉGAZEUR : modèle DGU-20A5 (Shimadzu Corporation, 2006), référence S/N : L20244301983CR.

- DEUX POMPES :

- **Pompe1** : modèle LC-10 ATvp (Shimadzu Corporation, 2002), référence S/N : C20974009859J2
- **Pompe2** : modèle LC-10 ATvp (Shimadzu Corporation, 2002), référence S/N : C21014009440CD

- DEUX DÉTECTEURS UV : détecteur A et détecteur B, modèle SPD-10Avp/10AVvp muni d'une lampe Deutérium (spectre d'absorption 190 à 350 nm) (Shimadzu Corporation 2002), référence S/N : C21004001496LP.

- UN SYSTÈME DE CONTRÔLE OU INTÉGRATEUR : modèle SCL-10 Avp (Shimadzu Corporation.2002), référence S/N : C21014009440CD.

- UN ENREGISTREUR (SUPPORTS INFORMATIQUES)

- ordinateur : Hewlett Packard (**hp**) supportant un logiciel pilote pour les modules (HPLC)
- logiciel : Chromatography Workstation. CLASS-VP. Le logiciel CLASS-VP 6.1 est conçu pour piloter les systèmes HPLC Shimadzu LC-10A. Il est connecté au contrôleur de système SCL-10 Avp via un port sériel RS-232, ce dernier contrôle tous les modules de l'appareil HPLC et transmet le chromatogramme au logiciel CLASS-VP 6.1, référence : P/N 223-05225C.
- imprimante : Hewlett Packard, relié à l'ordinateur, permet d'imprimer les chromatogrammes

- UNE COLONNE

Elle est de type VP-ODS 250 L*40, c'est une colonne remplie de gel de silice greffé ; colonne C18 en phase inverse.

- UNE BOUCLE D'INJECTION

Elle a une capacité maximale de 20 μ l.

- DEUX RÉSERVOIRS DE LA PHASE MOBILE

Ce sont deux flacons en verre, le premier contient le solvant dans lequel plonge deux filtres reliés aux pompes par des tuyaux et le deuxième sert à recueillir le solvant après purgation.

- TUYAUTERIE

Tuyaux en plastiques de faible diamètre, qui permet la progression de la phase liquide dans les différents compartiments de l'appareil.

La figure 13 représente l'HPLC que nous avons utilisé durant le travail.

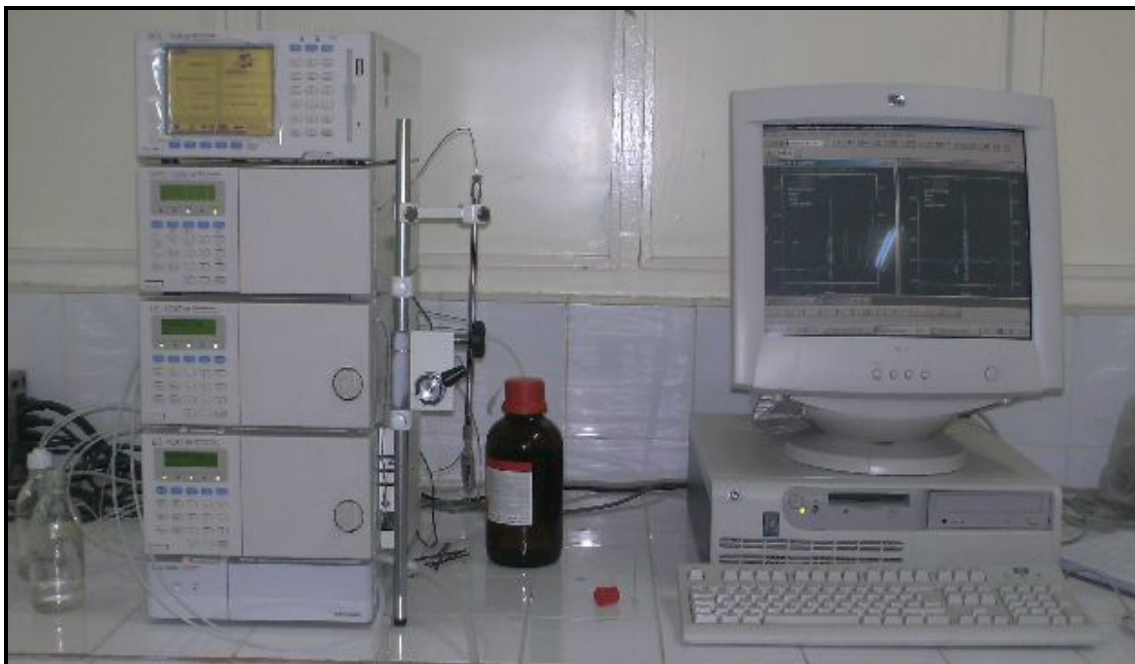


Figure n° 13 : HPLC de l'étude (photo personnelle)

1.1.2 CENTRIFUGEUSE

Capacité maximale 6000 tours/min, référence 46.314.1995.

1.1.3 DISPOSITIF DE FILTRATION

La figure 14 représente l'appareil de filtration qui comprend :

- un réservoir en verre, capacité de 250 ml, Supelco, référence 58063
- un flacon en fuseau en verre, capacité 1000 ml référence 58070U

- une pince pour immobiliser le réservoir et le flacon
- un tamis, référence 58053
- un joint d'étanchéité, référence 58066
- une membrane en nylon ; 0.45 μm X 47 mm de pore, Supelco, référence 58067
- une pompe a vide : Knf LAB, Laboport, référence 01845657



Figure n° 14 : dispositif de filtration (photo personnelle)

1.1.4 SERINGUES D'INJECTION

Capacité 20 et 50 μl , référence C 670-12554-03, l'une d'entre elles est représentée sur la figure 15.



Figure n° 15 : seringue d'injection (photo personnelle)

1.1.5 FILTRES

Nous avons utilisé deux types de filtres :

- membrane en nylon 0.45 μm X 47 mm de pore (Supelco), référence 58067
- les filtres de Whatman

1.1.6 PIPETTES

Capacité : 5, 10 et 20 ml.

1.1.7 BALANCE ANALYTIQUE

SCALTEC. Modèle. SPB31, précision 0.1 mg illustrée sur la figure 16.

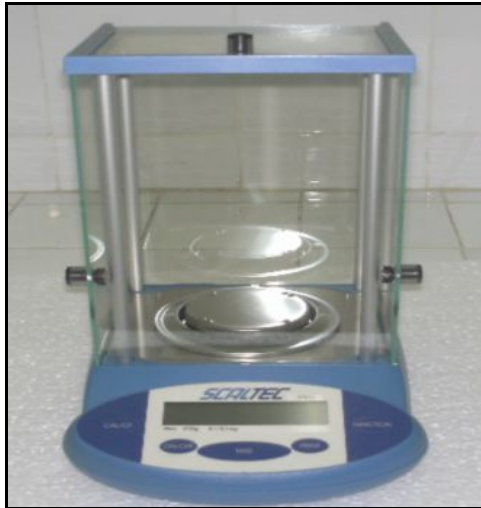


Figure n° 16 : la balance analytique (photo personnelle)

1.1.8 VORTEX

Modèle Richard Wolf GmbH. Type : 2033.

1.1.9 FLACONS EN PLASTIQUE

Capacité 50 ml, utilisés pour le mélange et la préparation des solutions.

1.1.10 TUBES EN VERRE

Utilisés pour l'extraction.

1.2 PRODUITS CHIMIQUES

1.2.1 COMPOSÉ PHYWE

Composé préparé par la firme Phywe pour le calibrage de l'appareil, il est constitué de :

- anthracène
- tetracène

- acénaphène
- acénaphylène

1.2.2 STANDARDS D'ANTIBIOTIQUES

- **la pénicilline G** : potassium salt Vetrinal, 250 mg poudre, Riedel-de Haën, Laborchemikalien GMBH, Sigma-Aldrich, référence 46609, comme le montre la figure 17.

Formule chimique : $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$.

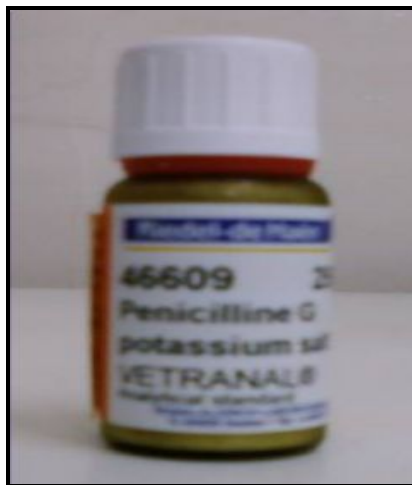


Figure n° 17 : le standard de pénicilline (photo personnelle)

- **le chloramphénicol** : vetrinal 250 mg poudre, Riedel-de Haën, Laborchemikalien GMBH, Sigma-Aldrich, référence 46110, illustré sur la figure 18.

Formule chimique : $C_{11}H_{12}CLN_2O_5$.



Figure n° 18 : le standard de chloramphénicol (photo personnelle)

1.2.3 AUTRES PRODUITS

- **méthanol** : Chromosolv pour chromatographie liquide haute performance, flacon de 1 litre, Sigma-Aldrich, référence 5363C.
- **acétonitrile** : acétonitrile pour HPLC grade, flacon de 1 litre, Biochem. Chemopharma, référence 6235A.
- **eau pour HPLC** : Chromosolv plus pour HPLC, flacon 2.5 litres, Sigma-Aldrich, référence 34877.

1.3 ÉCHANTILLON

Échantillon de lait de 500 ml prélevé à partir d'une ferme située dans la commune de Ain Smara (wilaya de Constantine).

1.4 PROTOCOLE GÉNÉRAL D'ANALYSE

1.4.1 MAÎTRISE DE L'UTILISATION DE L'APPAREILLAGE

Nous avons utilisé un mélange de quatre molécules (Anthracène, Tétracène, Acénaphène et Acénaphylène) préparé par la firme Phywe dans des conditions bien déterminées au préalable et cela pour régler les différents modules de l'HPLC (logiciel, pompes, détecteur).

1.4.2 PRÉPARATION DES SOLUTIONS

1.4.2.1 PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE PÉNICILLINE

Pour la préparation de la pénicilline, nous avons mélangé 4 mg de standard pénicilline avec 26.66 ml de solvant (méthanol ou acétonitrile) pour obtenir une concentration de 0.15 mg/ml (concentration mentionnée sur le prospectus).

1.4.2.2 PRÉPARATION DE LA SOLUTION DU CHLORAMPHÉNICOL

Pour la préparation du chloramphénicol, nous avons mélangé 2 mg de standard chloramphénicol avec 10 ml de solvant (méthanol ou acétonitrile) pour obtenir une concentration de 0.2 mg/ml (concentration mentionnée sur le prospectus).

1.4.2 OPÉRATION DE FILTRATION

L'opération de filtration est effectuée quotidiennement avant toute manipulation et elle se déroule selon les étapes suivantes :

- montage du système de filtration
- mise en marche de la pompe à vide
- déversement de la phase mobile dans le réservoir ; la pompe exerce une pression forcée qui permet au liquide de passer à travers la membrane filtre (diamètre pores 0,45 μm), cette dernière retient toutes les impuretés
- la phase mobile filtrée pourra ainsi être utilisée pour l'analyse HPLC

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 artéfacts sur les chromatogrammes.

1.4.3 L'ANALYSE HPLC

1.4.3.1 DÉMARRAGE DES MODULES HPLC

L'appareil est relié à un onduleur (pour stabiliser le courant qui alimente tout le système), allumage de l'onduleur puis des modules, toujours dans l'ordre suivant : pompe I, pompe II, détecteur et enfin intégrateur.

Ensuite démarrer l'ordinateur, relier à l'appareil, ainsi que le logiciel (CLASS VP).

1.4.3.2 ÉTAPES DE L'ANALYSE

Nous commençons par mettre la phase mobile filtrée dans les réservoirs (flacon spécial) puis nous procédons à la purge de l'appareil avec le solvant (Méthanol ou acétonitrile) pour éliminer les bulles d'air ainsi que les impuretés, cette opération se fait régulièrement au début et à la fin des analyses.

L'analyse des l'échantillons passe toujours par l'ensemble des étapes suivantes :

A) Création de la méthode d'analyse

Cette opération nous permet de définir les paramètres de l'analyse avec lesquels nous désirons travailler et elle comprend les étapes suivantes :

- les pompes : nous choisissons celle que nous désirons faire fonctionner (pompe I ou pompe II) ainsi que le débit (ml/min) et la pression maximale, nous précisons également le mode de fonctionnement des pompes (isocratique ou mode

- gradient) ; pour notre étude nous avons opté pour le mode isocratique donc nous avons travaillé avec une seule pompe et un seul type de phase mobile
- les détecteurs : nous choisissons celui avec lequel nous allons travaillé ; détecteur A ou B
 - nous précisons la fréquence de l'analyse
 - nous réglons le temps de l'analyse
 - nous choisissons la ou les longueurs d'onde
 - le tout est sauvegardé sous le nom de la méthode

B) Lancement de l'analyse : toujours sur le logiciel, nous lançons l'analyse en appuyant sur une touche (single run), cette opération fait démarrer les pompes automatiquement, il faut ensuite attendre un laps de temps pour permettre à la pression des pompes de se stabiliser, une fois que la pression est stable, nous introduisons la seringue dans la boucle d'échantillonnage, nous injectons l'échantillon et nous faisons tourner l'injecteur manuellement d'un coup sec en position "INJECT" une fois l'échantillon injecté, l'analyse est lancée.

C. Fin de l'analyse et enregistrement du chromatogramme : après l'écoulement du temps d'analyse, nous obtenons un chromatogramme qui va être enregistré et sauvegardé dans un fichier.

1.4.4 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DES RÉSIDUS DE PÉNICILLINE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La pénicilline est la molécule la plus recherchée dans le lait car d'une part c'est la plus utilisée pour le traitement des mammites et d'autre part c'est celle qui cause le plus de dégâts en industrie laitière (Gustavsson et al, 2002).

Avant de détecter et de quantifier les résidus de pénicilline dans le lait, il a fallu procéder à l'étalonnage de l'appareil HPLC à l'aide du standard de pénicilline, ce dernier était accompagné de prospectus dans lesquels sont mentionnées les conditions d'analyse suivantes :

- colonne : L = 250 mm, D = 4.6 mm ; Supelcosil LC-18
- phase mobile : mélange 25% acétonitrile et 75% (eau pour HPLC+ 0.07% Na₂HPO₄)
- concentration : 0.15 mg/ml

- débit : 1ml/min
- détecteur : UV-220 nm
- volume d'injection : 20 µl
- linéarité : vérifiée

1.4.4.1 UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DE LA PÉNICILLINE G

Pour cette étape, nous avons effectué 10 essais dans lesquels nous avons repris quelques conditions d'analyse mentionnées sur le prospectus et nous les avons adapté à nos conditions d'analyse.

Nous avons utilisé les paramètres suivants :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans le méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 25% acétonitrile + 75% eau pour HPLC
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 220 nm
- débit : 1 ml/min
- temps d'analyse : 6 min

Pour toutes les séries de notre étude, nous avons travaillé avec une colonne VP-ODS 250L 40, remplie de gel de silice greffé : colonne C18 en phase inverse, différente de celle du prospectus.

1.4.4.2 OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DE LA PÉNICILLINE G

Nous avons effectué une série de dix essais pour optimiser ce paramètre.

A) pour l'échantillon préparé à l'aide du méthanol, les conditions d'analyse sont :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans le méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 220 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 5 min

B) pour l'échantillon préparé avec l'acétonitrile, les conditions sont les suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : acétonitrile
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 220 nm
- débit : 1 ml/min
- temps d'analyse : 10 min

1.4.4.3 OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LA PÉNICILLINE G

Pour ce paramètre nous avons testé trois types de phase mobile : le mélange 75% eau pour HPLC + 25% acétonitrile, l'acétonitrile seul et le méthanol seul pour lesquels nous avons effectué une série de dix essais.

Nous avons utilisé les paramètres d'analyse suivants :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : mélange 75% eau pour HPLC + 25% acétonitrile, méthanol seul ou acétonitrile seul
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 220 nm
- débit : 1 ml/min
- temps d'analyse : 8 min

1.4.4.4 OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LA PÉNICILLINE

Nous avons testé plusieurs longueurs d'ondes dans un spectre allant de 190 à 330 nm dans une série de 10 essais.

Notre appareil est muni de deux détecteurs, il nous a donc permis de travailler sur deux longueurs d'ondes différentes dans un même essai.

Pour les longueurs d'onde de 190 et 220 nm, les conditions sont :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol

- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 190 et 220 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8 min

Pour les longueurs d'onde de 220 et 250 nm, les conditions utilisées sont :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 220 et 250 nm
- débit : 1 ml/min
- temps d'analyse : 8 min

Pour les longueurs d'ondes de 250 et 280 nm, les conditions sont :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 250 et 280 nm
- débit : 1 ml/min
- temps d'analyse : 8 min

Pour les longueurs d'ondes de 280 et 300 nm, les conditions sont :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 280 et 300 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8 min

Pour les longueurs d'onde de 300 et 330 nm, les paramètres sont :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse

- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 μ l
- longueur d'onde : 300 et 330 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8 min

1.4.4.5 OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LA PÉNICILLINE G

Nous avons effectué dix essais pour l'optimisation du débit, ce dernier est optimisé dans une fourchette allant de 0.8 à 1.6 ml/min.

Pour optimiser le débit, nous avons travaillé avec les conditions suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 μ l
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 0.8, 1, 1.2, 1.4 et 1.6 ml/min
- temps d'analyse : 8 min

1.4.4.6 OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LA PÉNICILLINE G

Notre boucle d'échantillonnage a une capacité maximale de 20 μ l, nous avons donc testé des volumes allant de 5 à 20 μ l dans une série de 10 essais.

Pour optimiser le volume nous avons travaillé avec les conditions suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 5, 10, 15 et 20 μ l
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8 min

1.4.5 OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DES RÉSIDUS DE CHLORAMPHÉNICOL PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Le chloramphénicol est une molécule désormais interdite en Algérie et dans la plupart des pays tels que les pays de l'union européenne : Allemagne, Autriche, Finlande, France, etc. (Gatermann et Bruns, 2004) (Anonyme. a, 2001), les Etats-Unis (Anonyme. a, 2002) etc. Il nous paraît donc nécessaire de rechercher cette molécule dans nos denrées afin de garantir la sécurité du consommateur.

Des standards nous ont été fournis pour l'optimisation des paramètres de détection et de quantification de cette molécule, le prospectus qui l'accompagnée précisait les conditions d'analyse suivantes :

- colonne : L = 250 mm, D = 4.6 mm, discovery Cyano
- phase mobile : 10% acétonitrile + 90% (eau + 0.1% acide phosphorique)
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml
- linéarité : vérifiée

1.4.5.1 UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DU CHLORAMPHÉNICOL

Dans cette série d'essais nous avons repris quelques conditions préconisées sur le prospectus qui accompagnait le standard et nous les avons adapté à nos conditions d'analyse.

Nous avons effectué une série de dix essais avec les paramètres suivants :

- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 100% méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans le méthanol)
- temps d'analyse : 10 min

1.4.5.2 OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DU CHLORAMPHÉNICOL

Nous avons testé deux types de solvants, le méthanol et l'acétonitrile pour lesquels nous avons effectué une série de dix essais.

1. utilisation du méthanol comme solvant de dilution du chloramphénicol, nous avons utilisé les conditions suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 100% méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

2. utilisation de l'acétonitrile comme solvant de dilution du standard, nous avons utilisé les conditions suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 100% méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

1.4.5.3 OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Nous avons réalisé une série de dix essais dans laquelle nous avons expérimenté deux types de phases mobiles : le méthanol et l'acétonitrile.

Avec la phase mobile méthanol, nous avons utilisé les paramètres suivants :

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 100% méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl

- temps d'analyse : 10 min

Pour l'acétonitrile, nous avons appliqué les conditions suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 100% acétonitrile
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

1.4.5.4 OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Nous avons effectué une série de dix essais dans laquelle nous avons expérimenté six longueurs d'ondes différentes dans un spectre allant de 200 à 320 nm.

Pour optimiser la longueur d'onde, nous avons utilisé les conditions d'analyse suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 100% méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 200, 220, 250, 280, 300 et 320 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

1.4.5.5 OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Pour ce paramètre nous avons testé des débits allant de 1 à 1.6 ml/min, pour lesquels nous avons effectué une série de dix essais.

Pour le débit, nous avons expérimenté les conditions d'analyse suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : 100% méthanol
- débit : 1, 1.2, 1.4 et 1.6 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm

- volume injecté : 20 μ l
- temps d'analyse : 10 min

1.4.5.6 OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Pour l'optimisation de ce paramètre, nous avons testé des volumes entre 5 et 20 μ l dans une série de dix essais.

Pour le volume nous avons travaillé avec les paramètres suivants :

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 5, 10, 15 et 20 μ l
- temps d'analyse : 10 min

1.4.6 EXAMENS DE LA FIABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC

La validation de notre méthode d'analyse doit passer par la réalisation des tests suivants : la répétabilité, la reproductibilité et la linéarité de la courbe d'étalonnage.

1.4.6.1 LA RÉPÉTABILITÉ

C'est la réalisation de la méthode par la même équipe et le même laboratoire ; c'est à dire des conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essais identiques, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps (ISO 3534-1, ISO 5725-1) cité par Anonyme. a, 2006.

Pour tester la répétabilité des résultats obtenus pour les molécules de pénicilline et de chloramphénicol, nous avons effectué pour chaque molécule trois séries de 5 essais, le même jour, avec la même solution de travail, le même opérateur, le même lieu, le même équipement et avec les mêmes conditions d'analyse. Les résultats obtenus sont ensuite soumis aux tests statistiques de Student (Berrah, 1984).

Pour la pénicilline, les conditions d'analyse sont les suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.10 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1ml/min
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 8min

Les conditions de travail de la répétabilité pour la molécule de pénicilline sont détaillées dans l'annexe 1.

Pour le chloramphénicol, nous avons utilisé les paramètres suivants :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

Les conditions de travail de la répétabilité pour la molécule de chloramphénicol sont détaillées dans l'annexe 3.

1.4.6.2 LA REPRODUCTIBILITÉ

Dans ce cas les essais sont réalisés dans des conditions différentes ; au moins un des paramètres suivants est modifié volontairement : opérateur, appareil, mise en solution, temps... (ISO 3534-1, ISO 5725-1) cité par Anonyme. a, 2006.

Pour ce paramètre, nous avons réalisé 3 séries d'analyse, ces dernières sont effectuées par deux opérateurs différents, avec trois solutions de travail différentes (une pour chaque série) et à quelques jours d'intervalles. Chaque série comprend 20 essais dont les surfaces seront soumises aux tests statistiques de Student (Berrah, 1984).

La pénicilline

Chaque série d'analyse est réalisée avec une nouvelle solution de travail (concentration 0.10 mg/ml) diluée à partir de la solution mère (concentration 0.15 mg/ml).

Les conditions de travail de la reproductibilité pour la molécule de pénicilline sont détaillées dans l'annexe 2.

Les conditions d'analyse sont :

- concentration de l'échantillon : 0.10 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8 min

Le chloramphénicol

Nous avons également utilisé trois solutions de travail (concentration 0.15 mg/ml) obtenues par dilution à partir de la solution mère (concentration 0.2 mg/ml).

Les conditions de travail de la reproductibilité pour le chloramphénicol sont détaillées dans l'annexe 4.

Les conditions sont les suivantes :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans méthanol)
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- phase mobile : méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

1.4.6.3 LA LINÉARITÉ DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

La linéarité de la variation des hauteurs de pics (surfaces) en fonction de la variation des concentrations du produit injecté doit être vérifiée pour chaque composé.

Les coefficients de corrélation entre hauteurs des pics et concentrations, ainsi que les paramètres des droites de régression linéaire correspondantes doivent être calculés (ISO 3534-1, ISO 5725-1) cité par Anonyme. a, 2006.

La pénicilline

Pour établir la courbe de linéarité et déterminer la droite de régression pour la molécule de pénicilline ; nous avons préparé quatre dilutions à partir de la solution mère (concentration 0.15 mg/ml) :

- première dilution : 0.10 mg/ml
- deuxième dilution : 0.05 mg/ml
- troisième dilution : 0.075 mg/ml
- quatrième dilution : 0.0375 mg/ml

Les conditions d'analyse sont :

- phase mobile : méthanol
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8 min

Ensuite nous avons établi la courbe de linéarité des surfaces en fonction des concentrations correspondantes.

Le chloramphénicol

Afin de pouvoir établir la courbe de linéarité pour la molécule de chloramphénicol nous avons préparé les dilutions suivantes : 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.025 mg/ml et 0.0125 mg/ml, préparées à partir de la solution mère (0.2 mg/ml).

Les conditions d'analyse sont :

- phase mobile : méthanol
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse

- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 μ l
- temps d'analyse : 10 min

Ensuite nous avons établi la courbe de linéarité des surfaces en fonction des concentrations correspondantes.

1.4.7 LA LIMITE DE DÉTECTION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC

La limite de détection de la méthode correspond à la concentration minimum d'un analyte qui, dans une matrice donnée et avec une méthode spécifique, a une probabilité de 99 % d'être identifiée qualitativement ou quantitativement, comme étant plus grand que zéro (ISO 3534-1, ISO 5725-1) cité par Anonyme. a, 2006.

Pour la pénicilline, nous avons procédé à la détermination de la limite de détection de notre méthode d'analyse HPLC par la préparation de dilutions dans l'acétonitrile à partir de la solution mère (0.15 mg/ml).

Les dilutions sont les suivantes : 15×10^{-3} mg/ml, 15×10^{-4} mg/ml, 15×10^{-5} mg/ml, 15×10^{-6} mg/ml, 15×10^{-7} mg/ml, 15×10^{-8} mg/ml, 15×10^{-9} mg/ml et 15×10^{-10} mg/ml.

Nous avons réalisé les essais avec les conditions suivantes :

- phase mobile : méthanol
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- volume injecté : 20 μ l
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1 ml/min
- temps d'analyse : 8 min

Pour le chloramphénicol aussi, nous avons effectué la même opération pour la détermination de la limite de détection de la méthode, nous avons préparé des dilutions dans le méthanol à partir de la solution mère (0.2 mg/ml), ces dilutions correspondent aux concentrations suivantes : 2×10^{-2} mg/ml, 2×10^{-3} mg/ml, 2×10^{-4} mg/ml, 2×10^{-5} mg/ml, 2×10^{-6} mg/ml, 2×10^{-7} mg/ml, 2×10^{-8} mg/ml et 2×10^{-9} mg/ml.

Nous avons effectué les essais avec les paramètres d'analyse suivants :

- phase mobile : méthanol
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

1.4.8 LA MÉTHODE D'EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Afin de pouvoir détecter les résidus d'antibiotiques dans le lait par chromatographie haute performance liquide, nous avons essayé d'adopter une méthode d'extraction des antibiotiques à partir de différentes méthodes préconisées (Diaz et al, 2007), (Helio et al, 2007), (Pilar et al, 2007).

La méthode adoptée repose sur le principe suivant :

Mélange de 10 ml de lait + 20 ml d'acétonitrile + 6 ml d'eau pour HPLC.

Le mélange est réparti en quatre tubes, ces derniers sont mélangés au vortex pendant 1 minute puis centrifugés pendant 10 min à 6000 tours/min.

Après la première centrifugation, les surnageants (portions aqueuses) des 4 tubes sont recueillis puis filtrés avec les filtres de Whatman.

Les surnageants ainsi filtrés sont ajoutés et mélangés avec 20 ml d'acétonitrile puis repartis en 4 tubes, mélangés au vortex pendant 1min et centrifugés pendant 5 min à 3000 tours/min.

Après cette deuxième centrifugation les portions aqueuses sont récoltées à nouveau puis filtrées deux fois ; la première avec un filtre de Whatman et la deuxième avec un filtre 0.45 µm/ 47 mm membrane nylon.

Pour notre essai d'extraction, nous avons utilisé un lait prélevé d'une ferme située dans la commune de Ain Smara (wilaya de Constantine). D'après l'éleveur, les vaches productrices de lait n'ont pas reçu de traitements antibiotiques depuis plus de deux mois.

L'échantillon de lait est divisé en trois parties E1, E2 et E3 :

- l'échantillon E1 est dopé avec le standard de pénicilline
- l'échantillon E2 est dopé avec le standard de chloramphénicol

- l'échantillon E3 est laissé comme témoin

Échantillon E1 : dopé avec le standard de pénicilline

Nous avons analysé l'échantillon après extraction avec les paramètres précédemment utilisés avec l'étalon de pénicilline :

- phase mobile : méthanol
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- volume injecté : 20 μ l
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8min

Échantillon E2 : dopé avec le standard de chloramphénicol

Nous avons appliqué la même méthode d'extraction et analysé l'échantillon de lait dopé par le chloramphénicol avec les paramètres d'analyses correspondants :

- phase mobile : méthanol
- phase stationnaire : colonne VP-ODS C18 en phase inverse
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 μ l
- temps d'analyse : 10 min

Échantillon E3 : témoin

Nous avons analysé l'échantillon de lait témoin après extraction avec les paramètres d'analyse de la pénicilline et du chloramphénicol.

1.5 EXPRESSION DES RÉSULTATS

Nous avons appliqué le test de Student (Berrah, 1984) pour la réalisation des tests statistiques.

1.5.1 LES TESTS STATISTIQUES

1.5.1.1 CALCUL DE LA RÉPÉTABILITÉ

Pour vérifier le paramètre de la répétabilité pour les molécules de pénicilline et de chloramphénicol, nous avons eu recours aux tests statistiques de Student (Berrah,

1984) pour comparer entre les trois séries et voir si la différence entre ces dernières est significative ou pas.

Nous avons calculé la moyenne, l'écartype et la variance à partir des surfaces obtenues pour calculer ensuite le t (calculé) et le comparer avec le t de la table de Student (Berrah, 1984).

Le t (calculé) est mesuré entre chaque deux séries (1 et 2, 1 et 3, 2 et 3) selon la formule suivante :

$$t = |Xa - Xb| / \sqrt{\sigma^2/Na + \sigma^2/Nb}$$

Xa étant la moyenne de la première série (série a)

Xb étant la moyenne de la deuxième série (série b)

σ^2 étant la variance entre les deux séries a et b

Na étant le nombre de l'effectif de la série a

Nb étant le nombre de l'effectif de la série b

Le t table est obtenu à partir de la table de Student (Berrah, 1984), dans notre cas nous avons travaillé avec les risques d'erreur de 1 et 5%.

Le t calculé obtenu est comparé ensuite avec le t table :

- si t calculé est inférieur à t table ; la différence entre les deux séries n'est pas significative cela signifie que notre méthode est répétable (ou reproductible)
- si t calculé est supérieur à t table ; la différence entre les deux séries est significative cela signifie que notre méthode n'est pas fiable

Les formules statistiques sont détaillées dans l'annexe 5.

1.5.1.2 CALCUL DE LA REPRODUCTIBILITÉ

Pour la reproductibilité, nous avons appliqué le test de Student (Berrah, 1984) sur les surfaces obtenues dans chaque série.

Nous avons calculé la moyenne, l'écartype et la variance pour calculer le t (calculé) ce dernier est calculé entre chaque 2 séries (séries A et B, séries A et C et séries B et C) selon la formule suivante :

$$t = |Xa - Xb| / \sqrt{\sigma^2/Na + \sigma^2/Nb}$$

Ce dernier est ensuite comparé avec le t de la table de Student (Berrah, 1984) (aux risques d'erreurs de 1 et 5%).

1.5.1.3 CALCUL DE L'INTERVALLE DE CONFIANCE

Nous avons calculé l'intervalle de confiance pour les séries de reproductibilité de la pénicilline et du chloramphénicol selon la formule suivante :

$$X + t \sigma^2/\sqrt{n-1} < m < X - t \sigma^2/\sqrt{n-1}$$

X étant la moyenne de la série

σ^2 étant l'écartype de la série

t correspond au risque d'erreur obtenu à partir de la table de Student (Berrah, 1984).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 MAÎTRISE DE L'UTILISATION DE L'APPAREILLAGE

Nous avons utilisé un mélange de quatre molécules (ou standards) : Anthracène, Tétracène, Acénaphène et Acénaphylène préparé par la firme Phywe dans des conditions bien déterminées au préalable :

- phase mobile : méthanol
- Phase stationnaire : colonne C18 en phase inverse (Gel de silice greffé)
- débit : 1.5 ml/min
- longueur d'onde : 254 nm
- temps d'analyse : 10 min
- quantité injectée : 2 µl

Nous avons obtenu un chromatogramme avec quatre pics représentés sur la figure 19 correspondant aux molécules suivantes : Anthracène (2.05 min), Tétracène (3.55 min), Acénaphène (4.26 min) et Acénaphylène (6.04 min).

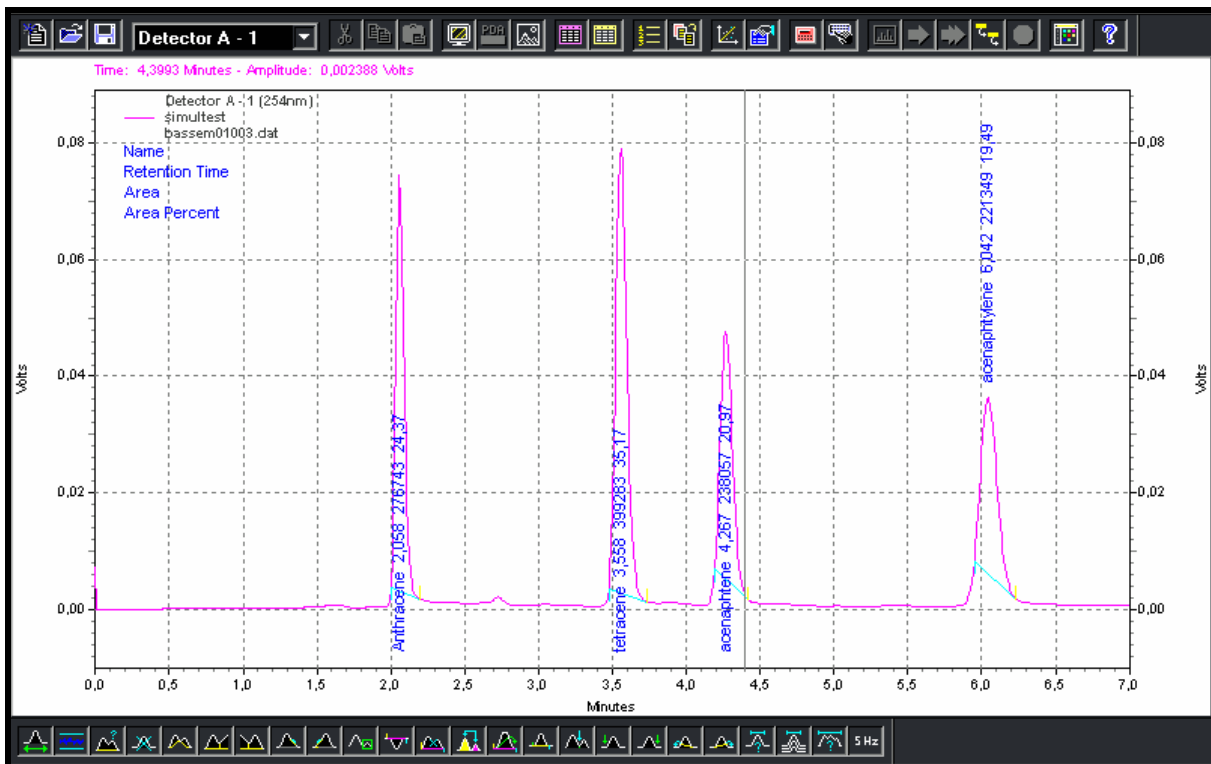


Figure n° 19 : maîtrise de l'utilisation de l'appareillage

Les essais effectués avec les standards de la firme Phywe nous ont permis de maîtriser l'appareillage HPLC et de régler les différents modules : pompes,

détecteurs UV et intégrateur, cette étape était primordiale avant de commencer le travail proprement dit.

2.2 RÉSULTATS DE L'OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DE LA PÉNICILLINE G PAR HPLC

2.2.1 RÉSULTAT DE L'UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DE LA PÉNICILLINE G

Le chromatogramme représenté sur la figure 20 démontre les résultats obtenus avec quelques conditions préconisées par le fournisseur du standard de la pénicilline G.

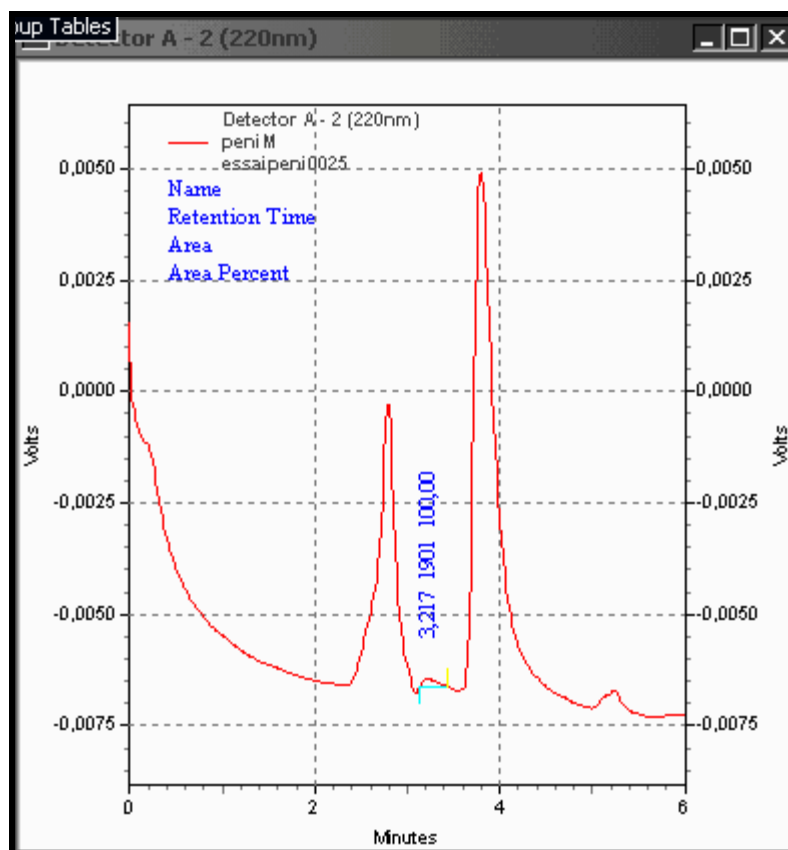


Figure n° 20 : utilisation quelques paramètres préconisés sur le prospectus de la pénicilline G

D'après la figure 20, nous remarquons que le chromatogramme ne présente pas de pic caractéristique de la pénicilline G et la ligne de base est décalée, probablement à cause de certaines conditions qui étaient différentes à savoir : instrumentation, la température ambiante, degré hygrométrique, opérateurs, etc. rajouter à cela, le fournisseur de la pénicilline G ne précise pas, sur le prospectus, le solvant utilisé pour la dilution du standard.

Nous avons constaté également que la phase mobile (25% acétonitrile + 75% eau pour HPLC) avait un aspect huileux (ce qui a fait augmenter la pression des pompes) et cela éventuellement à cause de l'absence du tampon.

De ce fait, les résultats enregistrés avec les paramètres préconisés par le fournisseur du standard de la pénicilline G ne sont pas exploitables par nos conditions d'analyse, nous avons donc été contraints d'optimiser chacun des différents paramètres à savoir : le solvant de dilution de l'échantillon, la phase mobile, la longueur d'onde, le débit et le volume d'injection.

2.2.2 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DE LA PÉNICILLINE G

- pour le méthanol : nous avons eu un chromatogramme qui ne présente pas de pic caractéristique de la pénicilline G comme le montre la figure 21
- pour l'acétonitrile : nous avons eu un bon chromatogramme avec un pic de pénicilline G à 4.05 min, ce dernier est illustré sur la figure 22

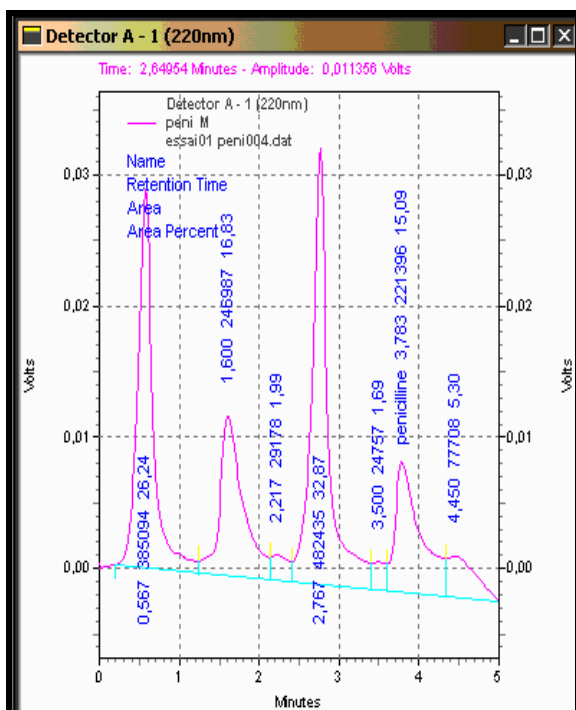


Figure n° 21 : solvant de dilution : méthanol

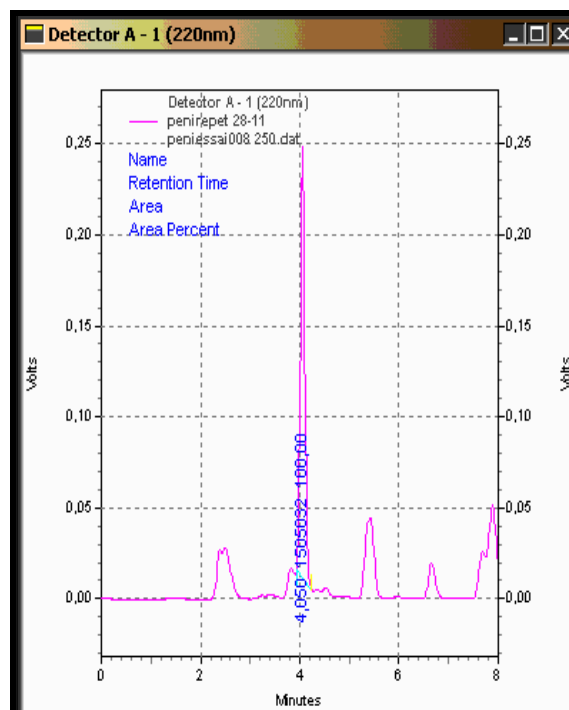


Figure n° 22 : solvant de dilution : acétonitrile

En observant les figures 21 et 22, nous constatons que l'acétonitrile donne un meilleur résultat comparé au méthanol.

- en comparant notre travail avec celui de Msagati et Nindi (2005), Furusawa (2000), Boatto et al (1998) qui ont employé l'eau distillée pour la dilution du standard de la pénicilline, nous remarquons que l'eau est le solvant le plus utilisé pour la préparation de la pénicilline.

- en comparant notre travail avec celui de Ramirez et al (2002) qui ont utilisé le méthanol pour la dilution du standard de la pénicilline, nous remarquons que ces derniers ont, contrairement à nous, obtenu de bons résultats éventuellement à cause de certaines conditions : phase mobile (composition est non précisé par les auteurs), instrumentation, température, etc.

À rappeler aussi que le fournisseur de notre standard de pénicilline G n'a pas précisé le solvant dans lequel il a dilué la molécule.

Pour la suite de notre travail, nous avons gardé l'acétonitrile car c'est le solvant de dilution qui a donné un meilleur résultat.

2.2.3 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LA PÉNICILLINE G

- phase mobile 25% acétonitrile + 75% eau pour HPLC : voir figure 20
- phase mobile 100% acétonitrile : nous avons obtenu un bon chromatogramme comme le montre la figure 23
- phase mobile 100% méthanol : nous avons obtenu également un bon chromatogramme représenté sur la figure 24

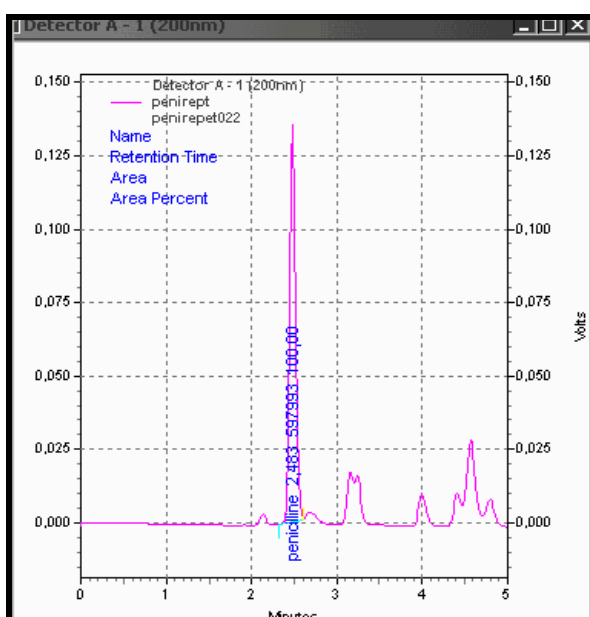


Figure n° 23 : phase mobile acétonitrile

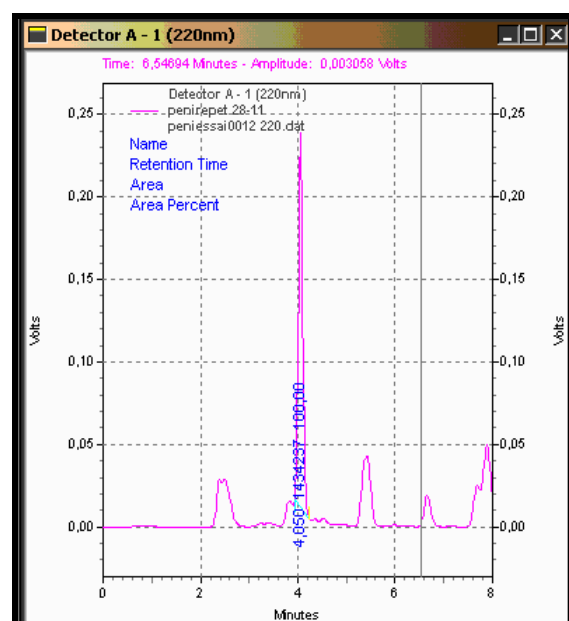


Figure n° 24 : phase mobile méthanol

Nous avons exploité trois types de phase mobile : le mélange 25% acétonitrile + 75% eau pour HPLC, l'acétonitrile seul et le méthanol seul.

Pour la première phase mobile (mélange 25% acétonitrile + 75% eau pour HPLC) nous n'avons pas eu de bons résultats probablement à cause de l'absence de tampon (NA₂HPO₄) (voir figure 20).

Msagati et Nindi (2005) ont utilisé une phase mobile composée de mélange de 75% eau pour HPLC + 25% méthanol + acide acétique, Shalini (2002) a quant à lui utilisé un mélange composé d'eau, de méthanol et de tampon phosphate sans préciser les proportions de chaque composé.

Pour les phases mobiles composées de méthanol ou d'acétonitrile seuls, nous avons obtenu de bons résultats dans les deux cas mais nous avons continué le travail avec le méthanol car c'est le solvant le plus disponible dans notre laboratoire.

Boatto et al (1998) et Furusawa (2000) ont utilisé l'acétonitrile avec le tampon phosphate comme phase mobile, ces derniers ont utilisé un tampon car ils ont employé cette phase mobile pour rechercher les résidus de pénicilline dans le lait. Enfin Oruç et Sonal (2005) ont utilisé un mélange composé de méthanol, d'acétonitrile et d'un tampon constitué de potassium dihydrogenphosphate pour la recherche des résidus de pénicilline dans le lait.

2.2.4 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LA PÉNICILLINE G

- longueurs d'onde 190 et 220 nm : nous avons obtenu un chromatogramme avec une base légèrement courbée, décalée et présentant des artefacts. Les pics de pénicilline apparaissent au même temps de rétention, mais nous constatons que la surface du pic à 190 nm est plus grande qu'à 220 nm comme le confirme la figure 25

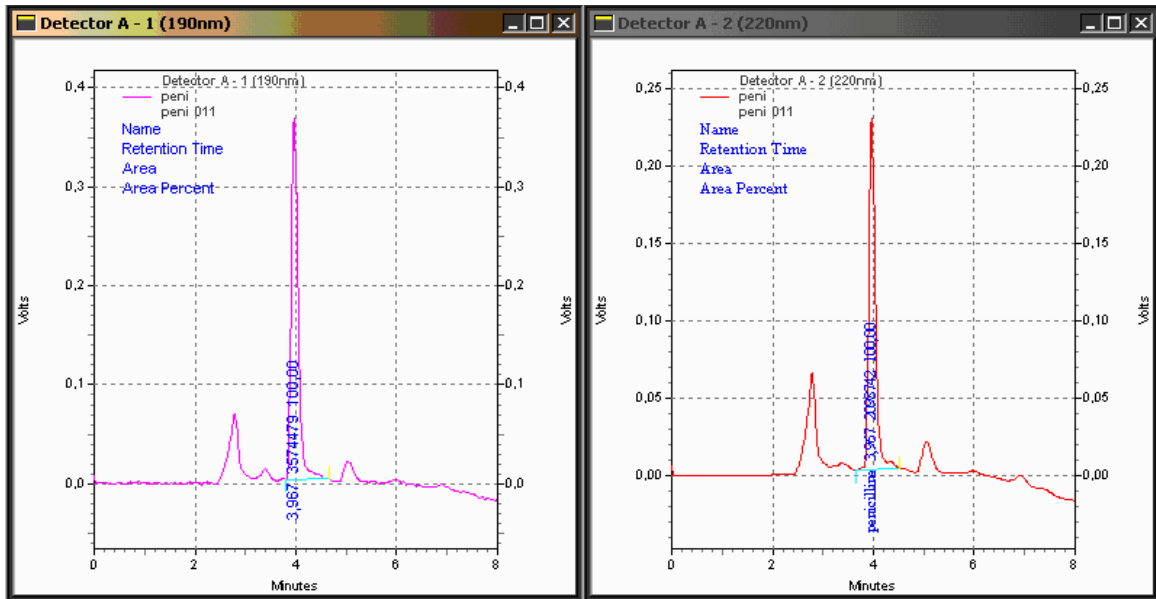


Figure n° 25 : longueur d'onde 190 et 220 nm

- longueurs d'onde 220 et 250 nm : même pic, même temps de rétention, la ligne de base à 250 nm ne présente presque plus d'artéfacts et la surface du pic est plus grande qu'à 220 nm comme le montre la figure 26

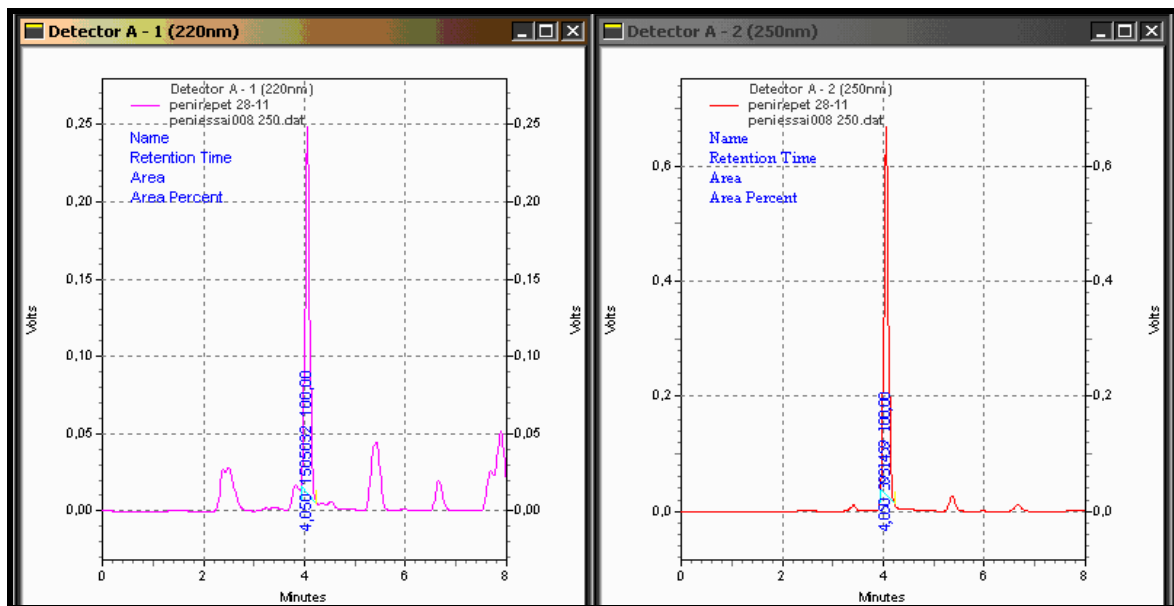


Figure n° 26 : longueurs d'onde 220 et 250 nm

- longueurs d'onde 250 et 280 nm : même pic, même temps de rétention, la surface à 280 nm est plus petite qu'à 250 nm, illustrée sur la figure 27

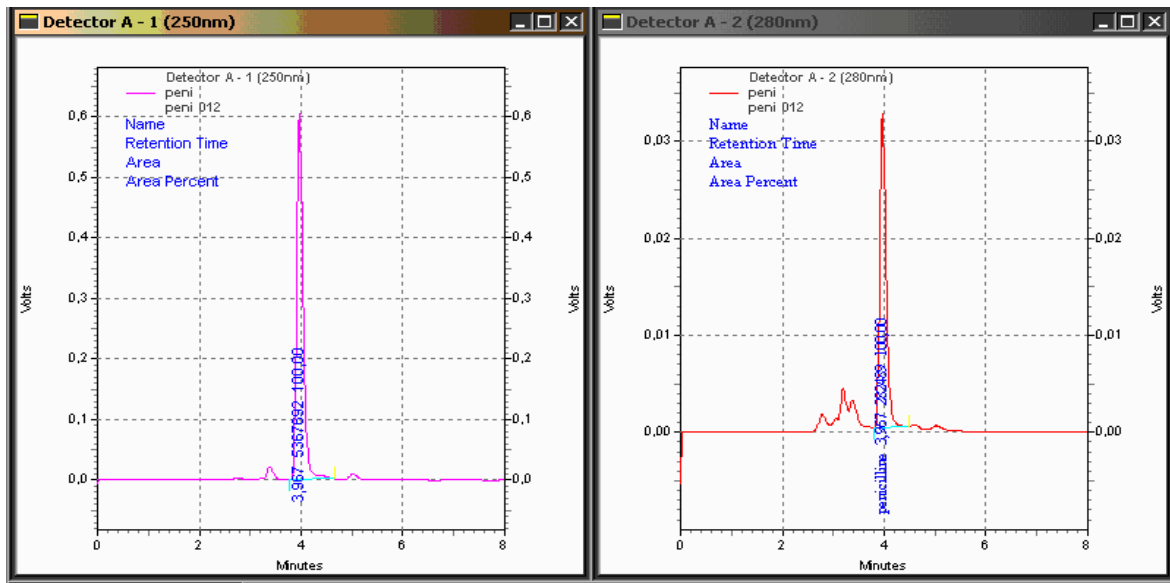


Figure n° 27 : longueur d'onde 250 et 280 nm

- longueurs d'onde 280 et 300 nm : bon pic à 280 nm mais à 300 nm nous remarquons que le chromatogramme présente des artéfacts, le pic de pénicilline a une surface maigre comparée à celles obtenues avec les longueurs d'onde précédentes comme le confirme la figure 28

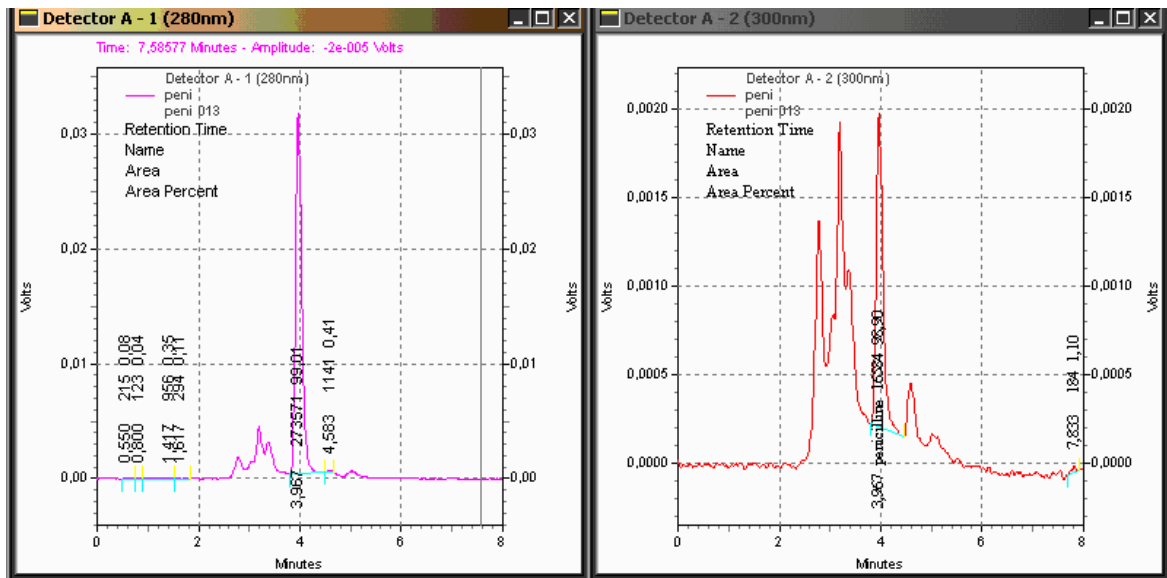


Figure n° 28 : longueurs d'onde 280 et 300 nm

- longueurs d'onde 300 et 330 nm : nous observons dans les deux longueurs des artéfacts et les surfaces sont encore plus petites à 330 nm comme le montre la figure 29

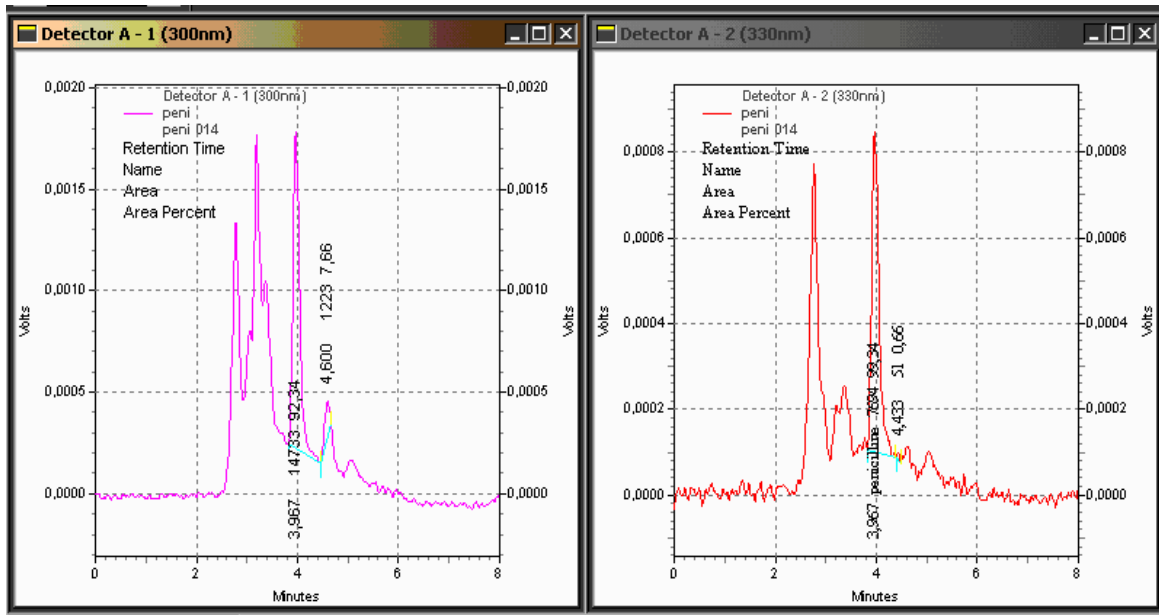


Figure n° 29 : longueurs d'onde 300 et 330 nm

D'après les essais effectués pour optimiser la longueur d'onde, nous constatons que la pénicilline G absorbe dans un spectre allant de 190 à 330 nm mais elle absorbe mieux à 250 nm (les surfaces sont plus grandes) c'est la raison pour laquelle nous avons gardé cette dernière pour la suite de notre expérience.

En comparant notre travail avec d'autres, nous remarquons que la pénicilline peut être recherchée effectivement dans un spectre d'absorption qui s'étale de 210 à 325 nm, ainsi Oruç et Sonal (2005), Boatto et al (1998), Tarbin et al (1995), Furusawa (2000) ont travaillé respectivement sur des longueurs d'onde de 210, 214, 320 et 325 nm. Enfin Samanidou et al (2007) ont travaillé sur une longueur de 240 nm (proche de la longueur d'onde que nous avons gardé pour la suite du travail).

Notant également que tous les auteurs précédemment cités n'ont pas précisé les surfaces correspondantes aux longueurs d'onde utilisées.

2.2.5 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LA PÉNICILLINE G

Les figures 30, 31, 32, 33 et 34 représentent les différents débits expérimentés pour la pénicilline G.

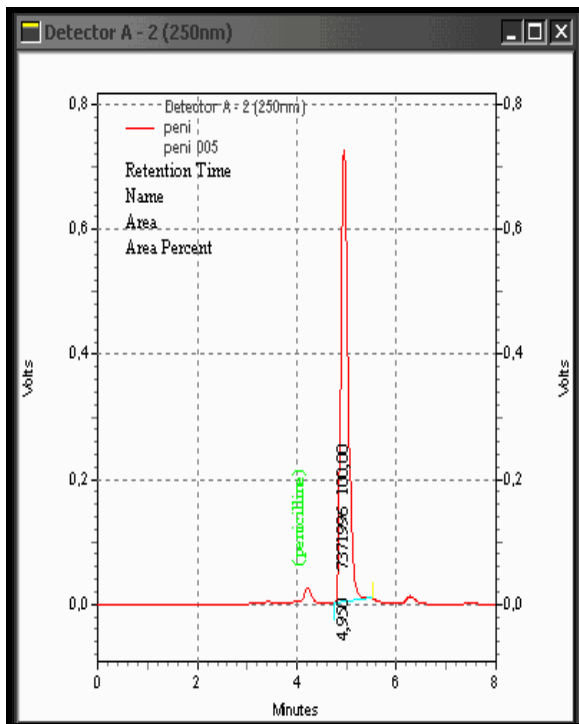


Figure n° 30 : débit 0.8 ml/min

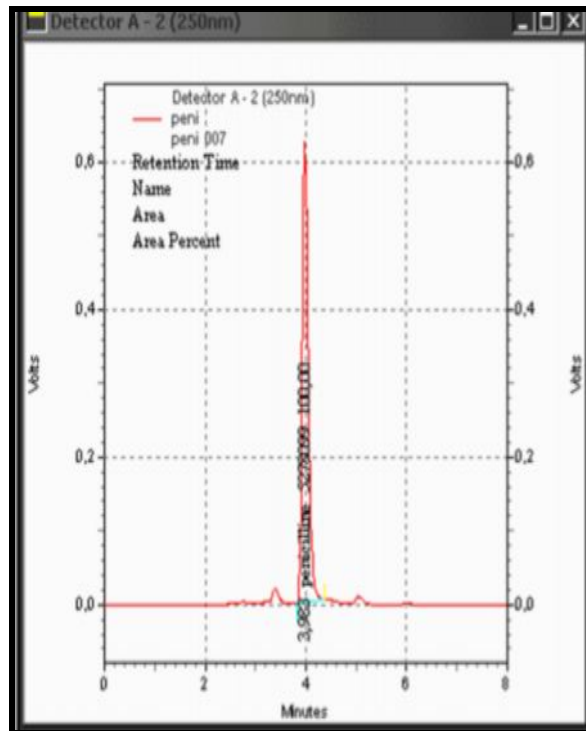


Figure n° 31 : débit 1 ml/min

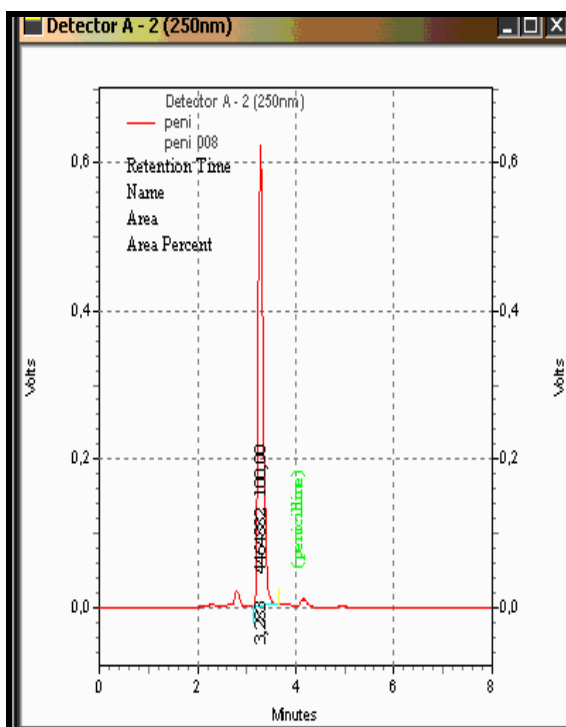


Figure n° 32 : débit 1.2 ml/min

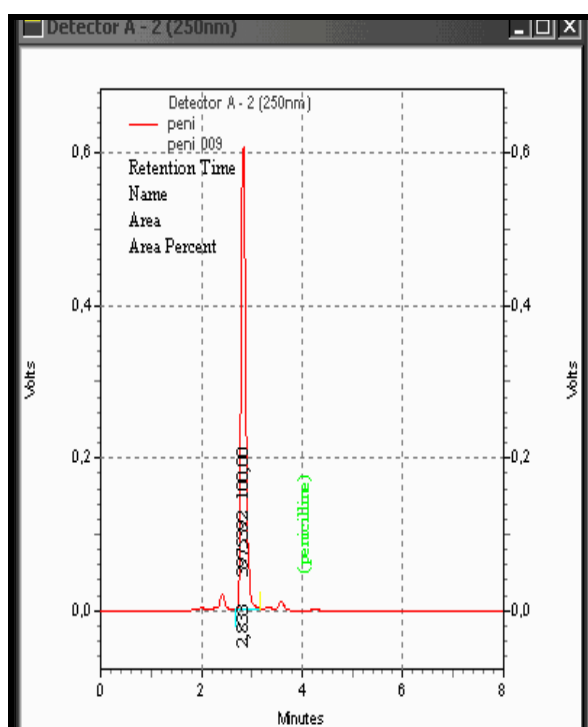


Figure n° 33 : débit 1.4 ml/min

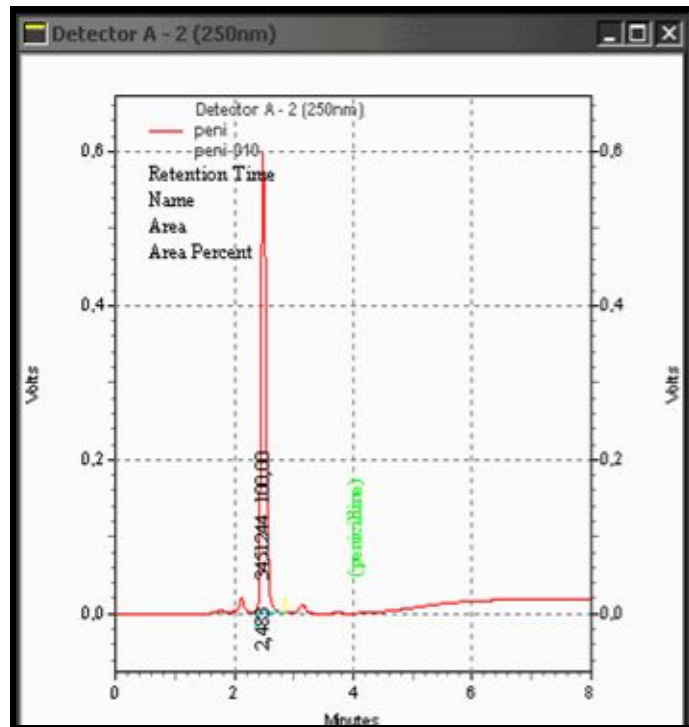


Figure n° 34 : débit 1.6 ml/min

Par définition le débit correspond au volume de la phase mobile circulant au travers de la colonne chromatographique par unité de temps ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$) (Anonyme. b, 2006).

Nous avons remarqué que le débit avec lequel progressent la phase mobile et l'analyte agit sur le temps d'apparition des pics ; l'augmentation du débit diminue le temps d'apparition et vice-versa ainsi :

- avec un débit de 0.8 ml/min, le pic apparaît à 4.95 min
- avec un débit de 1 ml/min, le pic apparaît à 3.98 min
- avec un débit de 1.2 ml/min, le pic apparaît à 3.28 min
- avec un débit de 1.4 ml/min, le pic apparaît à 2.83 min
- avec un débit de 1.6 ml/min, le pic apparaît à 2.48 min

Vue que le débit n'agit que sur le temps d'apparition des pics, nous avons gardé le débit de 1 ml/min pour la suite de notre expérience.

Boatto et al (1998) ont utilisé un débit de 1ml/min et le temps de d'apparition du pic était de 4.24 min ; très proche de notre résultat, Furusawa (2000) a travaillé également avec un débit de 1ml/min avec un temps d'apparition de 4.8 min ; légèrement différent par rapport à notre résultat et enfin Oruç et Sonal (2005) ont

utilisé également un débit de 1ml/min mais ont obtenu un pic à 7.1 min, cette différence vient probablement de la phase mobile utilisée (mélange de méthanol, d'acétonitrile et d'un tampon constitué de potassium dihydrogenphosphate).

Sur le prospectus le pic de la pénicilline G apparaît à 5.01 min avec le débit de 1 ml/min, cette différence de 1.03 min vient éventuellement de la phase mobile (25% acétonitrile + 75% « eau pour HPLC+ 0.07% Na₂HPO₄ »).

2.2.6 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LA PÉNICILLINE G

Les figures 35, 36, 37 et 38 correspondent respectivement aux volumes de 5, 10, 15 et 20 µl.

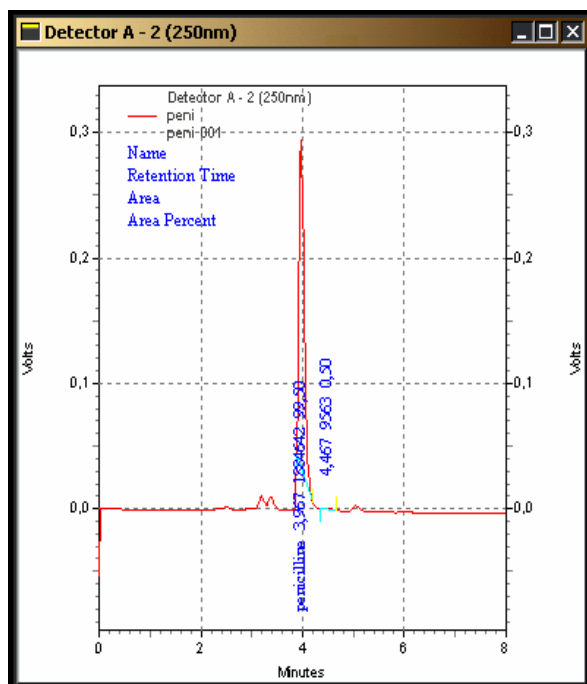


Figure n° 35 : volume d'injection 5 µl

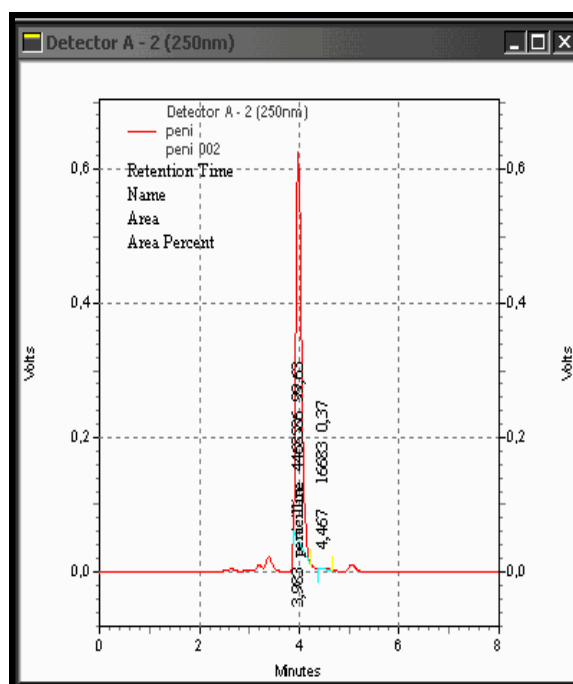


Figure n° 36 : volume d'injection 10 µl

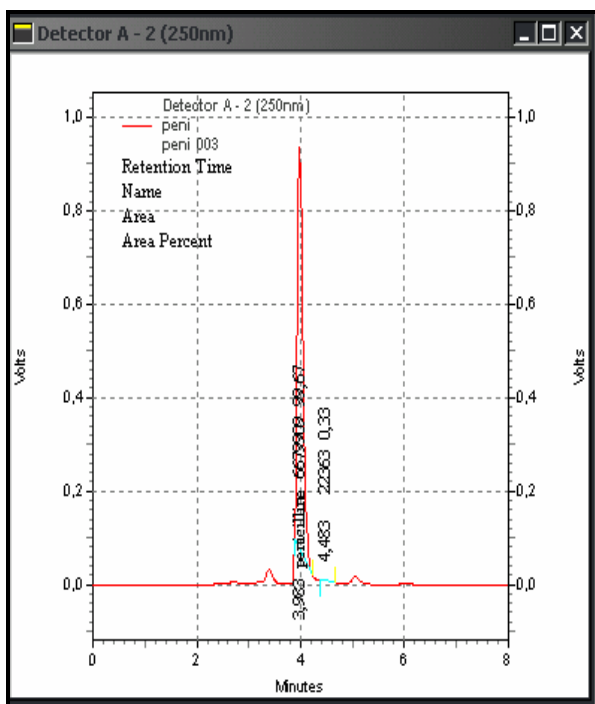


Figure n° 37 : volume d'injection 15 µl

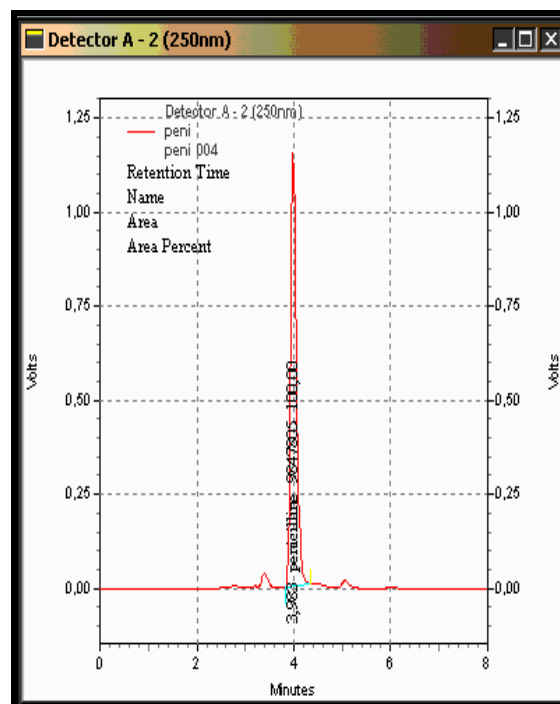


Figure n° 38 : volume d'injection 20 µl

Selon Anonyme. c (2006) l'aire des pics chromatographiques est proportionnelle à la concentration ou à la quantité du produit analysé, effectivement dans notre travail nous avons remarqué que le volume injecté agit sur l'amplitude des pics (et donc sur la grandeur des surfaces) et non sur le temps d'apparition de ces derniers comme le confirme les figures 35, 36, 37 et 38, ainsi la surface obtenue avec un volume de 10 µl par exemple est doublée avec 20 µl.

Pour la suite de notre travail, nous avons gardé le volume de 20 µl.

Oruç et Sonal (2005) et Msagati et Nindi (2005) ont utilisé respectivement des volumes d'injection de 10 et 20 µl mais dans la plupart des publications les surfaces correspondantes aux volumes ne sont pas signalées.

2.3 RÉSULTATS DE L'OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE DÉTECTION DU CHLORAMPHÉNICOL PAR HPLC

2.3.1 RÉSULTAT DE L'UTILISATION DE QUELQUES PARAMÈTRES PRÉCONISÉS SUR LE PROSPECTUS DU CHLORAMPHÉNICOL

Nous avons obtenu un bon chromatogramme avec un pic très fin, une ligne de base intacte et au temps d'apparition de 2.11 min comme le montre la figure 39.

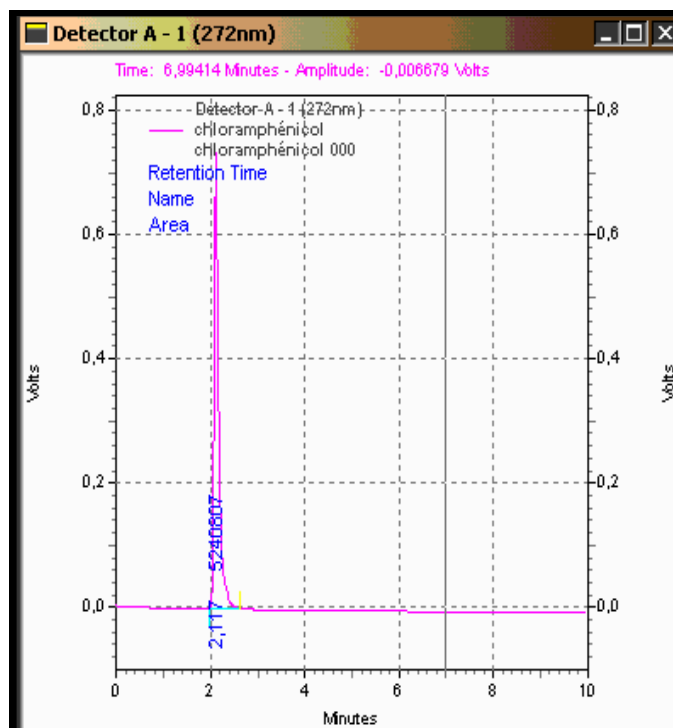
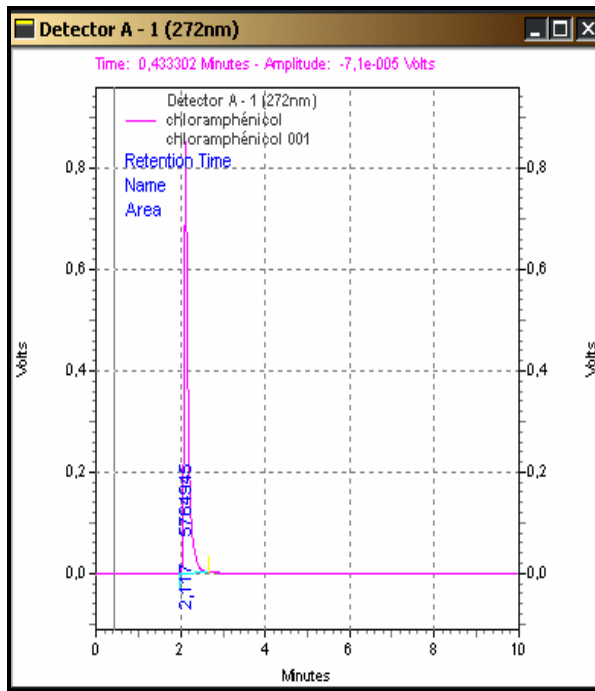


Figure n° 39 : utilisation quelques paramètres mentionnés sur le prospectus du chloramphénicol

Contrairement à la pénicilline G, nous avons obtenu un bon pic de chloramphénicol, du premier coup, en reprenant quelques conditions préconisées sur le prospectus accompagnant le standard, mais nous avons voulu optimiser les différents paramètres de l'analyse HPLC pour voir l'influence du changement de ces derniers sur l'apparition des pics.

2.3.2 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU SOLVANT DE DILUTION DE STANDARD DU CHLORAMPHÉNICOL

- pour le méthanol : nous observons un bon chromatogramme avec un pic très fin comme le montre la figure 40
- pour l'acétonitrile : nous observons également un bon chromatogramme illustré sur la figure 41



Figures n° 40 : solvant de dilution : méthanol

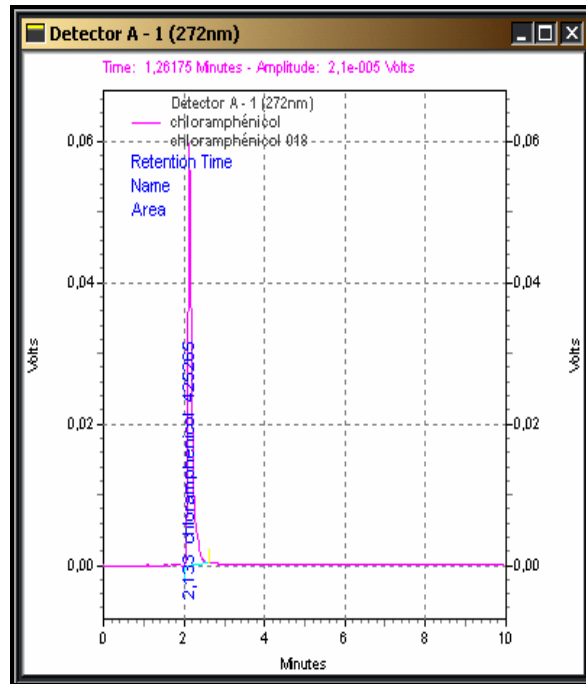


Figure n° 41 : solvant de dilution : acétonitrile

Nous avons obtenu de bons résultats avec les deux solvants de dilution donc nous pouvons constater que la molécule de chloramphénicol se dilue mieux que la pénicilline avec les mêmes éluants, à préciser aussi que le fournisseur du standard n'a pas précisé, sur le prospectus, le solvant de dilution du chloramphénicol.

Linling et al (2008), Pan et al (2006) et Orтели et al (2004) ont utilisé le méthanol pour la dilution des standards, Nicolich et al (2006) ont quant à eux utilisé un mélange de 50% méthanol et 50% eau pour la préparation du standard.

Pour la suite du travail, nous avons gardé le méthanol comme solvant de dilution.

2.3.3 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA PHASE MOBILE POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Nous avons enregistré les mêmes résultats avec les deux phases mobiles utilisées (méthanol ou acétonitrile) comme le montre les figures 42 et 43.

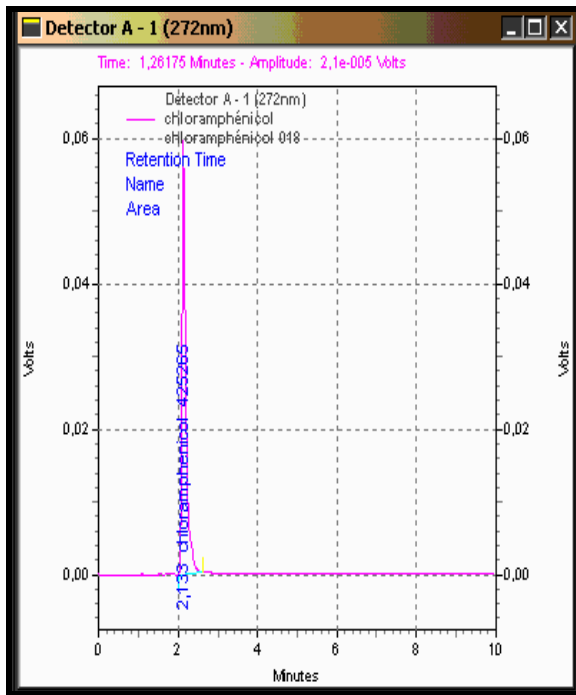


Figure n° 42 : phase mobile méthanol

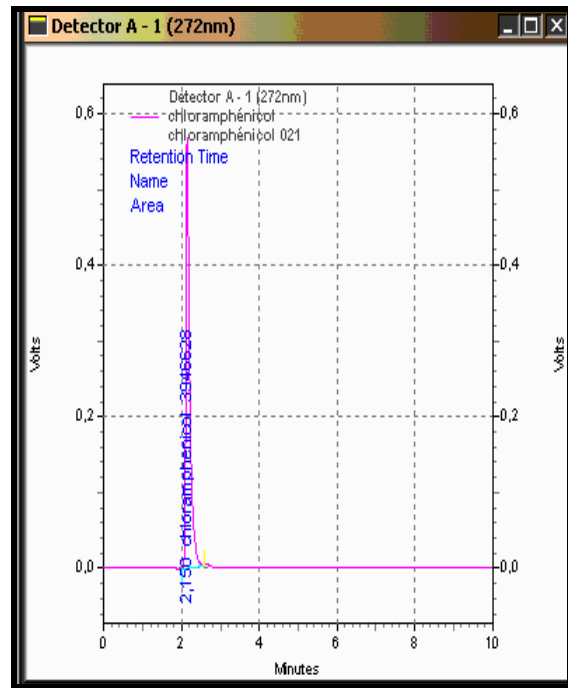


Figure n° 43 : phase mobile acétonitrile

Comme le confirme les figures 42 et 43 nous avons eu de bons résultats avec les deux phases mobiles mais nous avons continué le travail avec le méthanol.

En comparant notre travail avec d'autres, nous constatons que la molécule de chloramphénicol peut être recherchée dans le lait avec les deux modes d'élution :

- en mode isocratique, Pan et al (2006) ont utilisé une phase mobile composée d'un mélange de 45% de méthanol et 55% d'acétate d'ammonium, Linling et al (2008) ont quant à eux utilisé une phase mobile composée de 25% acétonitrile et 75% (0.01mol/l de NaH₂HPO₄ et 0.001 mol/l de Na₂EDTA) le pH est ajusté à 2.5 avec 30% d'acide nitrique
- en mode gradient, Ortelli et al (2004) ont utilisé dans ce cas ; une première phase mobile composée de mélange eau-méthanol et une deuxième phase mobile constituée de mélange eau-acétonitrile, Nicolich et al (2006) ont travaillé également en mode gradient ; la première phase mobile est composée d'acétonitrile plus 0.1% d'acide formique et la deuxième de méthanol plus 0.1% d'acide formique et enfin Guy et al (2004) ont utilisé l'eau pour HPLC comme première phase et l'acétonitrile comme deuxième phase mobile

2.3.4 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DE LA LONGUEUR D'ONDE POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Les figures 44, 45, 46, 47, 48, 49 et 50 correspondent respectivement aux longueurs d'ondes suivantes : 200 nm, 220 nm, 250 nm, 272 nm, 280 nm, 300 nm et 320 nm, nous avons remarqué que le temps d'apparition du pic est le même mais les surfaces sont différentes ainsi :

- à 200 nm les surfaces sont les plus grandes
- à 220 nm les surfaces ont diminué par rapport aux précédentes
- à 250 nm les surfaces diminuent par rapport à 220 nm
- à 272 nm les surfaces augmentent par rapport à 250 nm
- à 280 nm les surfaces diminuent par rapport à 272 nm
- à 300 nm les surfaces diminuent par rapport à 280 nm
- à 330 nm les surfaces diminuent encore plus par rapport à toutes les longueurs d'onde précédentes

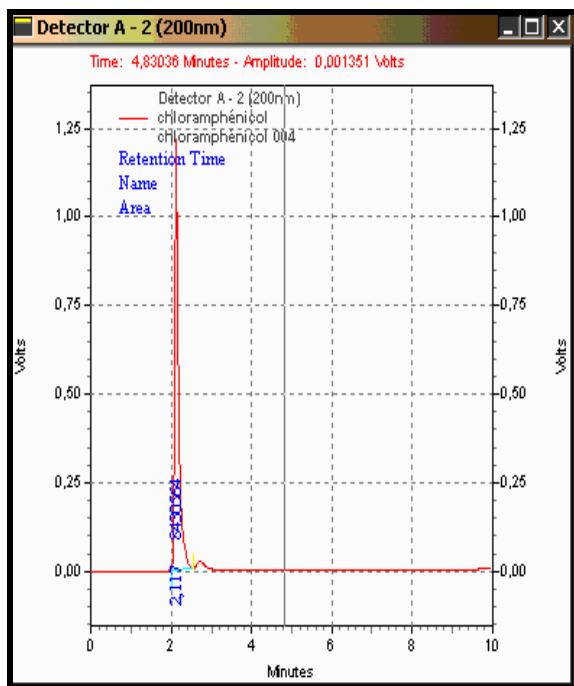


Figure n° 44 : longueur d'onde 200 nm

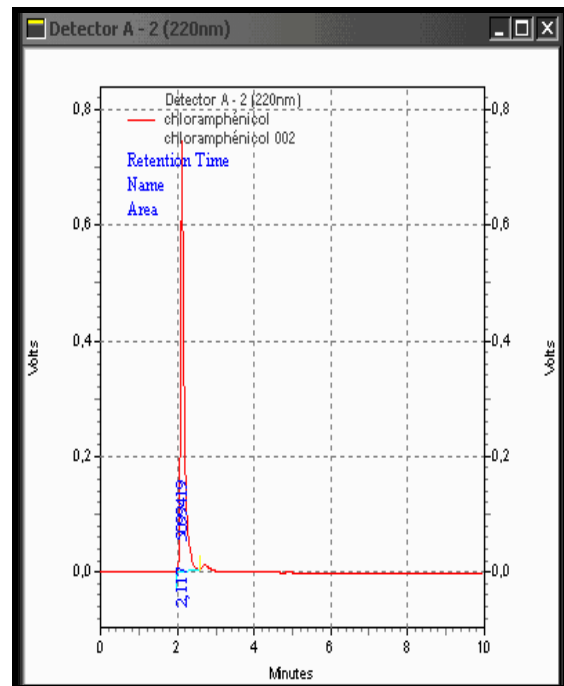


Figure n° 45 : longueur d'onde 220 nm

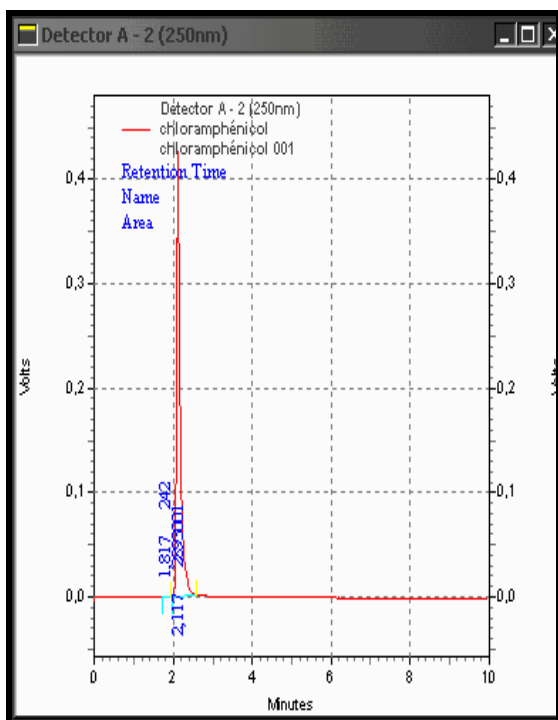


Figure n° 46 : longueur d'onde 250 nm

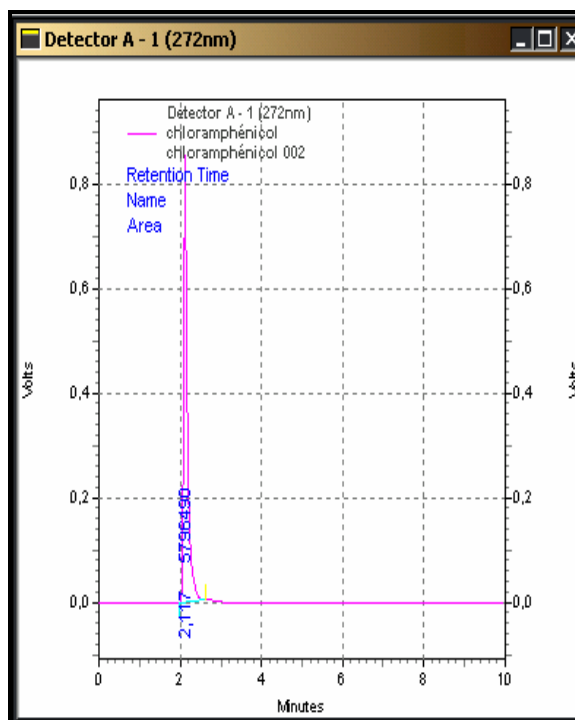


Figure n° 47 : longueur d'onde 272 nm

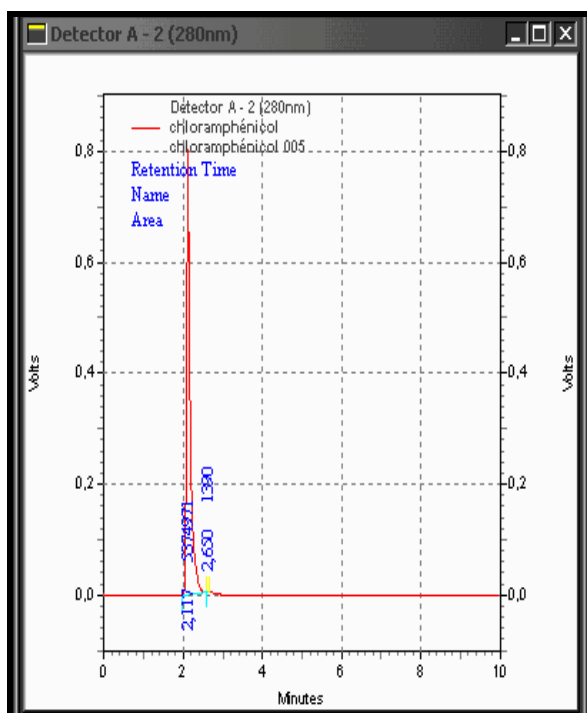


Figure n° 48 : longueur d'onde 280 nm

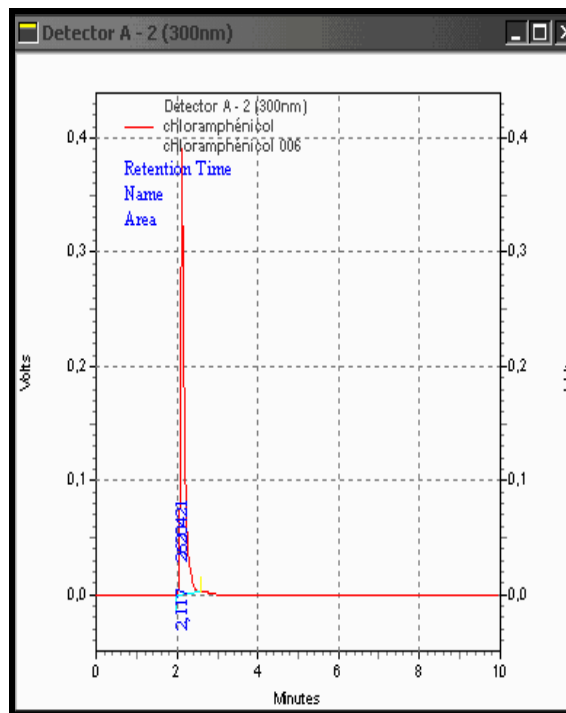


Figure n° 49 : longueur d'onde 300 nm

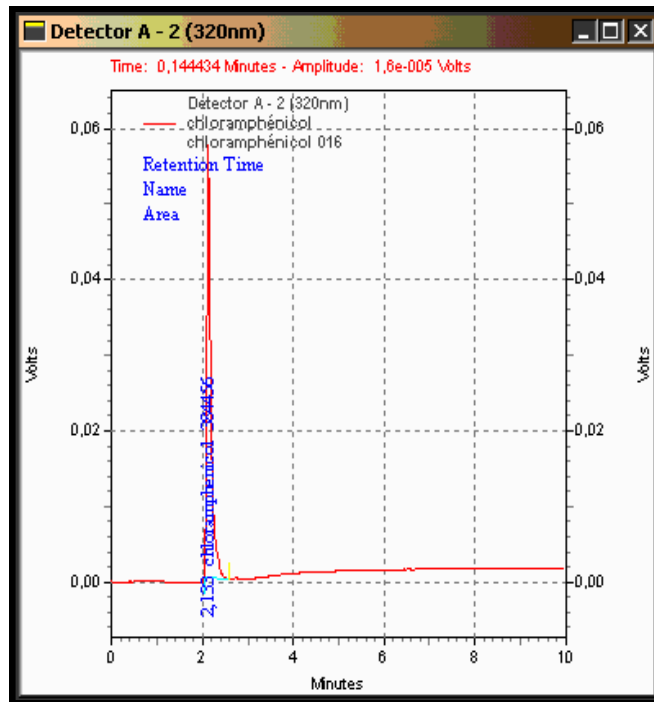


Figure n° 50 : longueur d'onde 320 nm

Nous avons testé plusieurs longueurs d'onde dans un spectre d'absorption allant de 200 à 320 nm, nous avons constaté que 200 nm donne les plus grandes surfaces mais nous avons gardé 272 nm pour la suite de notre expérience car d'une part c'est la deuxième plus grande surface (supérieure aux surfaces obtenues avec 220, 250, 280, 300 et 320 nm) et d'autre part c'est la plus proche de celles utilisées par d'autres auteurs : Pan et al (2006) ont utilisé 278 nm comme longueur d'onde, Linling et al (2008) ont travaillé sur 270 nm.

2.3.5 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU DÉBIT POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Nous avons optimisé le débit dans une fourchette allant de 1 à 1.6 ml/min et nous avons enregistré les observations suivantes :

- pour le débit de 1ml/min le temps d'apparition du pic est de 2.98 min illustré sur la figure 51
- pour le débit 1.2 ml/min, le temps d'apparition est de 2.46 min montré sur la figure 52
- pour le débit 1.4 ml/min le temps d'apparition est de 2.11 min représenté sur la figure 53

- pour le débit de 1.6 ml/min le temps d'apparition est de 1.86 min figuré sur la figure 54

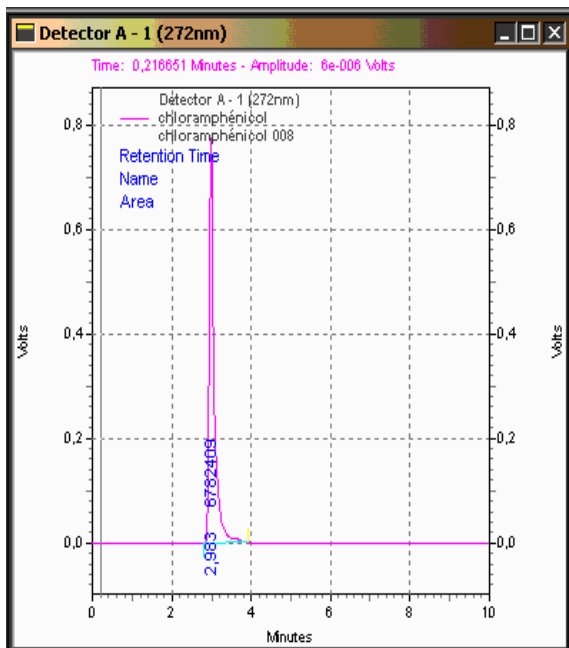


Figure n° 51 : débit 1 ml/min

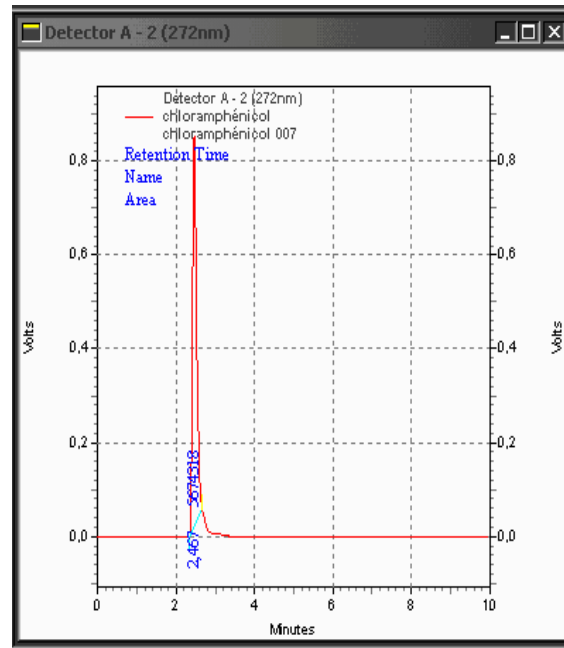


Figure n° 52 : débit 1.2 ml/min

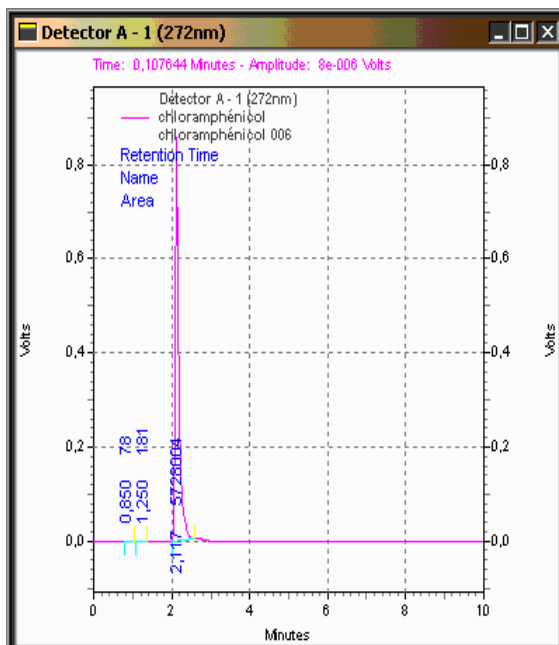


Figure n° 53 : débit 1.4 ml/min

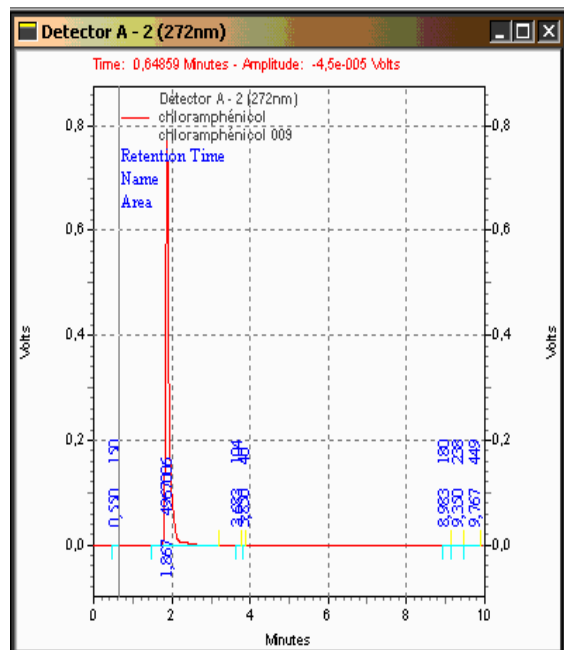


Figure n° 54 : débit 1.6 ml/min

Comme nous l'avons déjà constaté pour la molécule de pénicilline ; le débit agit uniquement sur le temps d'apparition du pic, pour la suite de notre travail nous avons gardé 1.4 ml/min.

Pan et al (2006) ont travaillé avec un débit de 1 ml/min et le temps d'apparition du pic se situe à 3 min (très proche de notre temps d'apparition avec le même débit) par contre Linling et al (2008) ont utilisé également 1 ml/min mais le temps d'apparition est de 10.7 min, cette différence vient probablement de la phase mobile.

Sur le prospectus le temps d'apparition du pic était de 3.44 pour un débit de 1.4 ml/min, cette différence de 1.33 min vient éventuellement de la phase mobile.

2.3.6 RÉSULTAT DE L'OPTIMISATION DU VOLUME D'INJECTION POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

Les volumes 5, 10, 15 et 20 µl sont représentés respectivement sur les figures 55, 56, 57 et 58.

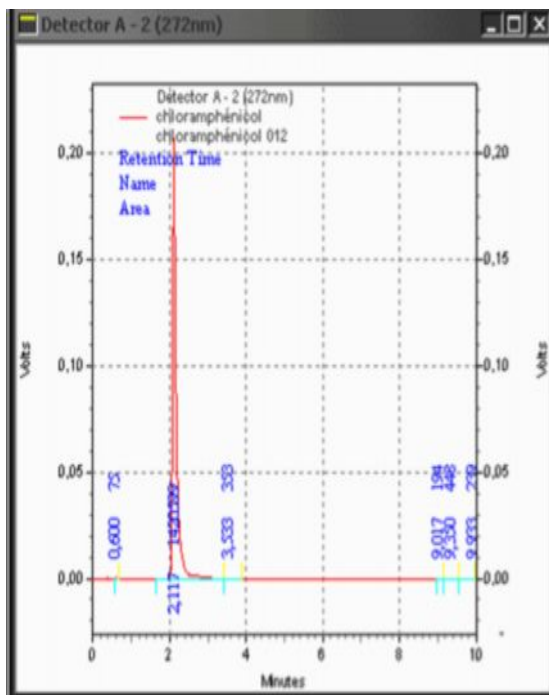


Figure n° 55 : volume 5 µl

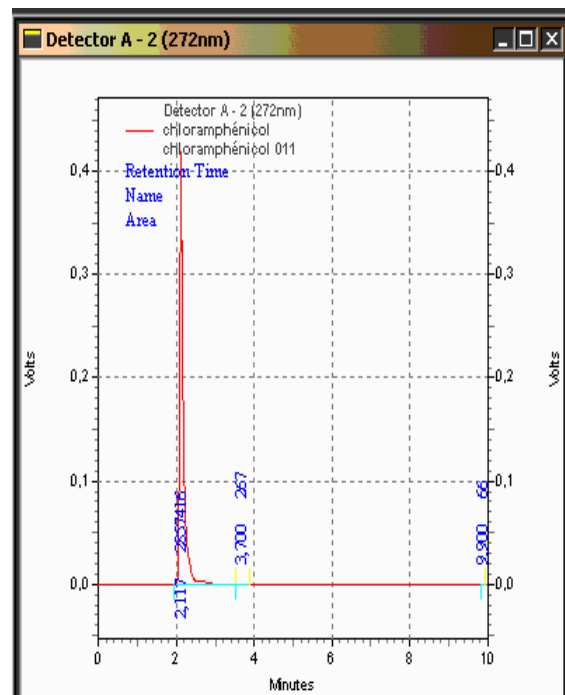


Figure n° 56 : volume 10 µl

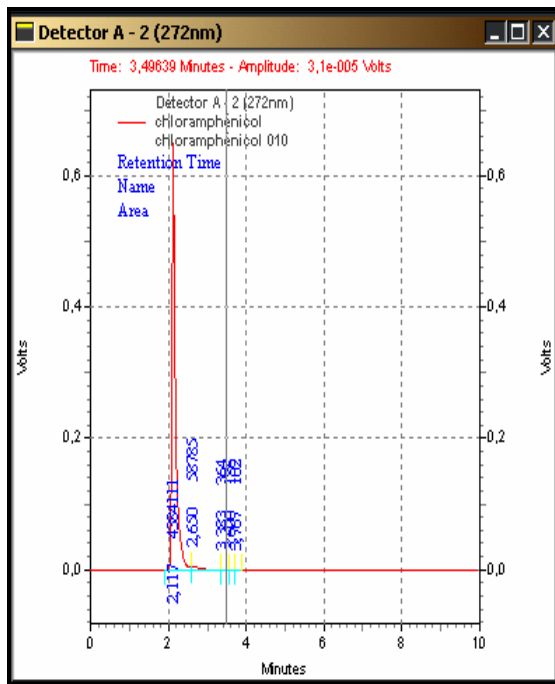


Figure n° 57 : volume 15 μ l

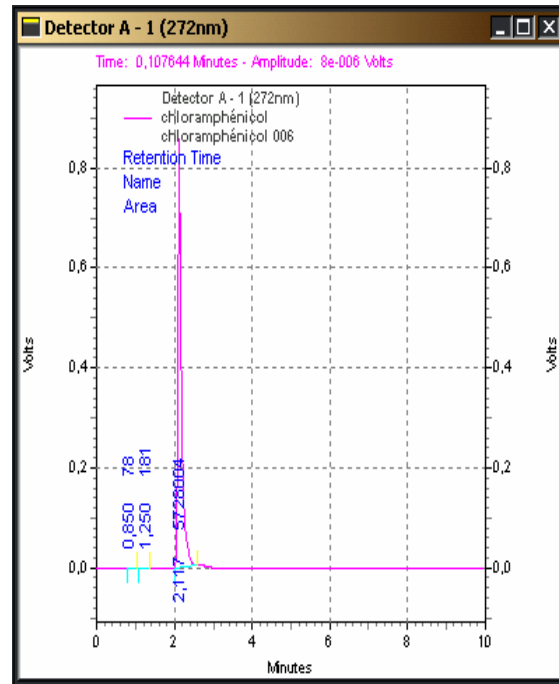


Figure n° 58 : volume 20 μ l

Comme pour la pénicilline G nous constatons que le volume agit sur la grandeur des surfaces, plus le volume augmente et plus les surfaces augmentent aussi. Ainsi la surface obtenue avec le volume de 20 μ l représente le double par rapport à celle obtenue avec un volume de 10 μ l et la surface de ce dernier représente le double par rapport à celle obtenue avec un volume de 5 μ l.

Pour la suite du travail nous avons gardé le volume de 20 μ l.

Là aussi, tous les chercheurs qui ont travaillé sur le chloramphénicol mentionnent le volume injecté sans préciser les surfaces correspondantes.

Exemples : Pan et al (2006), Ortelli et al (2004), Linling et al (2008) et Guy et al (2004) ont utilisé respectivement des volumes de 10, 10, 20 et 15 μ l.

2.4 RÉSUMÉ DES RÉSULTATS OBTENUS : PARAMETRES D'ANALYSE RETENUS

Nos investigations expérimentales nous ont permis de retenir les paramètres d'analyse suivants :

2.4.1 LA PÉNICILLINE G

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne C18 en phase inverse (Gel de silice greffé)
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8 min

2.4.2 LE CHLORAMPHÉNICOL

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (méthanol)
- phase stationnaire : colonne C18 en phase inverse (Gel de silice greffé)
- phase mobile : méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

2.5 FIABILITÉ DE LA MÉTHODE D'ANALYSE AVEC LES PARAMÈTRES RETENUS

2.5.1 LA PÉNICILLINE G

2.5.1.1 LA RÉPÉTABILITÉ

Nous avons calculé la moyenne, la variance et l'écartype pour les trois séries de répétabilité, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 14.

Tableau n° 14 : résultats des calculs statistiques pour les trois séries de répétabilité de la pénicilline

	Série 1	Série 2	Série 3
Moyenne	9536934,2	9518480,6	9544828,6
Écartype	132591,55	171943,39	93079,48
Variance	17580520256	29564530647	8663791447

À partir des résultats obtenus dans le tableau 14 nous avons calculé le t (cal) entre chaque deux séries, ce dernier est ensuite comparé avec le t de la table de student (Berrah, 1984).

Nous avons travaillé avec les risques de 1 et 5% :

1) au risque de 1% t (table) = 4.6

- t (cal) 1 et 2 = 0.1 inférieur à t table (4.6), la différence n'est pas significative
- t (cal) 1 et 3 = 0.04 inférieur à t table (4.6), la différence n'est pas significative
- t (cal) 2 et 3 = 0.11 inférieur à t table (4.6), la différence n'est pas significative

2) au risque de 5% t (table) = 2.78

- t (cal) 1 et 2 = 0.1 inférieur à t table (2.78), la différence n'est pas significative
- t (cal) 1 et 3 = 0.04 inférieur à t table (2.78), la différence n'est pas significative
- t (cal) 2 et 3 = 0.11 inférieur à t table (2.78), la différence n'est pas significative

D'après ces résultats, nous constatons qu'il n'y a pas de différence entre les trois séries (aux risque de 1 et 5%). Donc la méthode d'analyse HPLC est répétable pour la pénicilline G et cela dans nos conditions d'analyse.

Les chromatogrammes correspondants aux trois séries de répétabilité de la pénicilline G sont représentés dans l'annexe 6.

2.5.1.2 LA REPRODUCTIBILITÉ

La moyenne, l'écartype, la variance et l'intervalle de confiance des trois séries de reproductibilité de la pénicilline G sont illustrés dans le tableau 15.

Tableau n° 15 : résultats des calculs statistiques des trois séries de reproductibilité de la pénicilline G

	Série A	Série B	Série C
Moyenne	1025413,9	1028475,35	1025029,2
Écartype	57089,36	52778,67	21708,88
Variance	3259195976	2785588238	471275526
Intervalle de confiance	998040,753 < m < 1052787,05	1003169,09 < m < 1053781,61	1014620,25 < m < 1035438,15

À partir des résultats obtenus dans le tableau 15, nous avons comparé les trois séries entre elles en calculant le t (cal) entre chaque deux séries, ce dernier est comparé ensuite avec le t de la table de Student (Berrah, 1984).

Nous avons travaillé avec des risques de 1 et 5% et selon la table de Student :

1) au risque de 1% t (table) = 2.86

- t (cal) A et B = 0,17 inférieur à t table (2.86), la différence n'est pas significative

- t (cal) A et C = 0,02 inférieur à t table (2.86), la différence n'est pas significative

- t (cal) B et C = 0,27 inférieur à t table (2.86), la différence n'est pas significative

2) au risque de 5% t (table) = 2.09

- t (cal) A et B = 0,17 inférieur à t table (2.09), la différence n'est pas significative

- t (cal) A et C = 0,02 inférieur à t table (2.09), la différence n'est pas significative

- t (cal) B et C = 0,27 inférieur à t table (2.09), la différence n'est pas significative

Il n'y a pas de différence significative entre les surfaces des trois séries d'analyse donc nous pouvons dire que notre méthode d'analyse HPLC pour la pénicilline G est reproductible dans nos conditions d'analyse.

Les chromatogrammes correspondants aux trois séries de reproductibilité de la pénicilline G sont représentés dans l'annexe 8.

2.5.1.3 LA LINÉARITÉ DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

La courbe d'étalonnage pour la molécule de pénicilline G est représentée sur la figure 59.

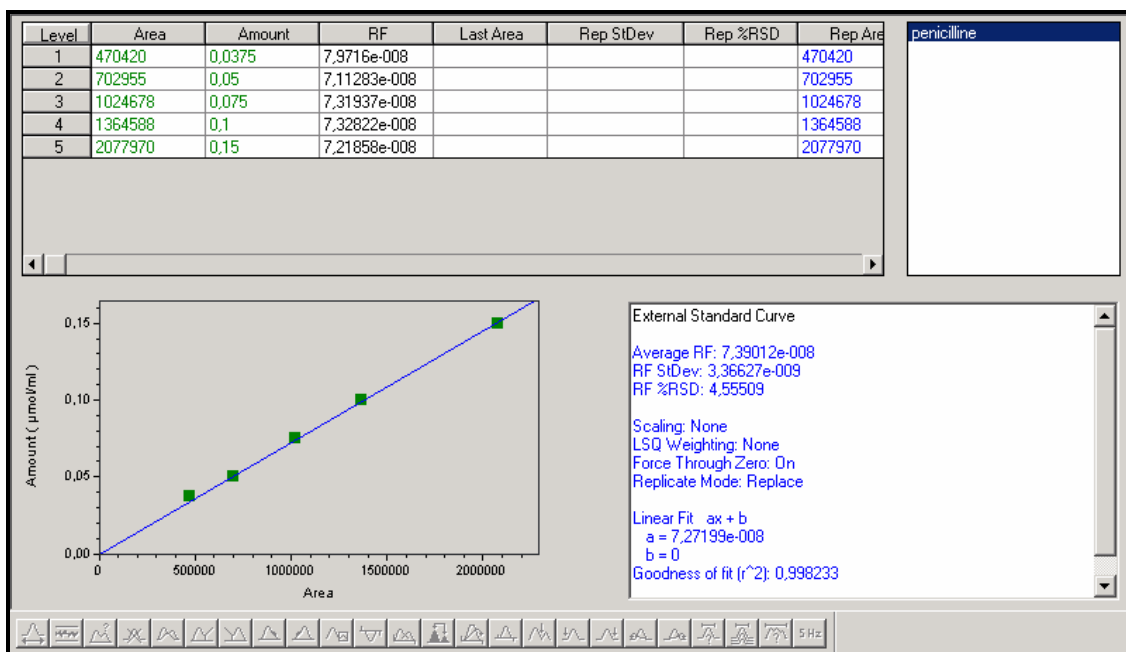


Figure n° 59 : courbe de linéarité de la pénicilline G

Nous avons obtenu une courbe linéaire à partir des concentrations utilisées, cela signifie que plus on augmente la concentration plus les surfaces augmentent. La droite de régression est établie pour les concentrations des dilutions en fonction des surfaces correspondantes, cette dernière est égale à 0.99. Nous avons calculé également le coefficient de corrélation qui est égale à 0,74.

2.5.2 LE CHLORAMPHÉNICOL

2.5.2.1 LA RÉPÉTABILITÉ

Nous avons calculé la moyenne, la variance et l'écartype et nous avons obtenu les résultats représentés dans le tableau 16.

Tableau n° 16 : résultats des calculs statistiques pour les trois séries de répétabilité du chloramphénicol

	Série 1	Série 2	Série 3
Moyenne	3837759,2	3831535,8	3857987
Écartype	101376,76	85134,04	178057,05
Variance	10277247850	7247805977	31704314059

Avec les résultats obtenus dans le tableau 16 nous avons calculé le t (cal) entre chaque deux séries, ce dernier est ensuite comparé avec le t de la table de Student (Berrah, 1984).

1) au risque de 1% t table = 4.60

- t (cal) 1 et 2 = 0,04 inférieur à t table (4.6), la différence n'est pas significative

- t (cal) 1 et 3 = 0,13 inférieur à t table (4.6), la différence n'est pas significative

- t (cal) 2 et 3 = 0,19 inférieur à t table (4.6), la différence n'est pas significative

2) au risque de 5% t table = 2.78

- t (cal) 1 et 2 = 0,04 inférieur à t table (2.78), la différence n'est pas significative

- t (cal) 1 et 3 = 0,13 inférieur à t table (2.78), la différence n'est pas significative

- t (cal) 2 et 3 = 0,19 inférieur à t table (2.78), la différence n'est pas significative

Nous constatons qu'il n'y a pas de différence entre les trois séries, la méthode est donc répétable pour le chloramphénicol dans nos conditions d'analyse.

Les chromatogrammes des trois séries de répétabilité du chloramphénicol sont illustrés dans l'annexe 7.

2.5.2.2 LA REPRODUCTIBILITÉ

À partir des surfaces des trois séries nous avons calculé la moyenne, l'écartype, la variance et l'intervalle de confiance comme le montre le tableau 17.

Tableau n° 17 : résultats des calculs statistiques des trois séries de reproductibilité du chloramphénicol

	Série A	Série B	Série C
Moyenne	3930336,15	3908863,55	3880126,1
Écartype	109704,15	101937,62	127310,031
Variance	12035000855	10391279352	16207844133
Intervalle de confiance	3877735,33<m<3982936,97	3859986,61<m<3957740,49	3819083,63<m<3941168,57

Par la suite nous avons calculé le t (cal) et nous l'avons comparé avec t (table) :

1) au risque de 1% t table = 2.86

- t (cal) A et B = 0,94 inférieur à t table (2.86) ; la différence n'est pas significative

- t (cal) B et C = 0,78 inférieur à t table (2.86) ; la différence n'est pas significative

- t (cal) A et C = 1,76 inférieur à t table (2.86) ; la différence n'est pas significative

2) au risque de 5% t table = 2.09

- t (cal) A et B = 0,94 inférieur à t table (2.09) ; la différence n'est pas significative
- t (cal) B et C = 0,78 inférieur à t table (2.09) ; la différence n'est pas significative
- t (cal) A et C = 1,76 inférieur à t table (2.09) ; la différence n'est pas significative

Nous remarquons qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois séries donc nous pouvons dire que notre méthode d'analyse HPLC pour le chloramphénicol est reproductible dans nos conditions d'analyse.

Les chromatogrammes correspondants aux trois séries de reproductibilité sont illustrés dans l'annexe 9.

2.5.2.3 LA LINÉARITÉ DE LA COURBE D'ÉTALONNAGE

La courbe de d'étalonnage pour la molécule de chloramphénicol est illustrée sur la figure 60.

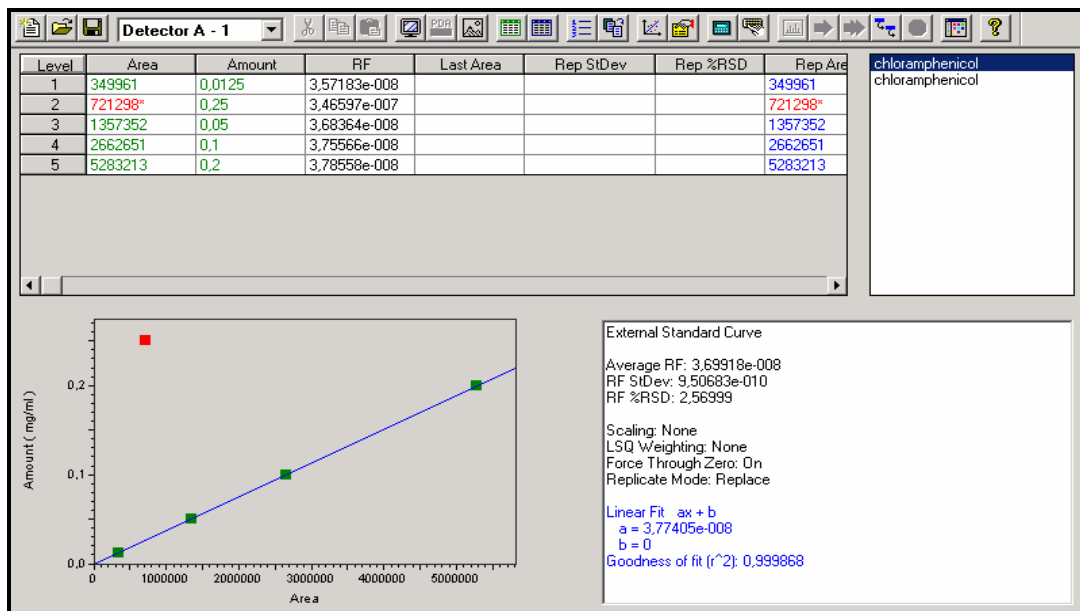


Figure n° 60 : la courbe de linéarité du chloramphénicol

Nous avons obtenu une courbe linéaire à partir des concentrations utilisées. La droite de régression établie pour les concentrations des dilutions en fonction des

surfaces correspondantes est égale à 0.99. Le coefficient de corrélation est égale à 0.99.

2.6 RÉSULTAT DE LA DÉTERMINATION DE LA LIMITE DE DÉTECTION DE LA MÉTHODE D'ANALYSE HPLC

2.6.1 LA LIMITE DE DÉTECTION DE LA PÉNICILLINE G

Les figures 61, 62, 63 et 64 correspondant respectivement aux concentrations suivantes : 0.15 mg/ml, 15×10^{-4} mg/ml, 15×10^{-8} mg/ml et 15×10^{-10} mg/ml et représentent quelques exemples de dilutions utilisées pour la détermination de la limite de détection de notre méthode d'analyse HPLC pour la pénicilline G.

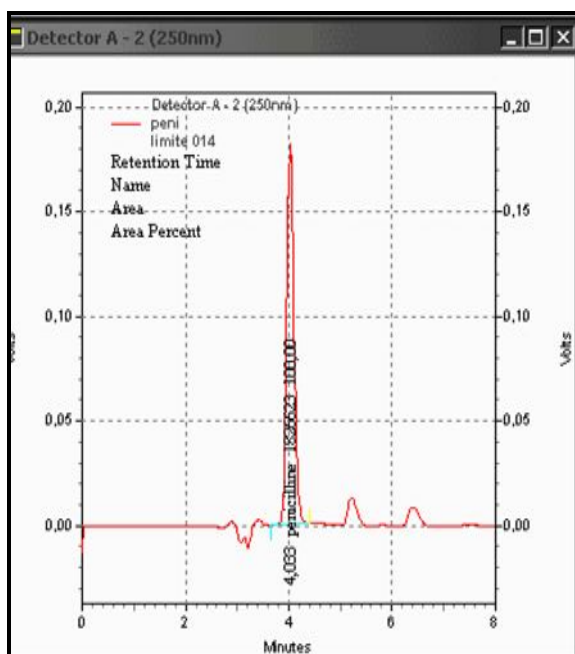


Figure n° 61 : concentration 0.15 mg/ml

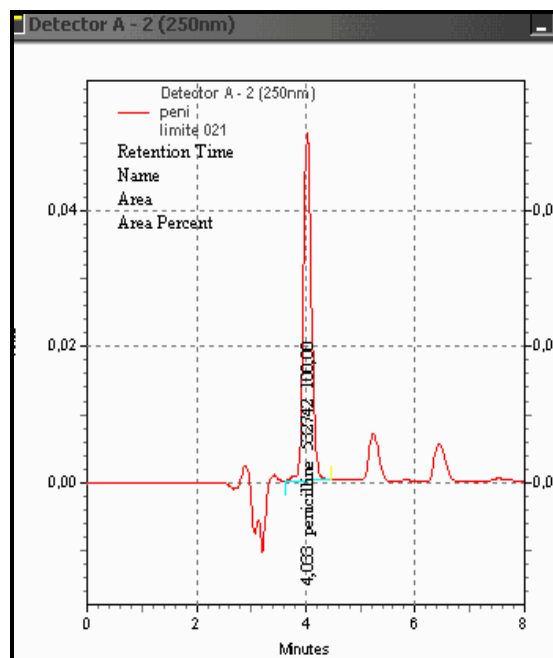


Figure n° 62 : concentration 15×10^{-4} mg/ml

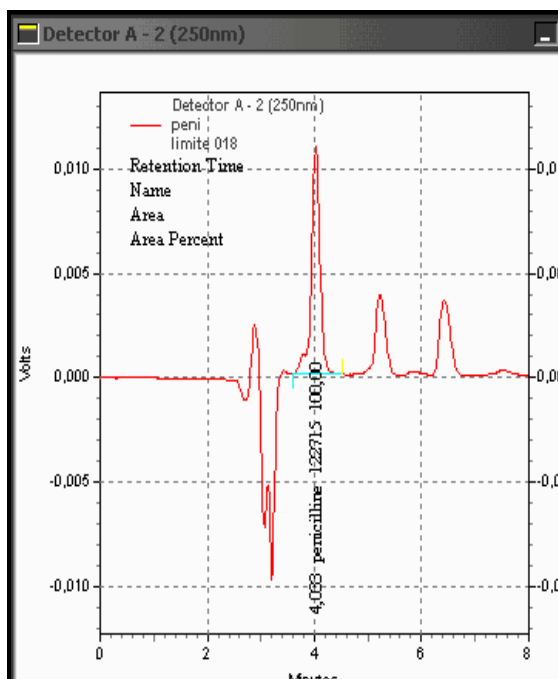


Figure n° 63 : concentration 15×10^{-8} mg/ml

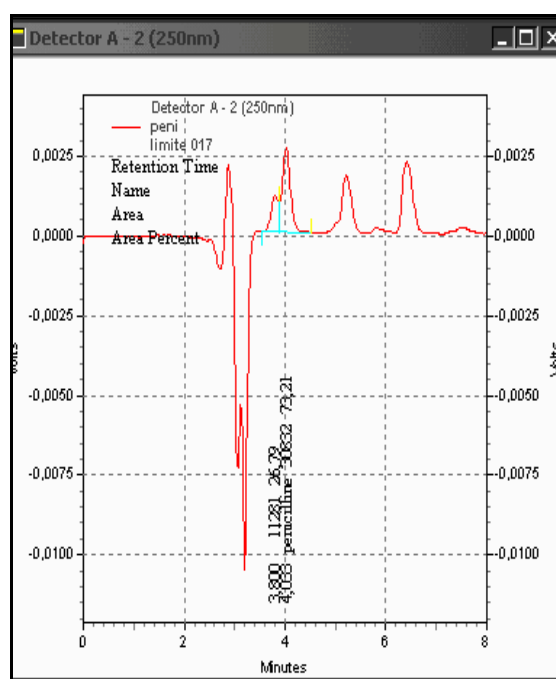


Figure n° 64 : concentration 15×10^{-10} mg/ml

D'après les résultats obtenus avec les différentes dilutions préparées, nous avons remarqué une diminution de l'amplitude et de la surface des pics au fur et à mesure de la diminution des concentrations comme le montre les figures 61, 62 et 63.

Sur la figure 64 nous observons une absence de pics de pénicilline donc la concentration de 15×10^{-10} mg/ml correspond à la limite de détection de notre méthode d'analyse HPLC pour la pénicilline G.

2.6.2 LA LIMITE DE DÉTECTION DU CHLORAMPHÉNICOL

D'après les essais effectués avec les dilutions préparées, nous avons constaté une diminution de l'amplitude et des surfaces des pics au fur et à mesure de la diminution des concentrations.

Les figures 65 et 66 montrent deux exemples de dilutions utilisées (0.2 mg/ml et 2×10^{-4} mg/ml).

Nous avons remarqué qu'au bout de la dilution de 2×10^{-8} mg/ml, il n'y a pas de pic détectable comme le confirme la figure 67.

La concentration de 2×10^{-8} mg/ml correspond donc à la limite de détection de notre méthode d'analyse HPLC pour le chloramphénicol.

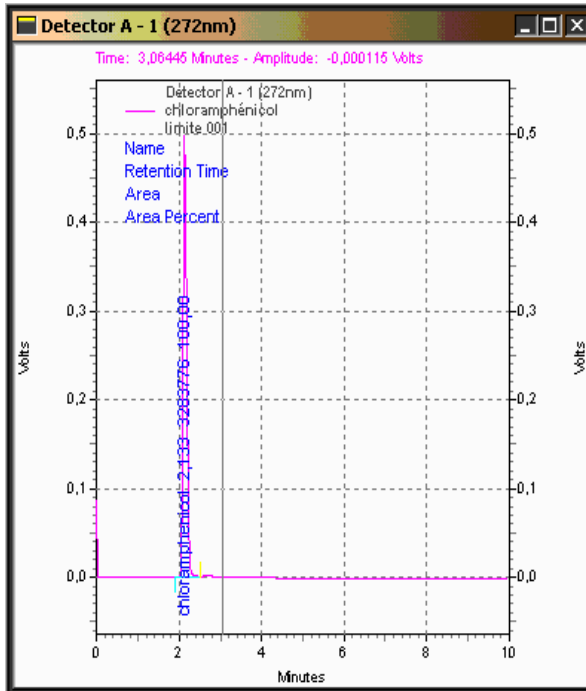


Figure n° 65 : concentration 0.2 mg/ml

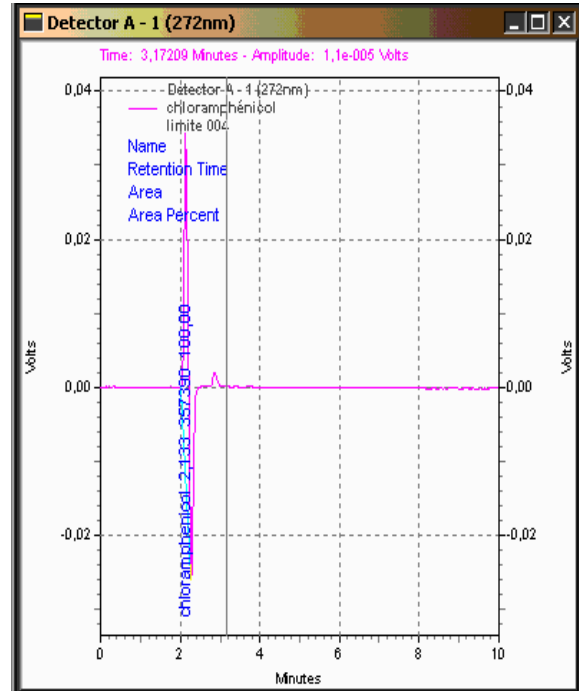


Figure n° 66 : concentration 2×10^{-4} mg/ml

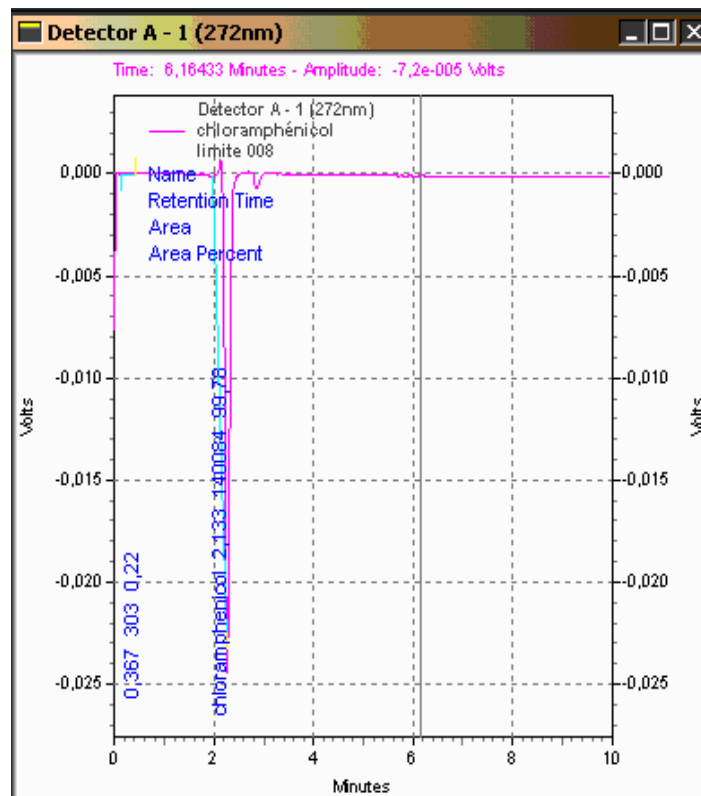


Figure n° 67 : concentration 2×10^{-8} mg/ml

2.7 RÉSULTATS DES ESSAIS DE L'EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Après l'application de la méthode d'extraction à l'échantillon de lait, nous avons obtenu un liquide transparent et homogène, ce dernier est injecté directement dans l'appareil HPLC.

2.7.1 L'ÉCHANTILLON DE LAIT DOPÉ PAR LA PÉNICILLINE G

Pour le premier échantillon E1 dopé par le standard de la pénicilline G nous avons obtenu le chromatogramme représenté sur la figure 68.

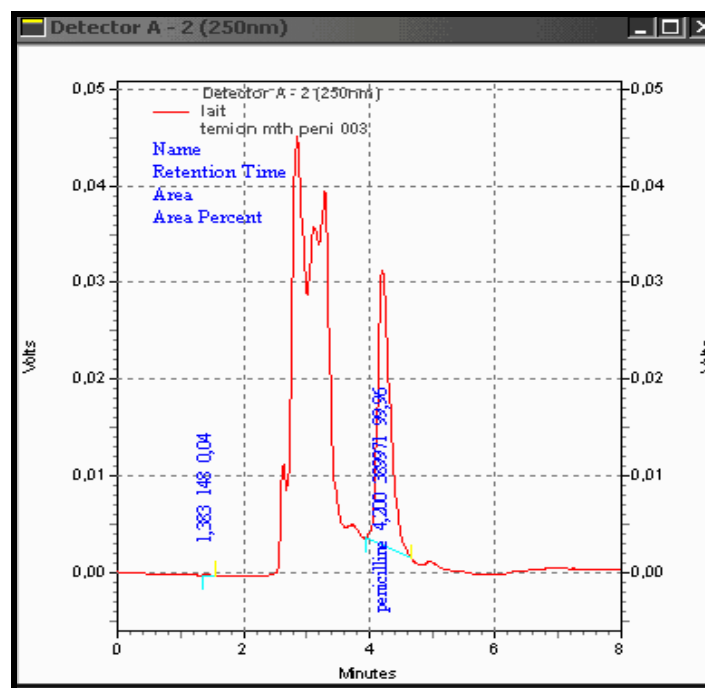


Figure n° 68 : échantillon de lait dopé avec le standard de pénicilline G

Nous observons un pic à 4.2 min qui correspond à la pénicilline G qui a été rajoutée au lait avant l'extraction.

2.7.2 L'ÉCHANTILLON DE LAIT DOPÉ PAR LE CHLORAMPHÉNICOL

Pour le deuxième échantillon E2 dopé avec le standard de chloramphénicol, nous avons obtenu le chromatogramme représenté sur la figure 69.

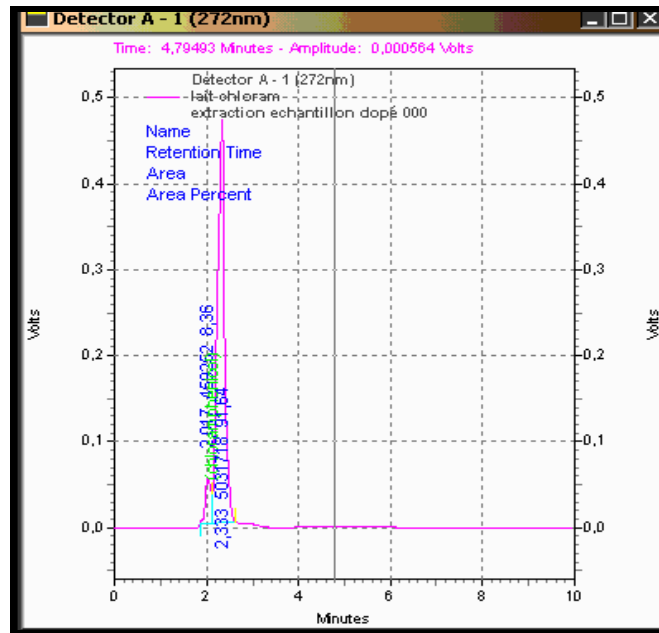


Figure n° 69 : échantillon de lait dopé avec le standard chloramphénicol

Là aussi nous observons un pic de chloramphénicol à 2.33 qui correspond à l'antibiotique rajouté au lait.

2.7.3 L'ÉCHANTILLON DE LAIT TÉMOIN

Pour le troisième échantillon E3 nous avons eu le chromatogramme de la figure 70.

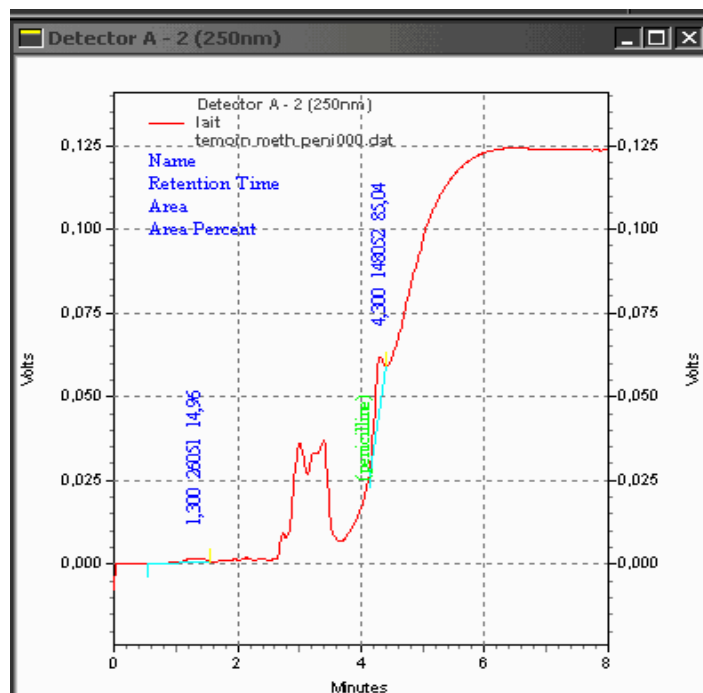


Figure n° 70 : échantillon de lait témoin

Pour le troisième lot témoin, nous observons un chromatogramme caractérisé par l'absence de pics donc ce lot de lait témoin ne contient ni pénicilline ni chloramphénicol.

Nous pouvons dire que la méthode d'extraction adaptée est fiable et peut être appliquée au lait pour extraire les antibiotiques et les doser par HPLC dans nos conditions d'analyse.

CONCLUSION

Nous avons optimisé les paramètres de détection et de quantification des résidus de pénicilline et de chloramphénicol afin de pouvoir, par la suite, les rechercher dans le lait par chromatographie liquide haute performance (HPLC), nous avons fixé les paramètres d'analyse suivants :

1) pour la pénicilline :

- concentration de l'échantillon : 0.15 mg/ml (dilué dans l'acétonitrile)
- phase stationnaire : colonne C18 en phase inverse (Gel de silice greffé)
- phase mobile : méthanol
- volume injecté : 20 µl
- longueur d'onde : 250 nm
- débit : 1ml/min
- temps d'analyse : 8min

2) pour le chloramphénicol

- concentration de l'échantillon : 0.2 mg/ml (dilué dans le méthanol)
- phase stationnaire : colonne C18 en phase inverse (Gel de silice greffé)
- phase mobile: méthanol
- débit : 1.4 ml/min
- longueur d'onde : 272 nm
- volume injecté : 20 µl
- temps d'analyse : 10 min

Nous avons vérifié la fiabilité de notre méthode de travail par l'emploi des tests de répétabilité, de reproductibilité et de linéarité de la courbe d'étalonnage.

Nous avons déterminé également la limite de détection de la méthode HPLC pour la pénicilline et pour le chloramphénicol et cela dans nos conditions d'analyse.

Enfin nous avons mis au point une méthode d'extraction des antibiotiques dans le lait, avec laquelle nous allons par la suite travailler sur un grand nombre d'échantillons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aarestrup .F. M (1999)

Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals.

Revue : J. Antimi-crob. Agents. n° 12, p. 279-285.

2. Abidi. K (2004)

Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson

Thèse : Médecine vétérinaire

École nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie, p. 6-23.

3. Aghuin-Rogister. G (2005)

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse

Revue annal de médecine vétérinaire, n°149, p. 183-187.

4. Allain. P (a) (2006)

Antibiotiques agissant sur la membrane plasmique : colistine

Extrait du livre "Les médicaments" 3^{ème} édition

<http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output>

Date de consultation le 16/11/2007.

5. Allain. P (b) (2006)

Antibiotiques agissant sur la paroi des microbes

Extrait du livre "Les médicaments" 3^{ème} édition

<http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output>

Date de consultation le 16/11/2007.

6. Allain. P (c) (2006)

Bêta-lactamines, pénicillines et céphalosporines

Extrait du livre "Les médicaments" 3^{ème} édition

<http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output>

Date de consultation le 16/11/2007.

7. Amellal. R (1995)

La filière lait en Algérie : entre objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance

Revue : Options Méditerranéennes, Série B, n°14, p. 229-230.

8. Anifantakis. E.M (1980)

Influence de la pénicilline sur la technologie et la qualité du fromage Feta fabriqué à partir du lait de brebis

Revue : le Lait, p. 525-531.

9. Anonyme. a (2007)

Aminosides Sulfamides, Imidazolés, stratégies thérapeutiques

Service de maladies infectieuses et tropicales, Hopital Necker Enfants Malades

<http://www.medecine.univ-paris7.fr>

Date de consultation le 28/11/2007.

10. Anonyme. b (2007)

Antibiothérapie des infections mammaires

Cour École nationale vétérinaire Toulouse

<http://www.physiologie.envt.fr>

Date de consultation le 15/12/2007.

11. Anonyme. c (2007)

Antibiotiques à usage intra mammaire

Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique

<http://www.cbip-vet.be/fr/texts/FIMAMOL1AL2a.php>

Date de consultation le 21/11/2007.

12. Anonyme (1993)

Arrêté interministériel (ministère de l'économie, ministère de l'agriculture et ministère de la santé et de la population) du 18 août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation

Journal officiel de la république algérienne.

13. Anonyme. a (1997)

Arrêté ministériel fixant les méthodes d'analyse pour la détermination officielle de la qualité et de la composition du lait fourni aux acheteurs en France

Arrêté : N8, Annexe 8 : Détection des substances inhibitrices et des sulfamides dans le lait.

14. Anonyme (2003)

Arrêté Ministériel n° 2003-169 du 3 mars 2003 relatif au temps d'attente et aux limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale au Maroc

Journal de Monaco, Bulletin principal de la principauté, n° 7951 du 21/03/2003.

15. Anonyme. a (2006)

Concepts de limite de quantification

Club de Spectrométrie Atomique

http://www.formation-conseil.com/seminaires_clubs/documents/Mermet-Limitequantification.pdf

Date de consultation le 20/04/2008.

16. Anonyme. a (2005)

Cour de chromatographie liquide

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

Date de consultation le 11/11/2007.

17. Anonyme. a (2001)

Document de travail des services de la mise en œuvre des plans nationaux de contrôle des résidus dans les états membres en 2001

Commission européenne

<http://ec.europa.eu>,

Date de consultation le 21/11/2007.

18. Anonyme. b (2005)

Dossier de reconduction de la validation AFNOR du test Beta-star

Valérie GAUDIN – AFSSA Fougères 15 Juin 2005

<http://www.afnor-validation.org/rapports-synthese/pdf>

Date de consultation le 24/02/2008.

19. Anonyme. d (2007)

HPLC

<http://biotechno.ac-rouen.fr/biochimie/hplc/hplcfen.htm>

Date de consultation le 06/04/2008.

20. Anonyme. e (2007)

Introduction à la chromatographie

<http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/HPLC/chroma4.html>

Date de consultation le 12/12/2007.

21. Anonyme. b (2006)

La chromatographie

Cour : Chimie physique expérimentale, université Paris Diderot UFR de Chimie

<http://www.chimiep7.jussieu.fr/spip/IMG/pdf/Cours-L2-Spectro-Chap4a-3.pdf>

Date de consultation le 08/12/2007.

22. Anonyme. f (2007)

La chromatographie liquide haute performance

http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/chrom_08.htm

Date de consultation le 05/02/2008.

23. Anonyme. c (2006)

La chromatographie liquide haute performance

Cours de chimie organique, minérale et structurale, Académie de Nancy, Metz

<http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/Physique/HPLC.htm>

Date de consultation le 25/02/2008.

24. Anonyme. g (2007)

La chromatographie liquide haute performance

TP de chimie

<http://www.iut-lannion.fr/LEMEN/MPDOC/CHIMIE/Chimie1/CHROMLIQ.HTM>

Date de consultation le 06/04/2008.

25. Anonyme. b (1997)

La structure moléculaire de la pénicilline

<http://www.mendeleiev.cyberscol.qc.ca>,

Date de consultation le 15/12/2007.

26. Anonyme. h (2007)

Le Lait

<http://www.wikipedia.fr.org>

Date de consultation le 12/12/2007.

27. Anonyme (2004)

Le lait

Cours de nutrition université de Nantes

<http://www.uvp5.univ-paris5.fr>

Date de consultation le 12/12/2007.

28. Anonyme (1998)

Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine

Archive des documents de la FAO ; Collection FAO: Alimentation et nutrition n° 28

ISBN 92-5-20534-6

<http://www.fao.org>

Date de consultation le 12/12/2007.

29. Anonyme (2000)

Les antibiotiques

Cours de première année de Pharmacie : université de Pharmacie et Ingénierie de la Santé, ANGERS

<http://www.123bio.net/cours/antibio/macrolides.html>

Date de consultation le 02/02/2008.

30. Anonyme. a (2002)

Médicaments actuellement interdits aux Etats-Unis dans le cadre de la production animale (USFDA 2002)

Archives des documents de la FAO

<http://www.fda.gov/cvm/index/updates/nitroup.htm>.

Date de consultation le 15/09/2008.

31. Anonyme. i (2007)

Méthodes d'études des biomolécules

Cour, laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Université de la Réunion

<http://dbbm.univ-reunion.fr>

Date de consultation le 25/11/2007.

32. Anonyme. d (2006)

Pharmacocinétique et modalités d'administration des antibiotiques

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

Date de consultation le 02/02/2008.

33. Anonyme. b (2002)

Pharmacologie générale : définition et origine des antibiotiques

Cours, Université catholique de Louvain, pharmacologie et pharmacothérapie des anti-infectieux

<http://www.antiinfectieux.org/antiinfectieux/PLG/PLG-definition-origine-AB.html>

Date de consultation le 10/11/ 2007.

34. Anonyme. e (2006)

Règlement (CEE) n° 2377/99 et les substances actives présentes dans les spécialités à usage vétérinaires

<http://europa.eu.int/eur-lex>

Date de consultation le 02/02/2008.

35. Anonyme (1995)

Résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments (programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires)
Codex Alimentarius. Volume n°3. 2^{ème} édition.

36. Anonyme. b (2001)

Thérapeutiques Antibiotiques

Thérapeutique dermatologique, Médecine-Sciences Flammarion, 2001

http://www.therapeutique.org/article_main.php?article_id=338

Date de consultation 03/02/2008.

37. Archimbault. Ph, Aubert. A, Haas. P, Clément. M.C, Damaria. M, Petit. M, Thevenot. C (1978)

Résidus de cloxacilline et de néomycine dans le lait après leurs administrations, en association, par voie galactophore

Revue : recueil de médecine vétérinaire, n°154, p. 951-956.

38. Bachot (1981)

Facteurs influençant l'excrétion des antibiotiques dans le lait

Revue : semaine vétérinaire, n° 203. Fév 1981, p. 9.

39. Benelkadi. K (2007)

Industrie du lait en Algérie

Journal el watan, édition du 7 mai 2007 (supplément économie)

40. Berrah. A (1984)

Collection mathématique

Université des sciences techniques Houarri Boumediene

1^{ère} édition, 1984.

41. Bergogne-Bérézin. E et Dellamonica. P (1999)

Antibiothérapie en pratique clinique

Édition MASSON, p. 2-13.

42. Berthe. T, Moisan. A, Carrie. J (2006)

Résidus d'antibiotiques dans les aliments

1^{ères} rencontres des laboratoires publiques de l'ouest

Avril 2006, Ploufragan, France.

43. Billon. J (1981)

Détection des antibiotiques dans le lait

Revue : Semaine vétérinaire. n° 203, p. 7.

44. Boatto. G, Cerri. R, Pau. A, Palomba. M, Pintore. G, Giovanna Denti.M (1998)

Monitoring of benzylpenicillin in ovine milk by HPLC,

Revue : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 17, Août 1998, p. 733-738.

45. Broes. A, Boutin. R (2003)

Conférence : Antibiorésistance : que faire pour les producteurs de porc ?

Congrès du porc du Québec 2003.

46. Bories. G, Louisot. P (1998)

Rapport concernant l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale

Rapport effectué par le président de la Commission interministérielle et interprofessionnelle de l'alimentation animale et la président du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, Conseil supérieur d'hygiène publique de France, p. 3-21.

47. Brouillet .P (1994)

Maîtrise de la présence d'inhibiteurs dans le lait,

Revue : recueil de médecine vétérinaire, n° 170, Juin-Juillet 1994, p. 443-454.

48. Brouillet. P (2002)

Résidus de médicaments dans le lait et tests de détection

Revue : Bulletin des GVT n°15. Mai-Juin 2002, p. 25-41.

49. Broutin. C et al (2005)

Maîtrise de la qualité dans la transformation laitière
Guide de bonnes pratiques d'hygiène, p. 29-31.

50. Caillat. P (2007)

Les microbilles magnétiques traquent les antibiotiques du lait
Article paru dans CEA Technologies n°86, juillet 2007.

51. Canadas. D (2006)

Evaluation du procédé Oxygreen pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition sub-chronique à l'ochratoxine A, sont-ils atténués ?
Thèse pour obtenir le titre de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse, p. 84.

52. Châtaigner. B, Stevens. A (2005)

Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées a Dakar
Institut Pasteur de Dakar, p. 6-9.

53. Cinquina. L, Longo. F, Anastasi. G, Giannetti. L, Cozzani. R (2003)

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

54. Cloeckaert. A, Baucheron. S, Doublet. B, Mouline. C, Payot-Lacroix. S, PraudEquipe. K (2003)

Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, p. 49-54.

55. Corpet. D.E, Brugere. H.B (1995)

Résidus antibiotiques dans les aliments d'origine animale : conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effet chez l'homme

Revue de médecine vétérinaire, n°146, 2, p. 73-82.

56. Courvalin. P (1998)

Transfert de résistance : le réseau, extrait de l'article antibiotiques: alerte aux abus !

Revue : La Recherche, n°314, mai 98, p. 38-40.

57. Davies .J. E (1997)

Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. In:

Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread.

Revue : Ciba Foundation Symposium n° 207, p. 15-35.

58. Delatour. P (1981)

Les médicaments vétérinaires susceptibles de laisser des résidus dans le lait

Revue : semaine vétérinaire, n° 203, Février 1981, p. 10.

59. Diaz. T. G, Cabanillas. A. G (2007)

Rapid Determination of Sulfathiazole, Oxytetracycline and Tetracycline in Honey by High-Performance Liquid Chromatography.

Revue : Analytical Letters, n°23 (4), p. 607-616

60. Doucet. J. F (1998)

Traduction de l'introduction de la première publication de Fleming sur la pénicilline

Édition Landbruksforlaget, Oslo, 1998, p. 80-82.

61. Edder. P, Ortelli. D (2006)

Résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires, de l'étable à la table

Journées scientifiques du CCCTA, 14 septembre 2006, Villars.

62. Enjalbert. F (2002)

Qualité nutritionnelle et diététique du lait en alimentation humaine

Revue : Bulletin des GVT, n°15, Avril-Mai-Juin, 2002, p. 57-58.

63. Fabre. J.M, Bouquet. O, Petit. C (2006)

Extrait du livre : Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, p. 25-47.

www.editions.educagri.fr/publication/extrait.pdf

Date de consultation le 13/02/2008.

64. 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, n°151, p. 965-968.

65. Fabre. J.M et Joyes. D (2000)

Résidus dans le lait : observation des inhibiteurs bien utiliser les médicaments
proceedings : lait, qualité et santé, p. 10-12.

66. Fabre. J.M, Lepoutre. D (2002)

Changement de méthode de détection des inhibiteurs : les conséquences pour les vétérinaires et les éleveurs

Revue : Bulletin des GVT, n°15. Avril-Mai-Juin 2002, p. 33-34.

67. Fabre. J.M, Moretain. J.P, Ascher. F, Brouillet. P (1996)

Les principales causes d'inhibiteurs dans le lait

Revue : Bulletin des GVT, Mars 1996, p. 27-31.

68. Fabre. J.M, Moretain. J.P, Berthelot. X (2002)

Évolution de la méthode interprofessionnelle de recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait

Revue : Bulletin des GVT, n°15. Avril-Mai-Juin 2002, p. 26-28.

69. Federicci-Mathieu. C (2000)

Résidus dans le lait et sécurité alimentaire : quels risques ? quels moyens de maîtrise ?

Revue : Bulletin des GVT, n°7, Avril-Mai 2000, p. 21-22.

70. Follet. G (2007)

Utilisation des antibiotiques chez l'animal : Problèmes et Actions
Rencontres Parlementaires "Santé - Société - Entreprise"
Assemblée Nationale du 12 novembre 2007 en France.

71. Furusawa. N (2000)

Rapid liquid chromatographic determination of residual penicillin G in milk,
Revue: Fresenius J Anal Chem 2000. n°368, p. 624–626.

72. Gatermann. R et Bruns .S (2004)

Résidus d'antibiotiques dans l'alimentation humaine et animal : état des lieux et
perspective
Revue : EUROFINS, n°15. Mai 2004, p. 2.

73. Gaudin. P (1999)

Origines et conséquences des substances dites inhibitrices dans la filière lait : étude
au niveau d'un groupe laitier.
Thèse doctorat vétérinaire, école vétérinaire de Nantes, année 1999, p. 26.

74. Gaynes .R. et Monnet .D (1997)

The contribution of antibiotic use on the frequency of antibiotic resistance in
hospitals. In: Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread.
Revue: Ciba Foundation Symposium, n°20, p. 47-56.

75. Gehring, Smith (2006)

An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparation used to
treat bovine mastitis
Revue: Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy (2006), n°29, p. 237-241.

76. Giraudet. C.G.G (1978)

Étude et prophylaxie des accidents de fromagerie dus à une contamination du lait à
la ferme par les germes de souillure
Thèse doctorat vétérinaire (1978) école nationale vétérinaire de Toulouse, p. 16-19.

77. Griffoul. B (2007)

Une production laitière fortement dépendante des importations

Revue : Réussir Lait Élevage Avril 2007.

78. Guerin. P, Guerin-Fauble. V (2007)

Mammites de la vache laitière

Thèse docteur vétérinaire, école nationale vétérinaire de Lyon, p. 77-117.

79. Guillemot. M.D et al (2006)

Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine

Document AFSSA (Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments), p. 49-55.

80. Gustavsson. E, Bjurling. P et Sternesjö. A (2002)

Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity

Revue : Analytica Chimica Acta, Volume 468, Septembre 2002, p. 153-159.

81. Guy. P, Royer. D, Mottier. P, Gremaud. E, Perisset. A, Stadler. R (2004)

Quantitative determination of chloramphenicol in milk powders by isotope dilution liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Revue : Journal of Chromatography A, n°1054 (2004), p. 365–371.

82. Gysi. M (2006)

Antibiotiques utilisés en production laitière en 2003 et 2004

Revue : suisse Agric. n°38 (4), p. 215-220.

83. Helali. A (1999)

Pharmacologie fondamentale et clinique à l'usage des étudiants en médecine

Édition ENG, p. 135.

84. Helio. A, Martins. J, Tereza. A, Kussumi. A, Wang. D, Lebre. T (2007)

A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry

Revue: Journal of the Brazilian Chemical Society, volume 18, n°2 São Paulo. Mars-Avril 2007, p. 52-71.

85. Hennel. C. K (2006)

Pharmacovigilance vétérinaire : application aux médicaments anti-bactériens, anti-inflammatoires et antiparasitaires disponibles en médecine équine

Thèse de Doctorat vétérinaire, année 2006, faculté de médecine de Créteil, p. 83-99.

86. Karst. C (1984)

Les résidus du chloramphénicol : leur rôle dans les anémies aplasiques humaines

Revue : la semaine vétérinaire, n° 332, Avril 1984, p. 19.

87. Kölbener. P et al (2005)

Résidus de médicaments vétérinaires

Manuel suisse des denrées alimentaires, Chapitre 55, p. 1.

88. Labie. Ch (1985)

Denrées d'origine animale : Actualité sur les résidus dans les aliments

Revue de médecine vétérinaire, n°2, février 1985, p. 99.

89. Labie. Ch (1981)

Dispositions législatives destinées à éviter la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait

Revue : recueil de médecine vétérinaire, n°157, p. 161-167.

90. Laurentie. M, Sanders. P (2002)

Résidus de médicaments vétérinaires et temps d'attente dans le lait

Revue : Bulletin GVT, n°15, Avril-Mai-Juin 2002, p. 51-55.

91. Lazak. M, Mâamar. G (1978)

Contrôle de la qualité du lait commercialisé par les crémiers de Constantine : étude physico-chimique et pollution chimique

Mémoire d'ingénieur d'état en industrie alimentaire, Constantine, p. 2-3.

92. Lechat. P, Bisseliches. F, Chardeau. P, Dechy. H, Juillet. Y, Laugier. Y, Mazzola. CH, Sterin. P, Warnet. A, Weber. S (1975)

Classification des antibiotiques

Édition MASSON, 2^{ème} édition, p. 98-99.

93. Lescoeur. E (2003)

Le tarissement

Revue : GDS (Groupement de défense Sanitaire de l'Isère), p. 35.

94. Le Talec. J.I (1981)

Les médicaments susceptibles de laisser des résidus dans le lait

Revue : Semaine vétérinaire, n° 203, p. 7.

95. Linling. W, Hai. Y, Chunwei. Z, Yulin. M, Xiaohua. L (2008)

Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography

Revue : Analytica chimica acta Janvier 2008, p. 1-5.

96. Luquet. F.M (1985)

Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre)

Édition Tec.Doc.Lavoisier, tome 1, p. 410-412.

97. Maghuin-Rogister. G, Janosi. A, Helbo. V, Van Peteghem. C, Sanders. E, Van Eeckhout. E, Cornelis. M et Jouret. M (2001)

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

Services scientifiques du premier Ministre Affaires scientifiques, techniques et culturelles (SSTC) France. Rapport Final SSTC, p. 13-58.

98. Mamart. M (2007)

Filière lait en Algérie : Pour quand l'autosuffisance ?

Journal el Watan, édition du 7 mai 2007.

99. Marcoz. N (2003)

Étude de stabilité des solutions injectable d'amiodarone

Mémoire pour le travail de diplôme d'analyse pharmaceutique, université de Genève, p. 10-11.

100. Mathieu. J (1998)

Initiation à la physicochimie du lait, guides technologiques des industries agro-alimentaires

Édition Lavoisier Tec&doc, p. 178-192.

101. Merad. M et Merad. R (2001)

Toxicité des antibiotiques

Revue médecine du Maghreb 2001, n°91, p. 17.

102. Mietton. B, Desmazeaud. M et Deroissart. H (1994)

Les bactéries lactiques

Édition Lavoisier, volume 2, p. 55-134.

103. Milhaud. G (1981)

Appréciation de la nuisance des résidus d'antibiotiques : toxicité directe du chloramphénicols

Revue : Semaine vétérinaire, n° 203, p. 8.

104. Milhaud. G, Pinault. L, Person. J.M, Bodin. G, Puyt. J. D, Enriquez. B et Euzeby. J (1982)

Les antibiotiques

École nationale vétérinaire d'Al Fort et de Nantes, p. 2-135.

105. Mitchell. M (2005)

Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait de chèvre

Revue : Artificial Intelligence, n° 170(18), p. 1194-1212.

106. Moretain. J.P (2000)

La recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait

Proceedings lait, qualité et santé, p. 19-22.

107. Moulin. G (1999)

Code de bon usage des antibiotiques en élevage

Conférence : the use of antibiotics in animals ensuring the protection of public health

Mars 1999 OIE, paris, France.

108. Mourot. D (1981)

Appréciation de la nuisance des résidus d'antibiotiques : la nuisance technologique

revue : Semaine vétérinaire, n° 203, p. 8.

109. Mourot et Loussouarn (1981)

Sensibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire

Revue : recueil de médecine vétérinaire, n°157, p. 155-157.

110. Msagati. T, Nindi. M (2005)

Determination of b-lactam residues in foodstuffs of animal origin using supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry

Revue: Food Chemistry 100 (2007), p. 836-844.

111. Nicolich. R, Werneck-Barroso. E, Sipoli Marques. M (2006)

Food safety évaluation: Détection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Revue : Analytica Chimica Acta 565 (2006), p. 97–102.

112. Oliveira. R, De Pietro. A, Cass. Q (2006)

Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup

Revue : Talanta n° 71, p. 1233–1238.

113. Oruç. H, Sonal. S (2005)

Determination of Oxytetracycline, Penicillin G and Sulphadimidine Residues in Cow Milks in Bursa (Turkey)

Revue: Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med. N° 24 (2005), p. 11-13.

114. Ortelli. D, Edder. P, Corvi. C (2004)

Analysis of Chloramphenicol Residues in Honey by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

Revue: Chromatographia 2004, n° 59, Janvier 2004, p. 61-64.

115. Ouellette. D (2004)

Du bon lait pour du bon fromage

Conférence : symposium sur les bovins laitiers, 21 octobre 2004, hôtel des seigneurs, saint-hyacinthe, Québec, Canada.

116. Pan. C, Zhang. H, Chen. S, Xu. Y, Jiang.S (2006)

Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chromatography–mass spectrometry after use of quechers clean-up, ACTA

Revue : Chromatographica, n° 17, p. 320-326.

117. Panaiva. L (2006)

Techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites

Conférence Eurocopter, 1^{er} Juin 2006, Marseille, France.

118. Pepin. G, Boudene. CI (1977)

Traitement des femelles laitières par voie galactophore à l'aide d'une nouvelle pénicilline semi synthétique

Revue : recueil de médecine vétérinaire, n°153. p 565-571.

119. Perlemuter. L et al (2000)

Pharmacologie : nouveau cahier de l'infirmière

Édition MASSON, p. 63.

120. Person. J. M (1984)

Influence des résidus d'antibiotiques sur la flore digestive du consommateur

Revue : Semaine vétérinaire, n° 203, Février 1981, p. 8.

121. Puyt. J.D (2003)

Des résidus de médicament très surveillés

Revue : Réussir Lait Élevage, Réussir Bovins Viande : Dossier spécial médicaments vétérinaires, Décembre 2003.

122. Ramirez. A, Gutiérrez. R, Diaz. G, González.C, Pérez. C, Vega. S, Noa. M (2002)

High-performance thin-layer chromatography-bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk

Revue: Journal of Chromatography B, n° 784 (2003), p. 315–322,

123. Raskin. P, Romnee. J.M, Kerrou. M, Dufrasne. I, Istasse. I (2007)

Inhibitory substances of bacillus steathermophilus var.calidolactis present in milk of cow with no antibiotic treatment

Revue: Renc. Rech. Ruminants, n°4, p. 291.

124. Rexach. L, Petransxiene. D (1987)

Détection et identification des antibiotiques dans le lait au moyen de récepteur de fixation microbien (Chram test II)

Revue : Science des aliments, Volume 7 N° Hors série VII, 1987, édition LAVOISIER, p. 275-278.

125. Reybroeck. W (2004)

Résidus d'antibiotiques dans le lait : Utilisation des kits de dépistage des inhibiteurs

Revue : le Point Vétérinaire, n° 242, Janvier-Février 2004, p. 52-57.

126. Robb. Ed (2006)

Pour un fromage de meilleure qualité

Revue : pour l'amour des vaches, Volume 5, n°1, p. 6.

127. Romnee. J.M (2007)

Le contrôle des antibiotiques à la ferme : hier et aujourd'hui
Laboratoire national de référence, lait et produits laitiers
Journée d'étude le 7 mai 2007, AFSCA.

128. Romnee .J.M, Raskin. P, Istasse. L, Laloux. J, Guyot. A (1999)

Incidence des facteurs alimentaires sur l'obtention de résultats faux positifs lors de la détection des antibiotiques dans le lait par la méthode Delvotest SP
Revue : Lait, n°79. Inra/Elsevier, Paris, p. 341-346.

129. Rychembusch. V (2003)

Les antibiotiques sont de précieux alliés à préserver
Revue : Réussir Lait Élevage / Réussir Bovins Viande : dossier spécial médicament vétérinaire Décembre 2003.

130. Ryckaert. I et al (2003)

42 questions sur le lait
Édition IMP Bruxelles, septembre 2003, p. 13-56.

131. Sachot. D, Puyt .J.D (2001)

Les différents calculs du temps d'attente
Revue : le point vétérinaire, n° 212, Janvier-Février 2001. p 48-51.

132. Samanidou. VF, Nisyriou. SA, Papadoyannis. IN (2007)

Development and validation of an HPLC method for the determination of penicillin antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union Decision 2002/657/EC
Revue : J Sep Sci. 2007, n°30 (18), p. 193-201.

133. Sanders. P (2005)

L'antibiorésistance en médecine vétérinaire : enjeux de santé publique et de santé animale
Revue : Bulletin de l'académie vétérinaire de France, tome 158, n°2, p. 139-140.

134. Schorderet. M (1998)

Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques
Édition FRISON-ROCHE, p. 786.

135. Scippo. M.L, Maghuin-Rogister. G (2006)

Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse : méthodes biologiques de dépistage
Revue : annale de médecine vétérinaire, n°150, p. 125-130.

136. Sérieys. F (2004)

Antibiothérapie des infections mammaires quelle(s) voie(s) de traitement ?
Revue : Bulletin des GVT, n°24, Mars-Avril, 2004, p. 42-45.

137. Shalini. J (2002)

HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples
Revue: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, n° 28, p. 795–809.

138. Siousarran. V (2003)

Hygiène du lait cru en zone urbaine et périurbaine de Niamey, Niger
Rapport de stage, p. 42-43.

139. Sraïri M.T, Hasni. I, alaoui. A, Hamama, Faye. B (2004)

Qualité physico-chimique et contamination par les antibiotiques du lait de mélange en étables intensives au Maroc
Revue : Renc. Rech. Ruminants, n°11, p. 116-117.

140. Tainturier. D (1981)

Instructions pour la détection des antibiotiques et des sulfamides dans les laits livrés par les producteurs,
Document du Centre National De Coordination Des Études Et Recherches Sur La Nutrition Et L'alimentation (C.N.E.R.N.A), p. 2-7.

141. Tarbin. J. A, Farrington. W. H, Shearer. G (1995)

Determination of penicillins in animal tissues at trace residue concentrations Part I.
Determination of benzylpenicillin in milk by reversed-phase liquid chromatography
with solid phase extraction and liquid Chromatographic fractionation clean-up

Revue : Analytica Chimica Acta, Volume 318, p. 95-101.

142. Thomas .S.H, Panes. J.J (1955)

The effect of penicillin in milk used for the manufacture of Cheshire cheese

Revue: J. Soc. of Dairy Techn, p. 8-97.

143. Upton. A et al (2006)

Les produits antimicrobiens à domicile : Le problème de l'antibiorésistance

Revue : Paediatrics & Child Health, n°11(3), P. 177-182.

144. Verhnes. R, Vandaele. E (2002)

Détection rapide des inhibiteurs dans le lait

Revue : le point vétérinaire, n° 227, Juillet-Août 2002, p. 16-17.

145. Weisen. J.P (1974)

La prophylaxie des mammites

Édition Vigot frères, p. 16-19.

146. Yala. D, Merad. A. S, Mohamedi. D, Ouar Korich .M. N (2001)

Classification et mode d'action des antibiotiques

Revue : médecine du Maghreb 2001, n°91.

147. Zinedine. A, Faid. M, Benlemlih. M, (2007)

Détection des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers par méthode
microbiologique

Revue : REMISE, volume 1, n°1, p. 1-9.

ANNEXES

Annexe n° 1 : résultats des trois séries de répétabilité pour la pénicilline

Série 1		Série 2		Série 3	
Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces
06/01/2008 A	9400244	06/01/2008 A	9405821	06/01/2008 A	9657296
A	9514344	A	9724431	A	9627963
A	9497679	A	9678907	A	9516453
A	9513976	A	9340497	A	9448817
A	9758428	A	9442747	A	9473614

Annexe n° 2 : résultats des trois séries de reproductibilité pour la pénicilline

Série A		Série B		Série C	
Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces
04/02/2008 A	984525	06/02/2008 A	956638	07/02/2008 B	983015
A	1033033	A	1049781	B	1030863
A	1014770	A	987006	B	1037114
A	1016407	A	1002600	B	1013151
A	1001614	B	928637	B	1006272
A	1007086	B	1042416	B	1023803
A	965113	B	1020287	B	1046437
A	964950	B	1029378	B	1046448
A	879450	B	1009493	09/02/2008 A	1001246
A	1041558	B	1020110	A	1012251
A	942052	B	1002513	A	1024630
05/02/2008 B	1076027	B	983055	A	1006130
B	1046284	B	1019639	A	993829
B	1055581	B	995135	A	1031623
B	1107023	07/02/2008 A	1081889	A	1041948
B	1053201	A	1058643	A	1073638
B	1084867	A	1081640	A	1053080
B	1081738	A	1071857	A	1024005
B	1080007	A	1054815	A	1020222
B	1072992	A	1173975	A	1030879

Annexe n° 3 : résultats des trois séries de répétabilité pour le chloramphénicol

Série 1		Série 2		Série 3	
Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces
24/02/2008 A	3834091	24/02/2008 A	3729633	24/02/2008 A	3644111
A	3841958	A	3810881	A	4087004
A	3738066	A	3921515	A	3955990
A	3772836	A	3916939	A	3880851
A	4001845	A	3778711	A	3721979

Annexe n° 4 : résultats des trois séries de reproductibilité pour de chloramphénicol

Série A		Série B		Série C	
Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces	Date et opérateur	Surfaces
26/02/2008 A	4026974	27/02/2008 A	3939934	27/02/2008 B	3705999
A	3872153	A	3660124	B	4015706
A	3695291	A	3825903	B	3788652
A	3732060	A	3906705	B	3691022
A	4000178	A	3853354	B	3788693
A	4063281	A	3876263	B	3920016
A	3874034	A	3914050	B	3815632
A	3825476	A	3922083	B	3910021
A	3855358	A	3964475	B	3819281
A	4064816	A	3858960	B	3971254
01/03/2008 B	4018143	A	3970540	B	3974839
B	3812448	A	3919891	02/03/2008 A	3880851
B	3967536	A	3776836	A	3864561
B	3870377	01/03/2008 B	3869022	A	4113251
B	3955990	B	3881446	A	3773975
B	3963246	B	3917047	A	3639795
B	3962042	B	4103918	A	3972326
B	4012674	B	4103918	A	4046774
B	3947642	B	3874527	A	3891475
B	4087004	B	4038275	A	4018399

Annexe n° 5 : formules utilisées pour les calculs statistiques

Calcul de la moyenne : $m = 1/n \sum mi.xi$

Écartype : $\sigma = \sqrt{\text{var}}$

Variance : $\text{var } \sigma^2 = 1/n \sum ni.xi-m^2$

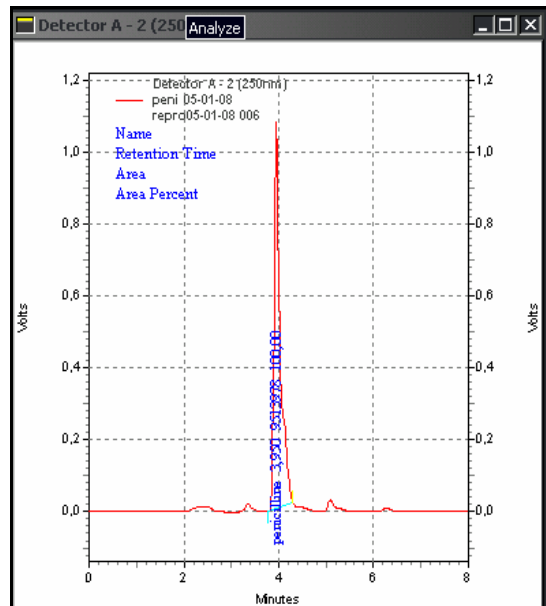
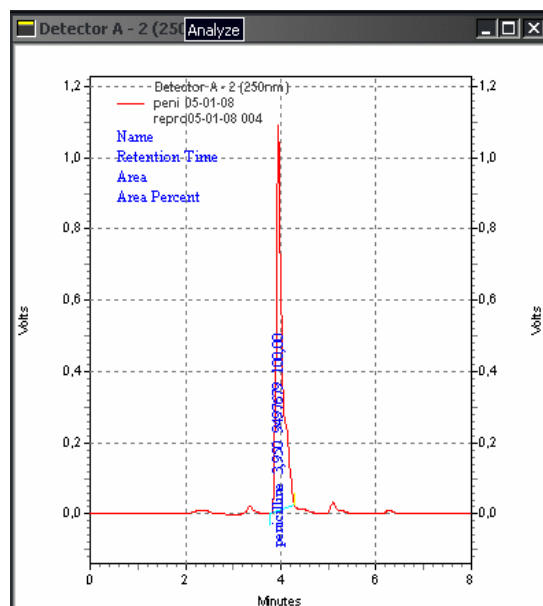
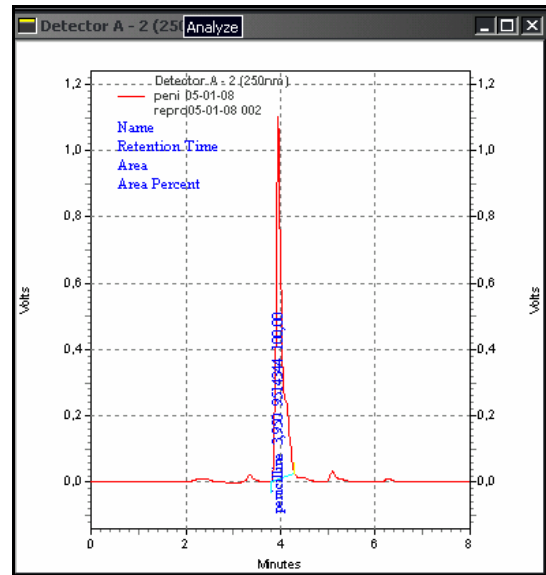
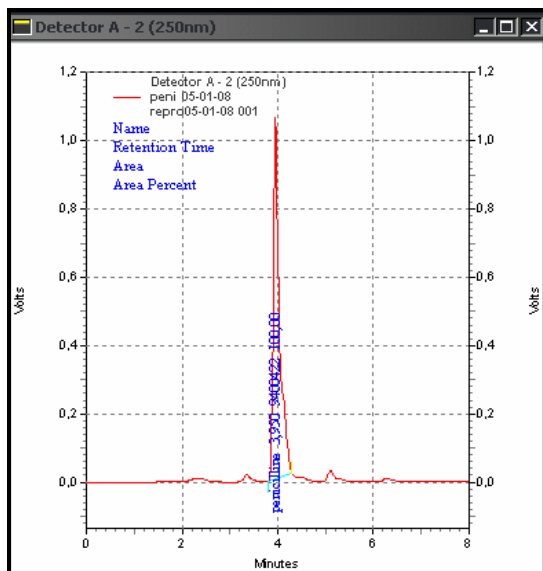
Variance entre a et b : $\sigma^2 = (Na - 1).\sigma^2a + (Nb - 1).\sigma^2b/Na + Nb - 2$

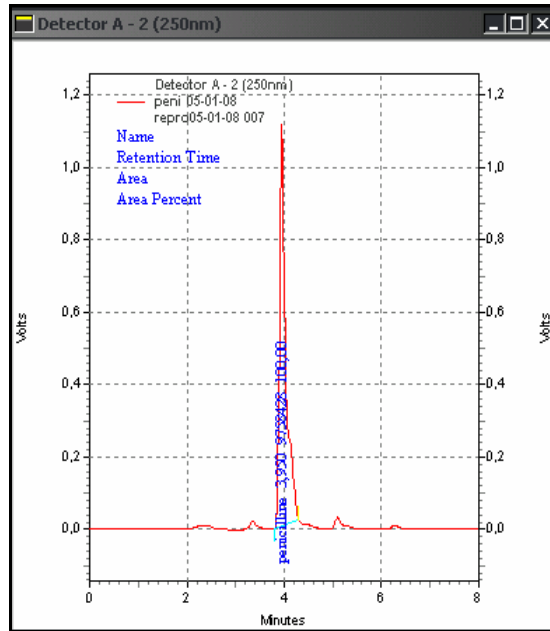
La droite de régression $\sigma_{x/y} = x-x' / y-y'$

Le coefficient de corrélation $r = \sigma_{x/y} / \sigma_x \cdot \sigma_y \quad -1 \leq r < +1$

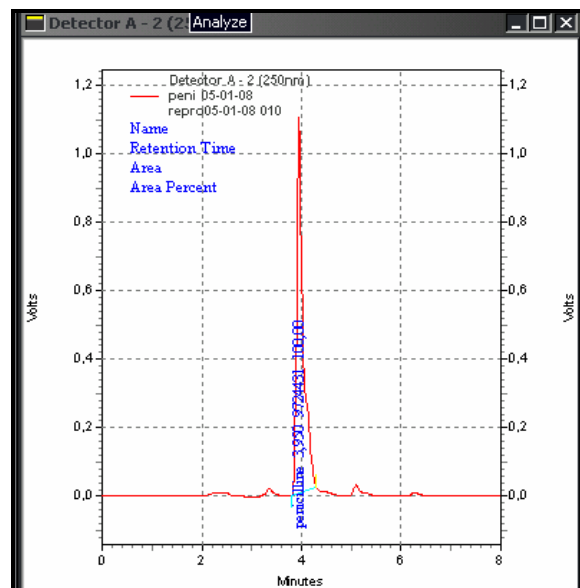
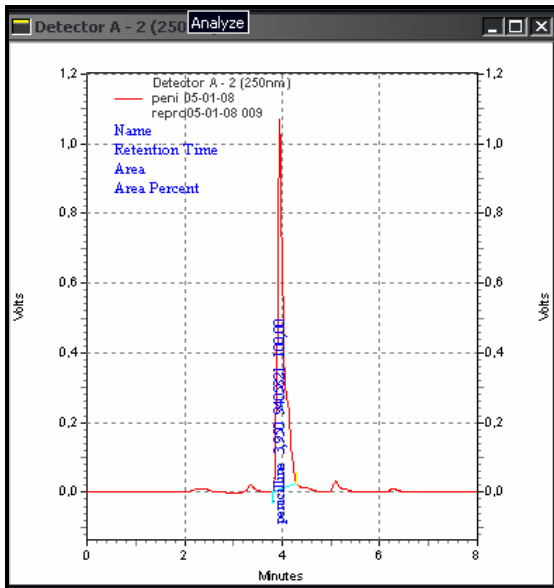
Annexe n° 6: chromatogrammes des trois séries de répétabilité de la pénicilline

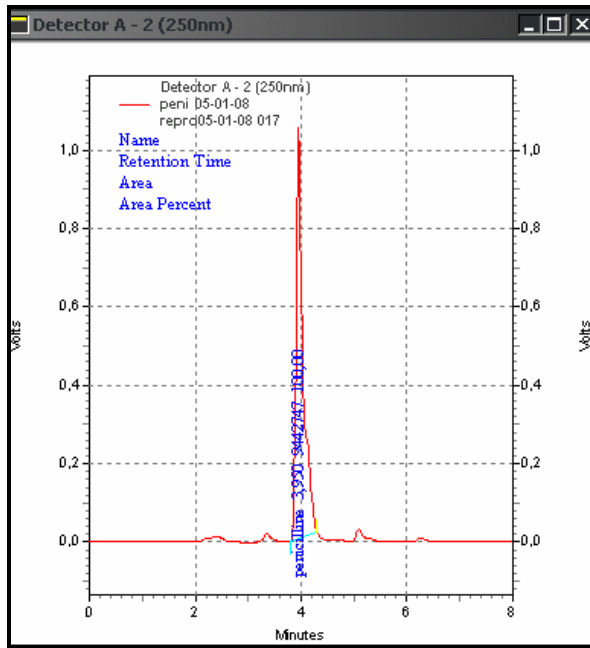
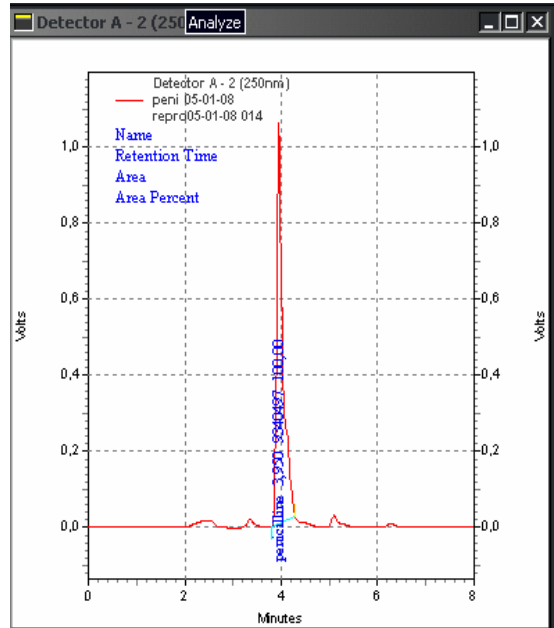
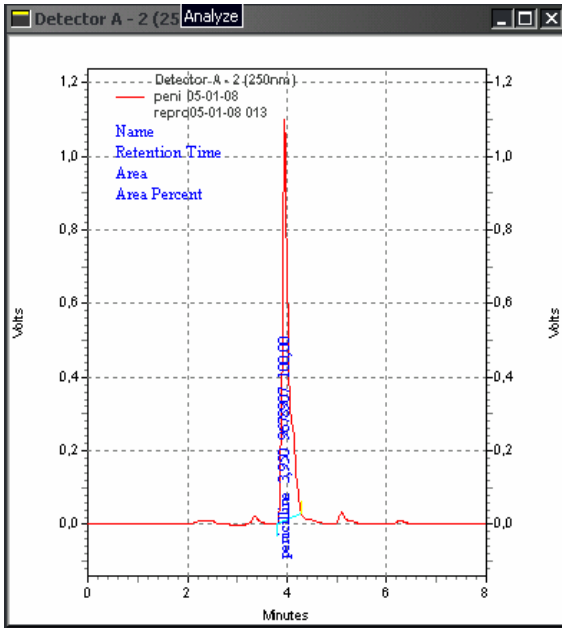
1^{ÈRE} SÉRIE DE RÉPÉTIBILITÉ POUR LA PÉNICILLINE



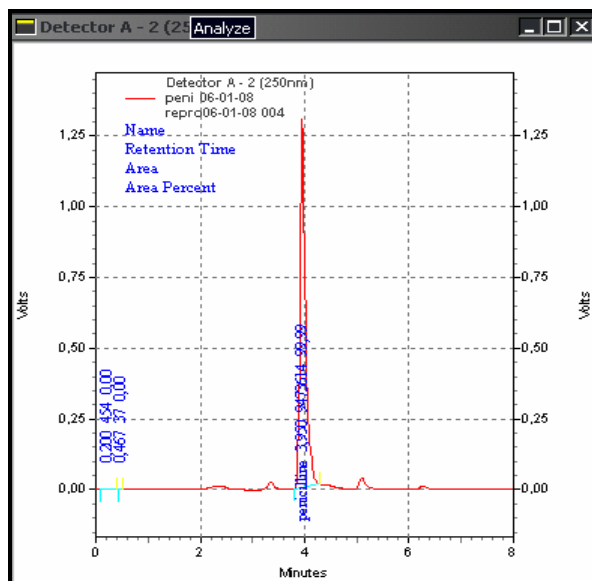
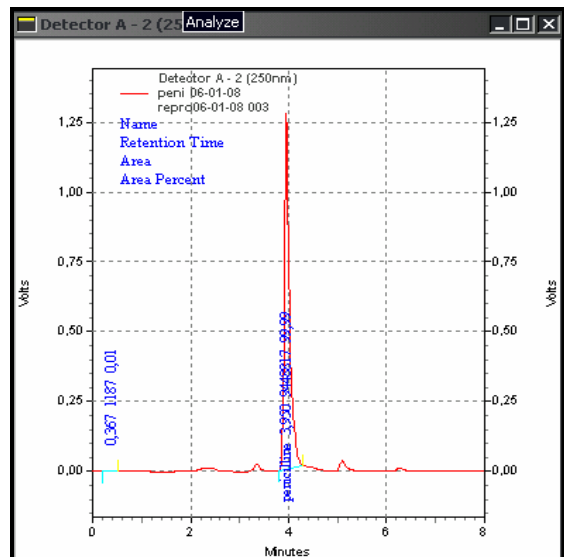
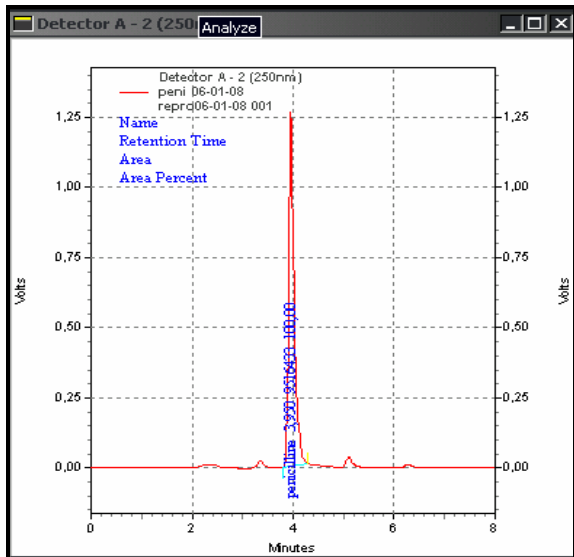
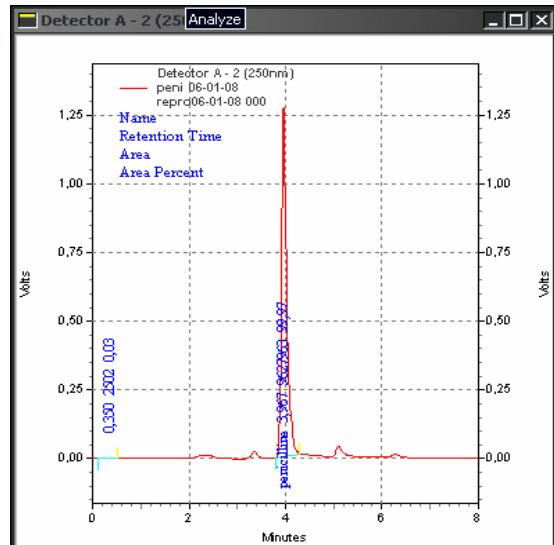
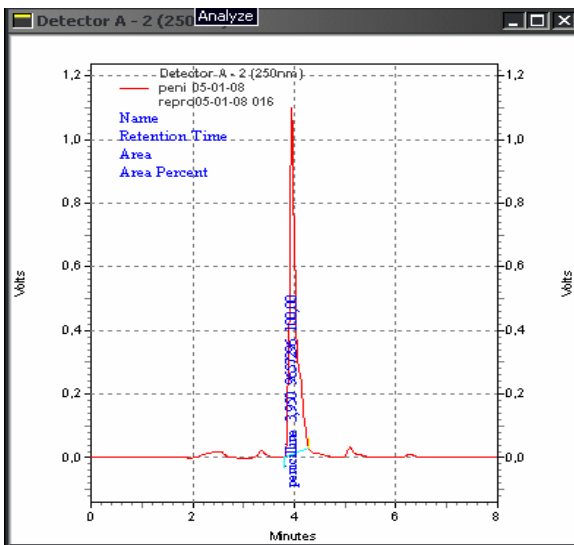


2^{ÈME} SÉRIE DE RÉPÉTABILITÉ POUR LA PÉNICILLINE



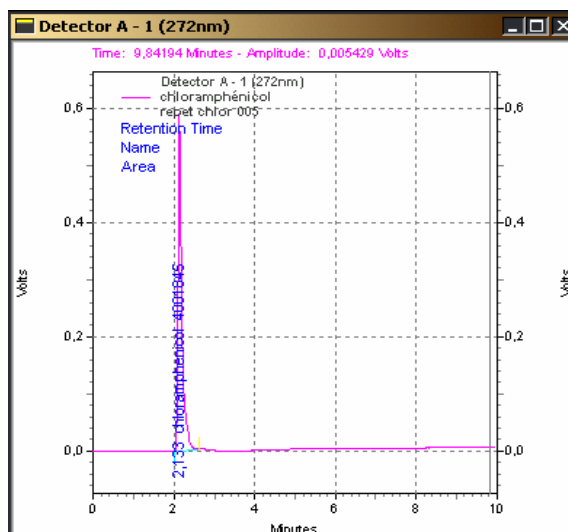
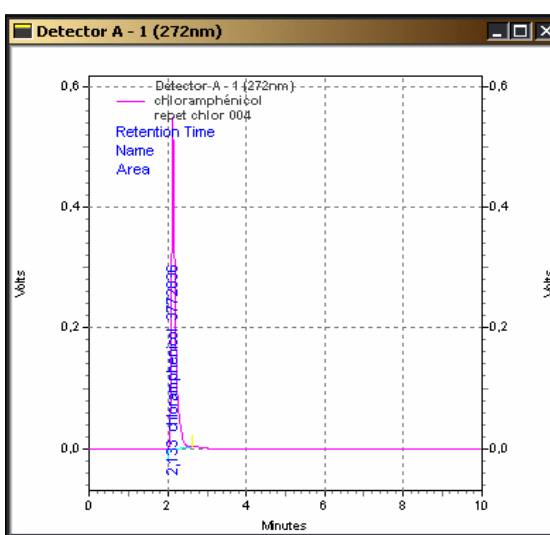
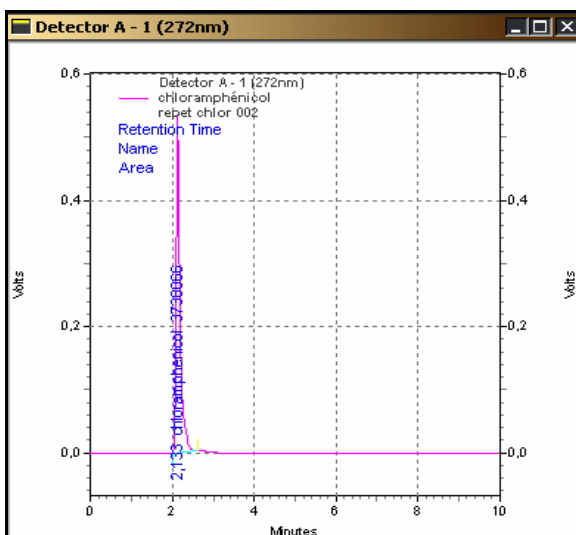
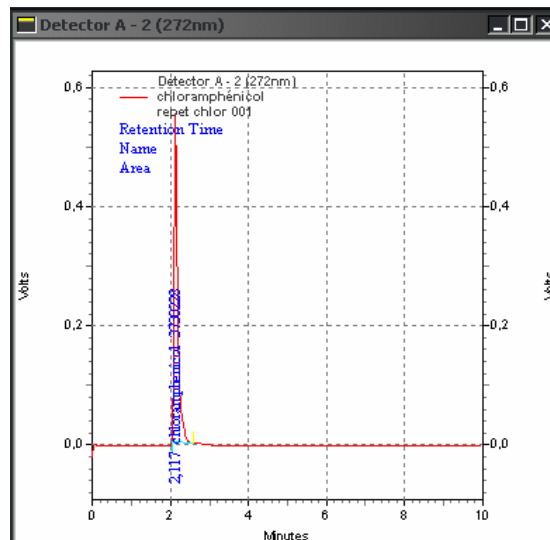
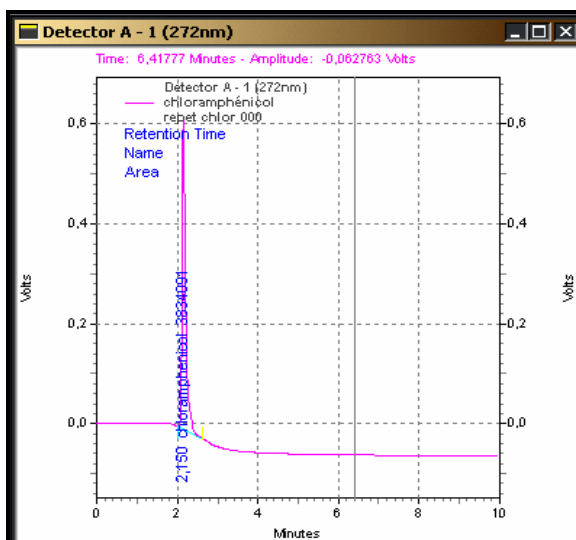


3^{ÈME} SÈRIE DE RÈPÈTABILITÈ POUR LA PÈNICILLINE

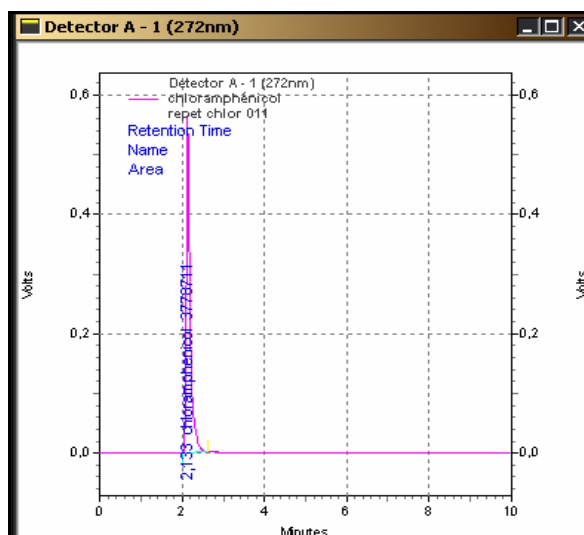
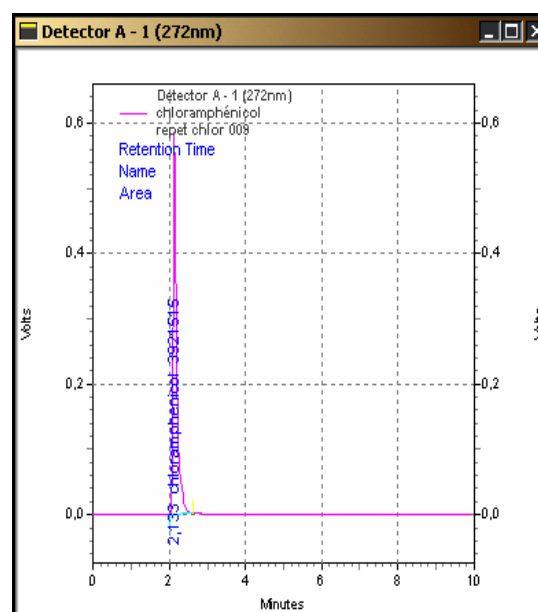
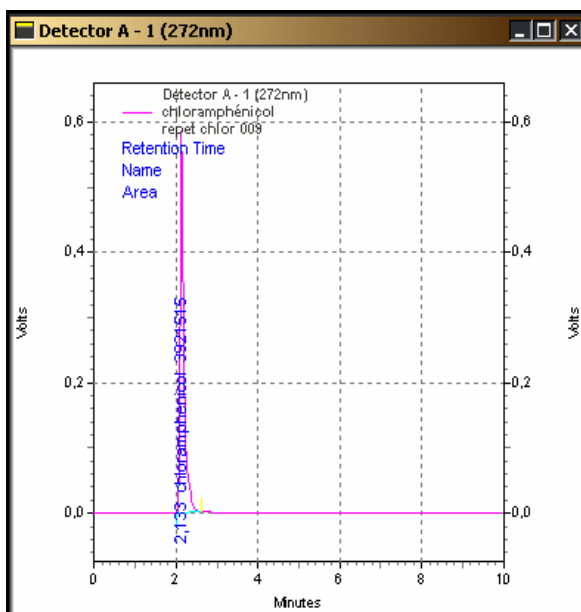
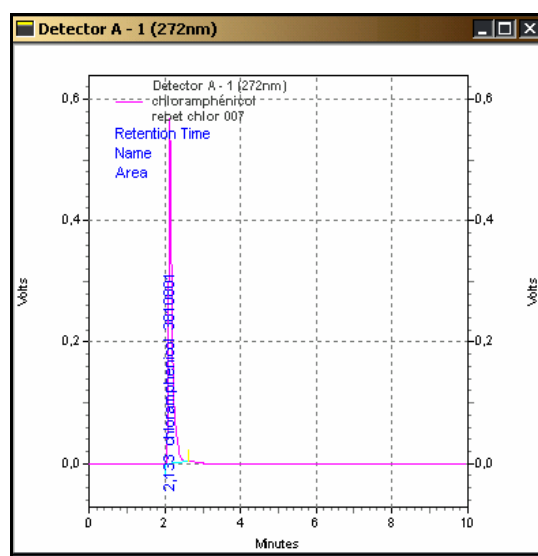
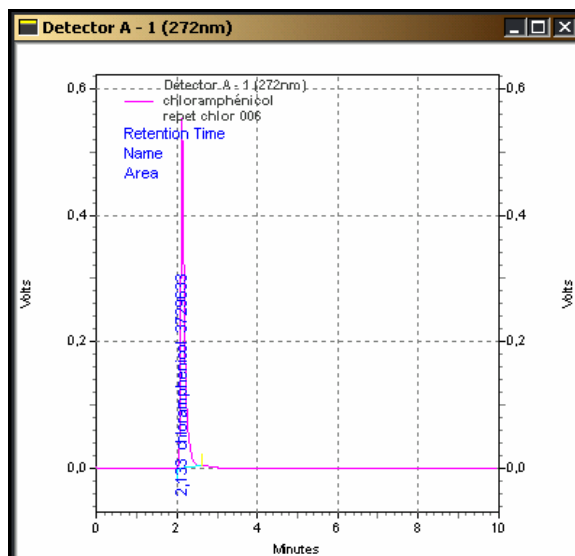


Annexe n° 7: chromatogrammes des trois séries de répétabilité du chloramphénicol

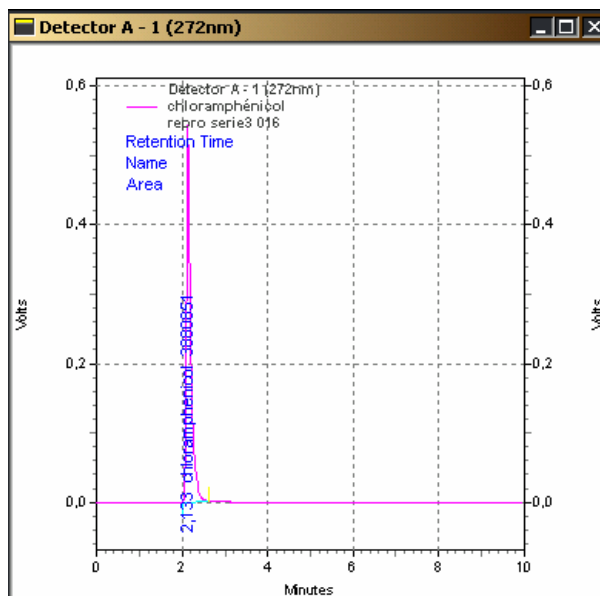
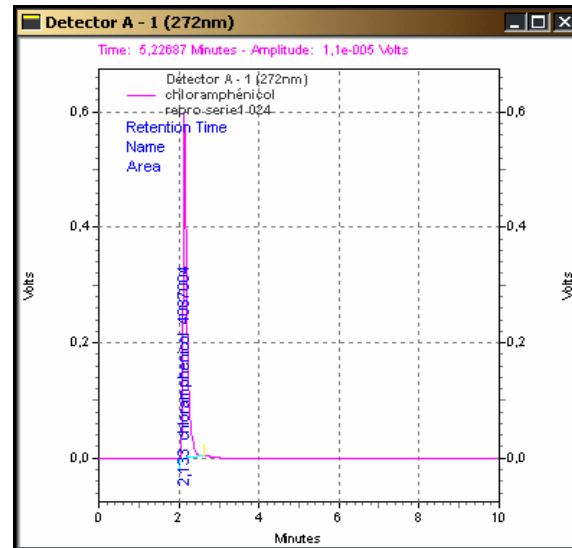
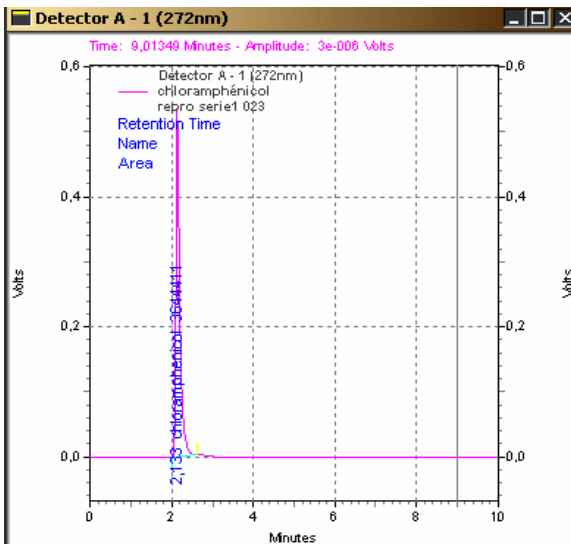
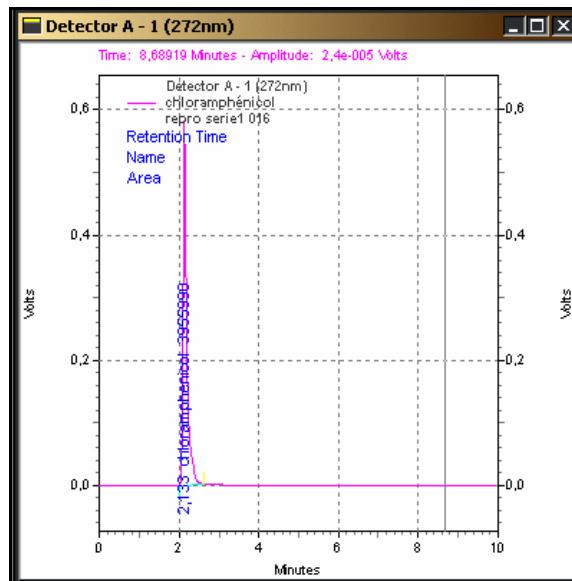
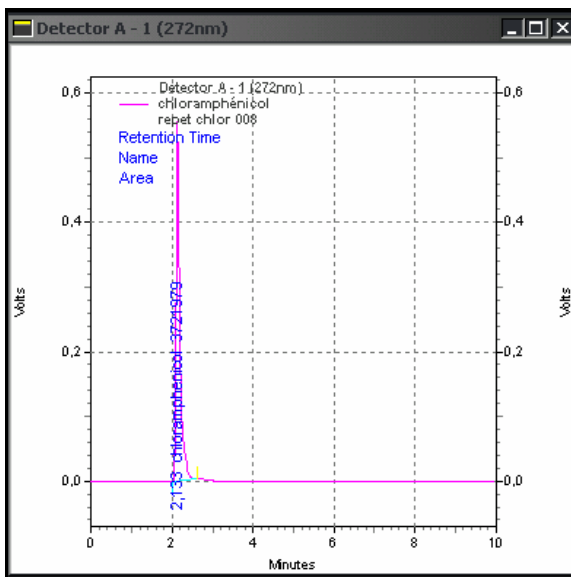
1^{ÈRE} SÉRIE DE RÉPÉTIBILITÉ POUR LE CHLORAMPHÉNICOL



2^{ÈME} SÉRIE DE RÉPÉTABILITÉ POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

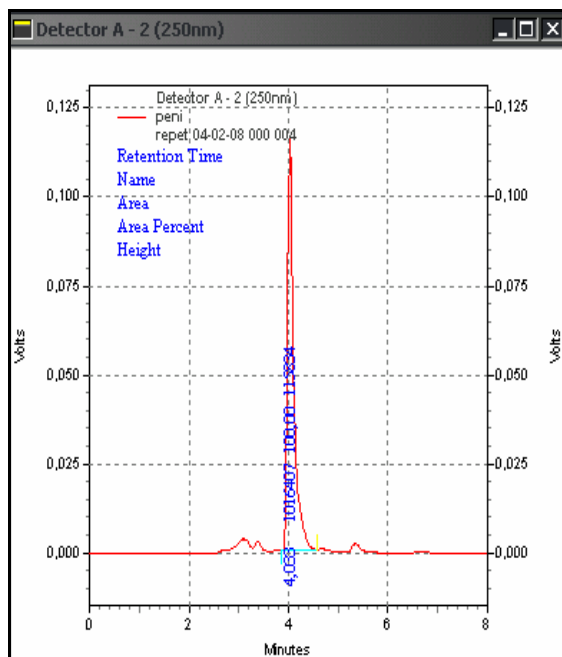
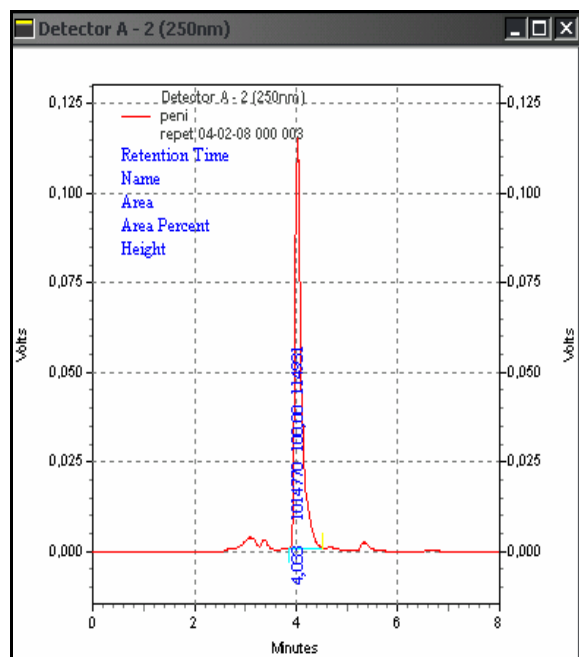
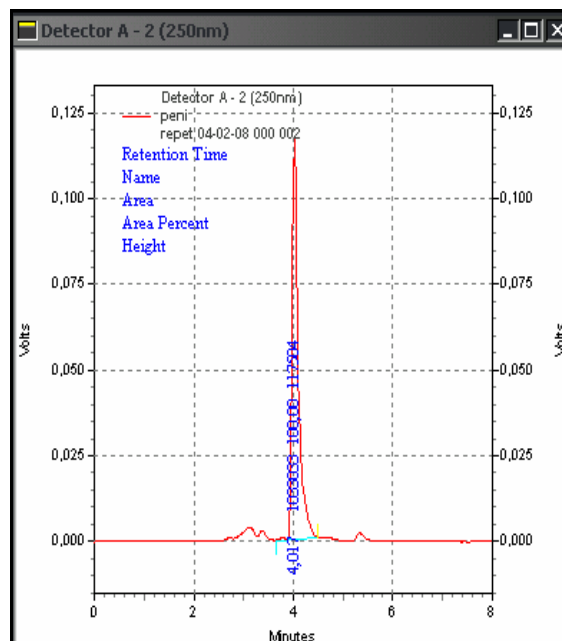
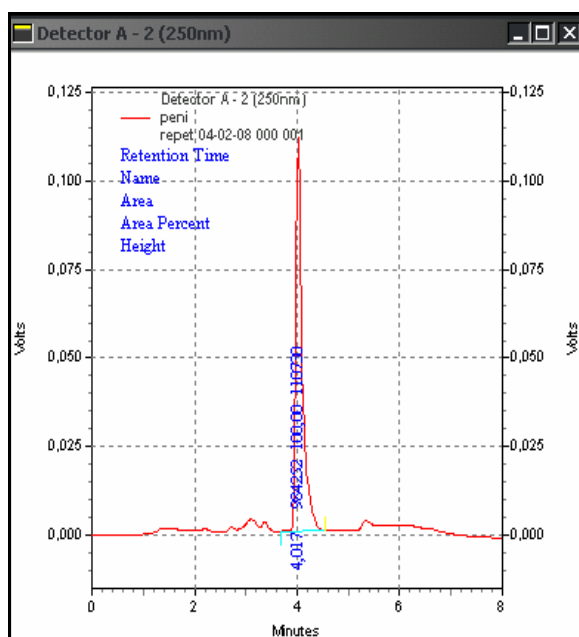


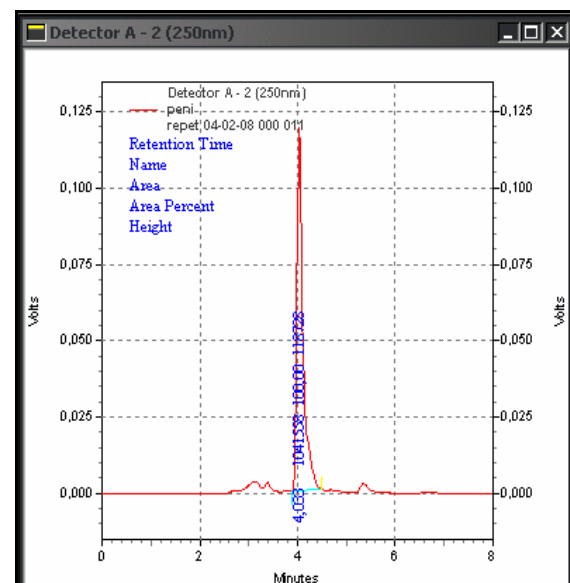
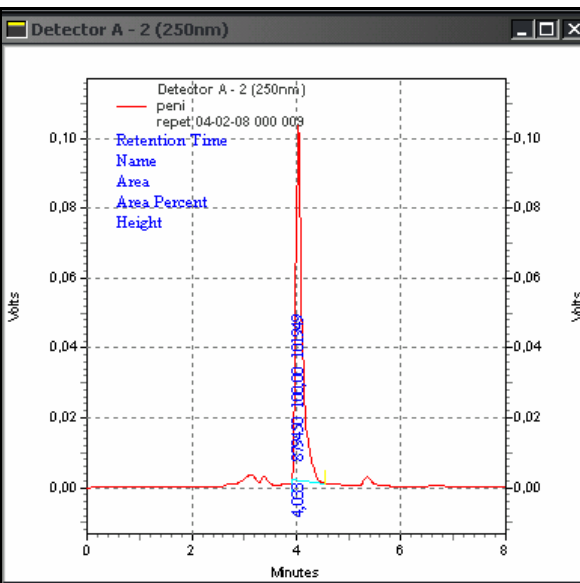
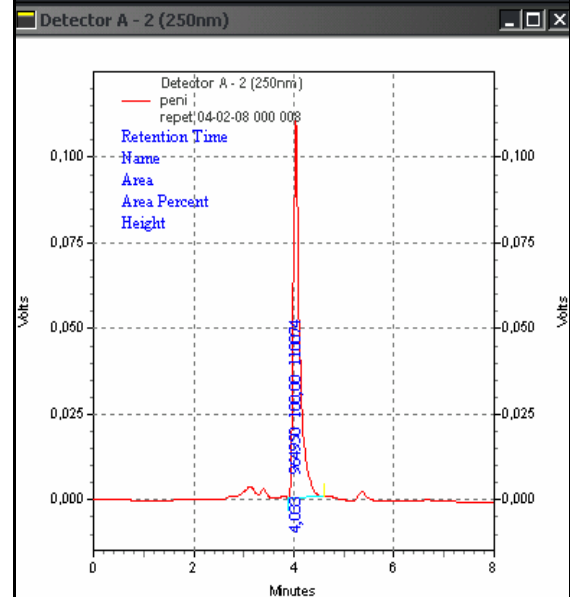
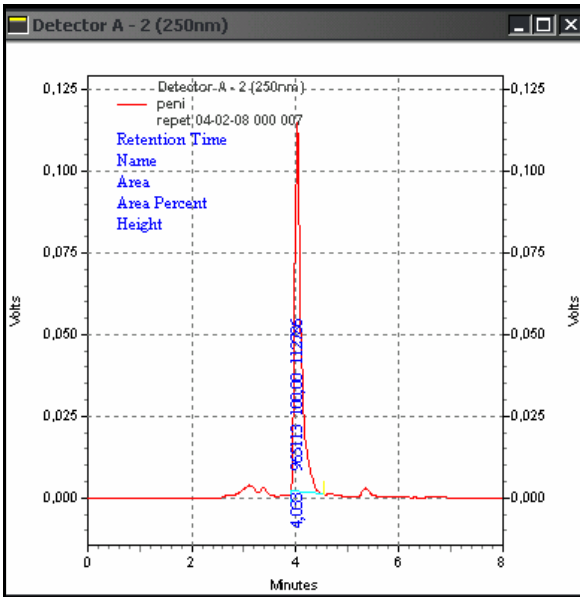
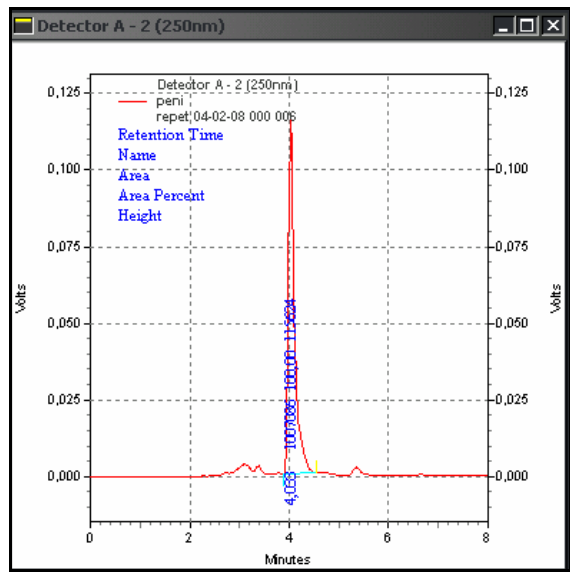
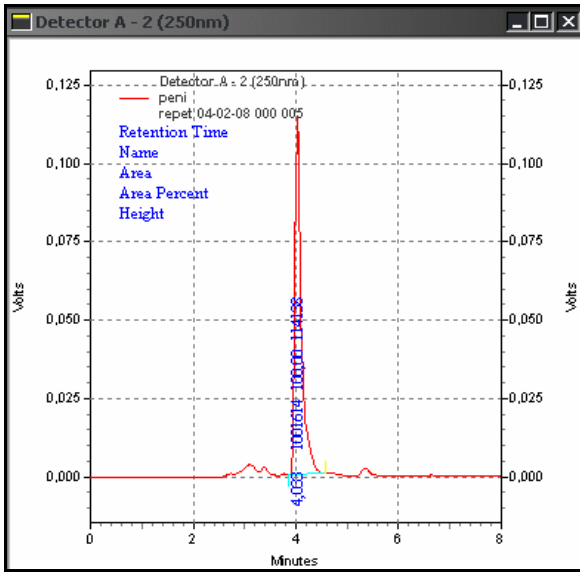
3^{ÈME} SÉRIE DE RÉPÉTABILITÉ POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

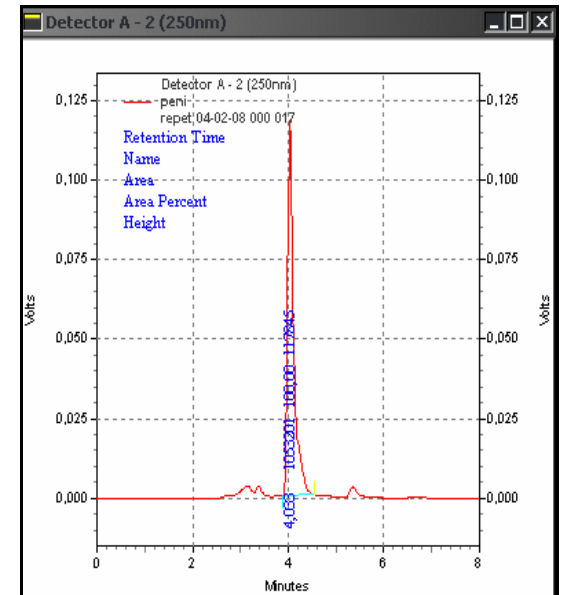
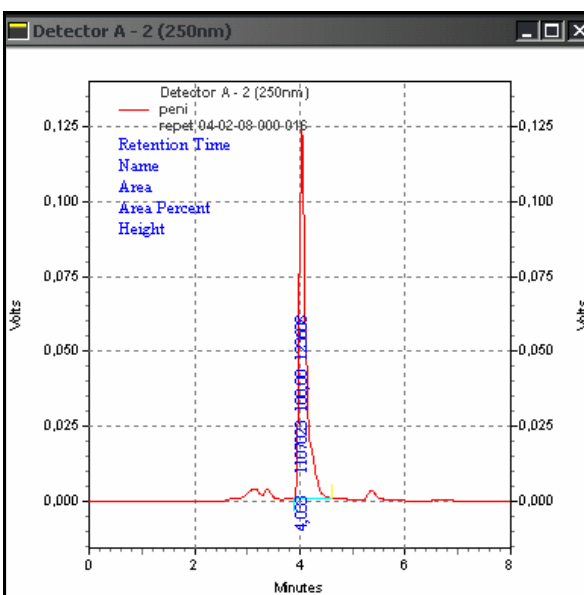
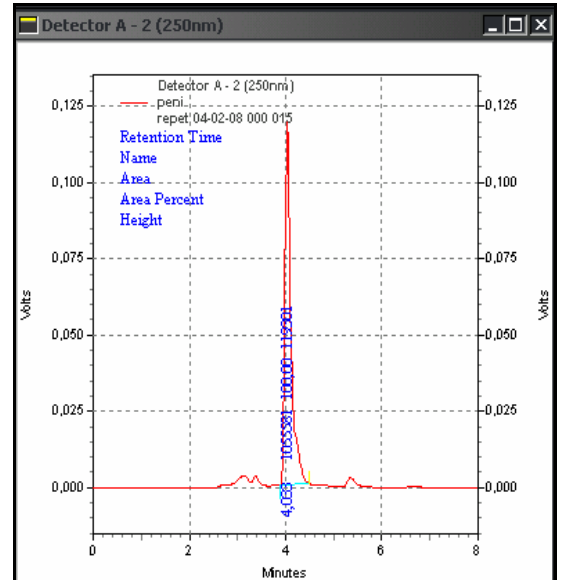
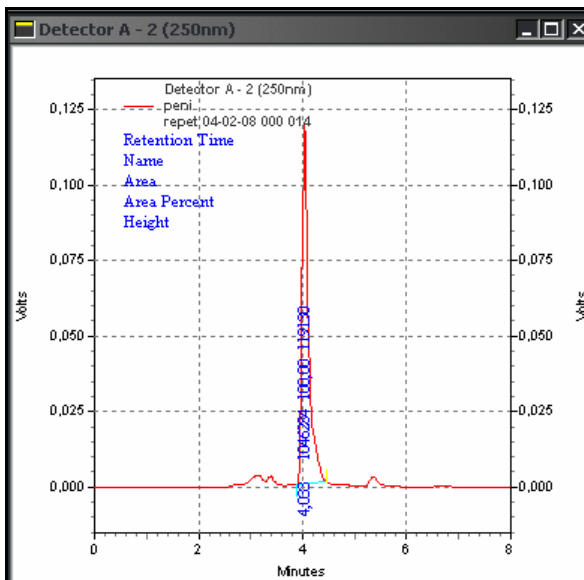
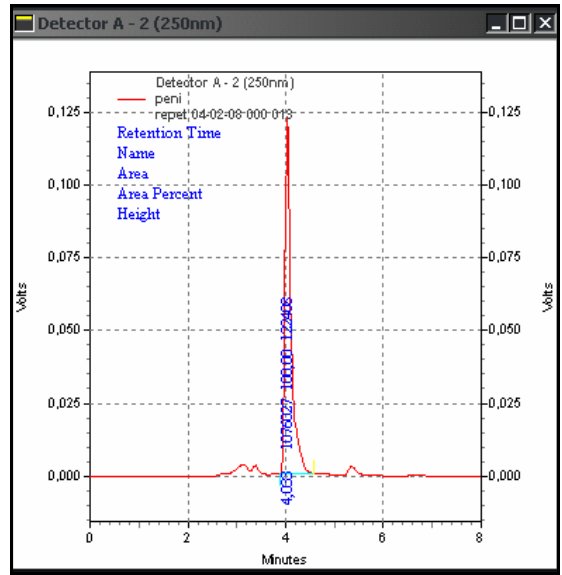
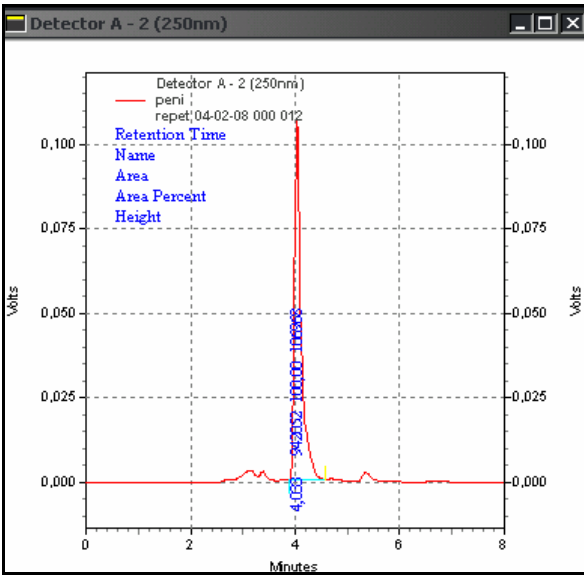


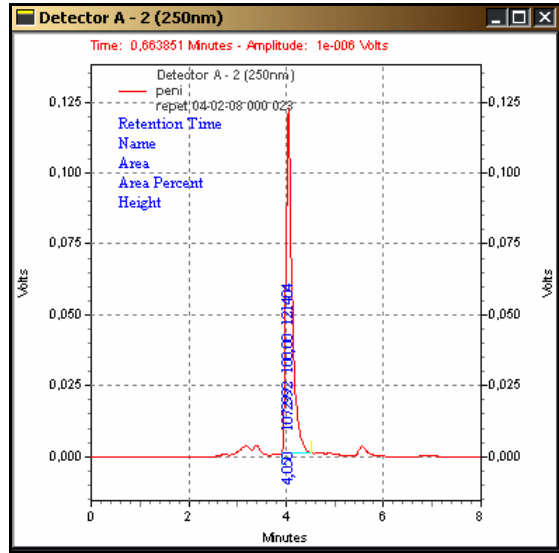
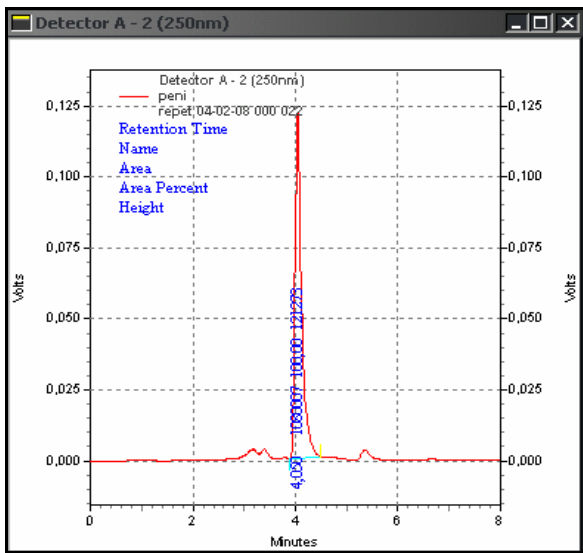
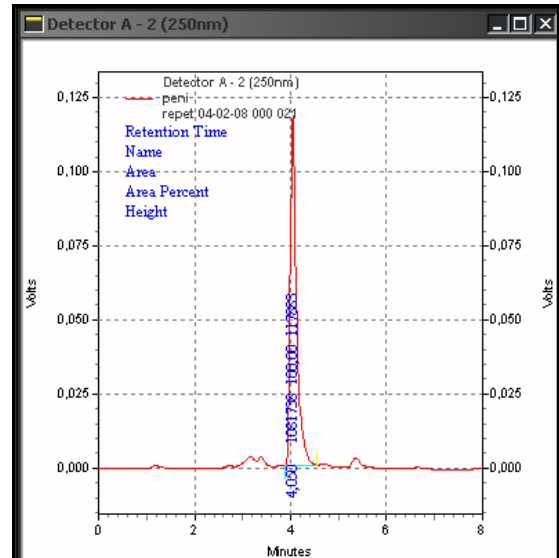
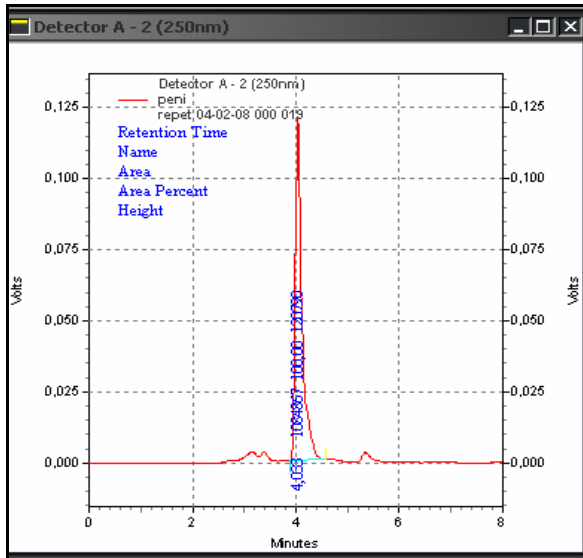
Annexe n° 8: chromatogrammes des trois séries de reproductibilité de la pénicilline

1^{ÈRE} SÉRIE DE REPRODUCTIBILITÉ POUR LA PÉNICILLINE

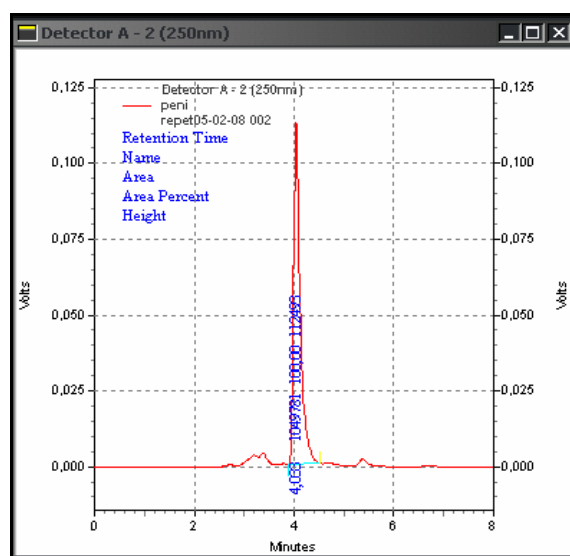
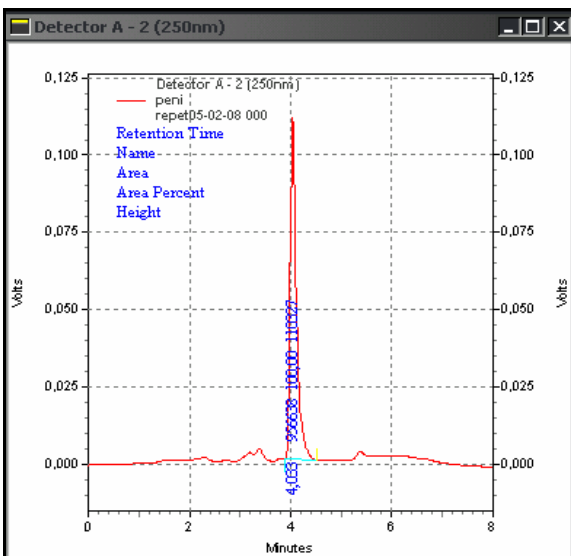


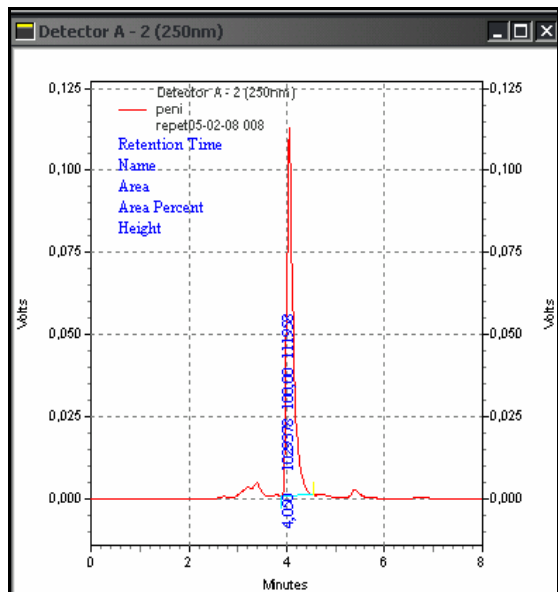
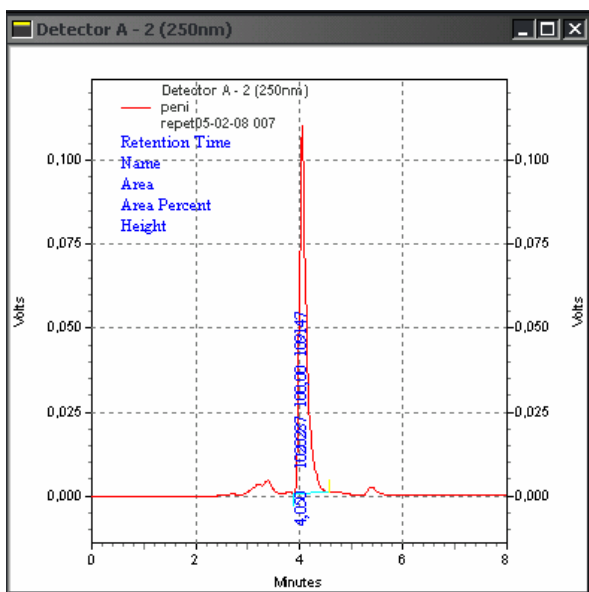
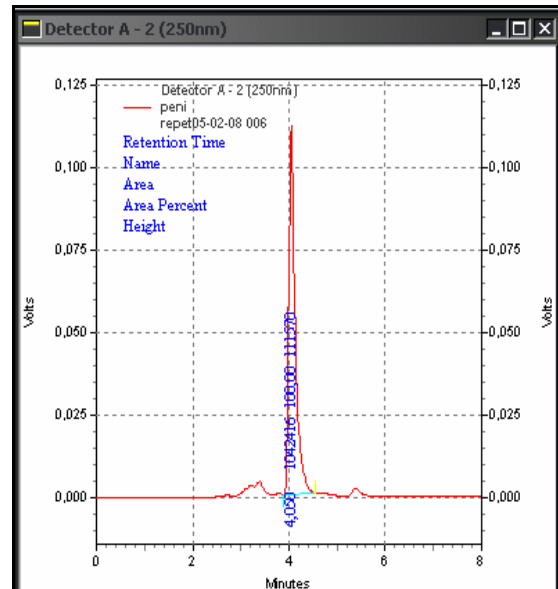
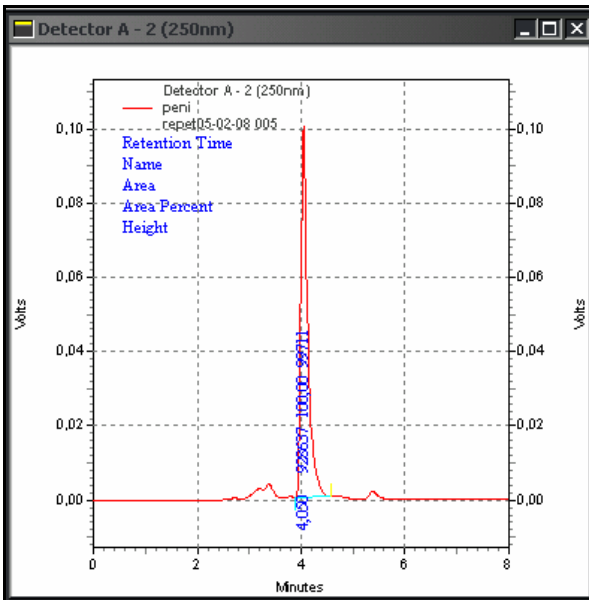
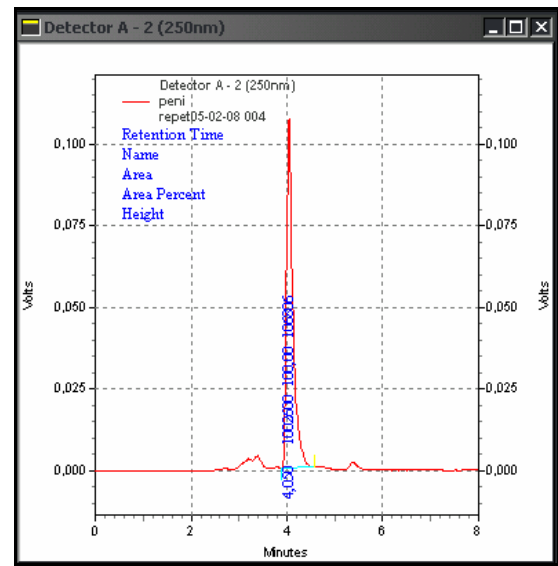
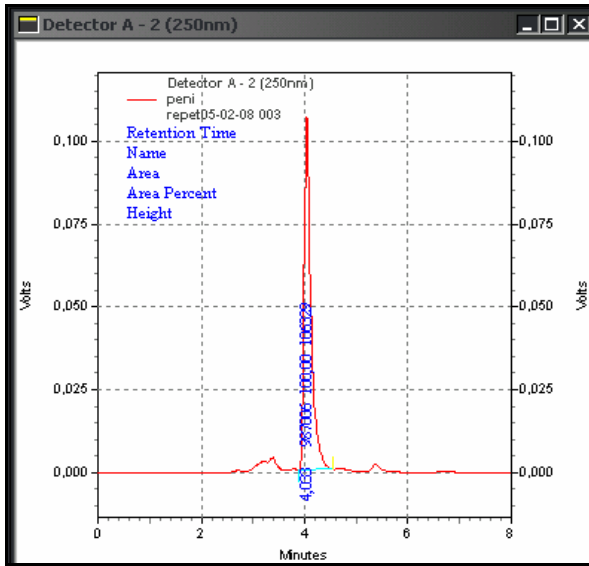


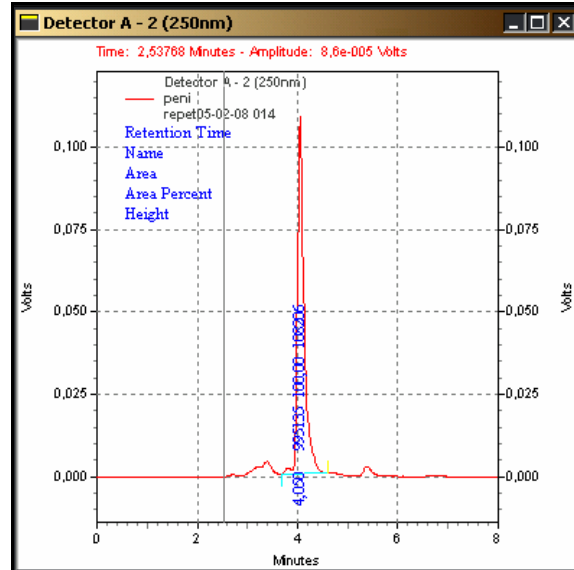
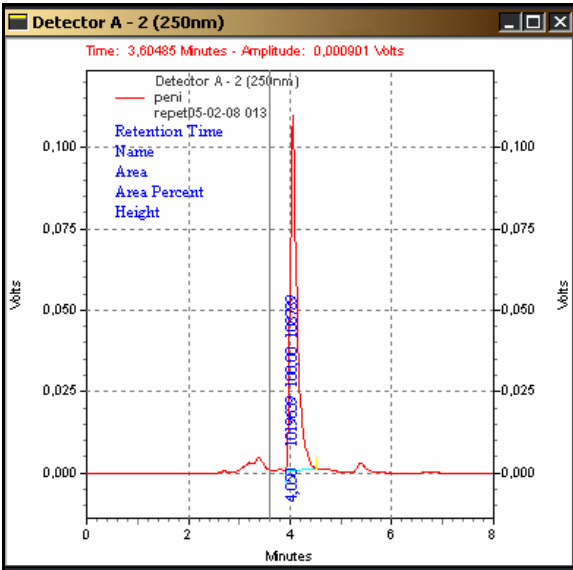
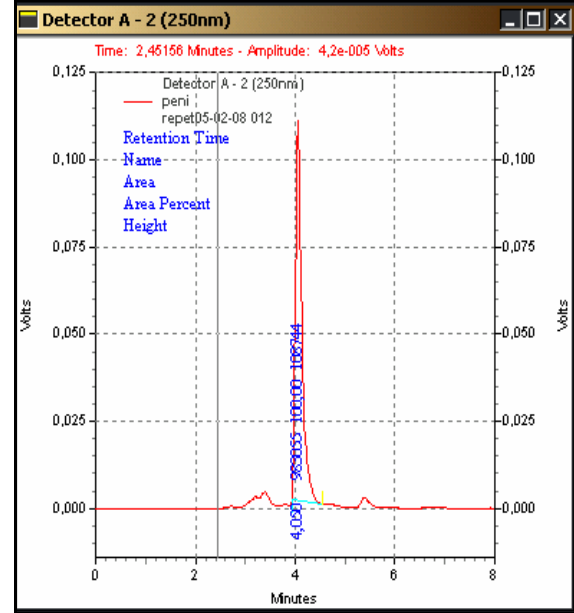
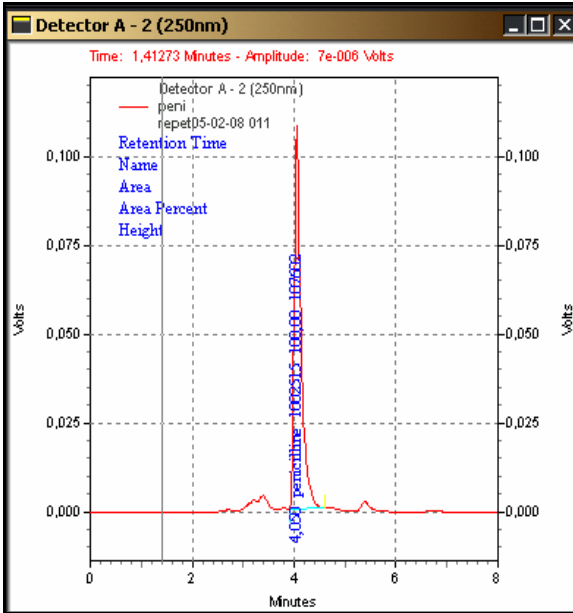
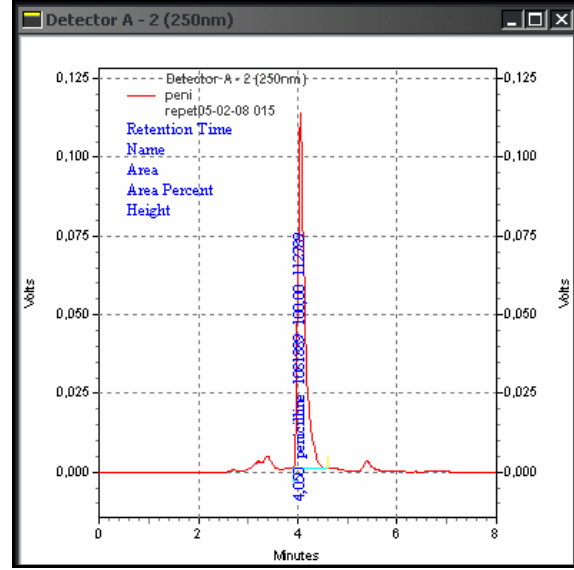
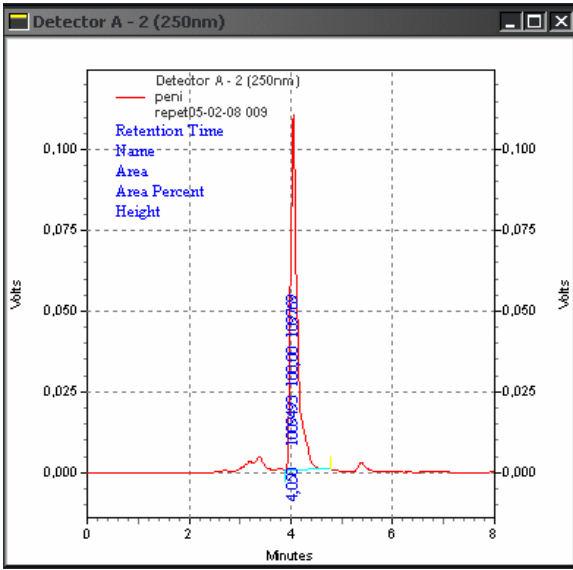


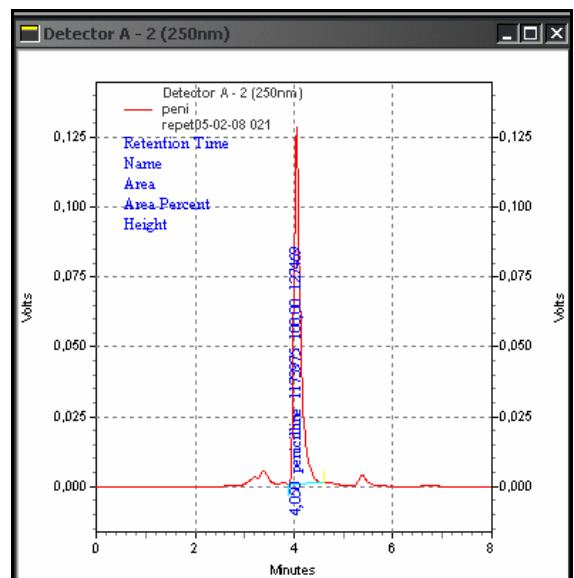
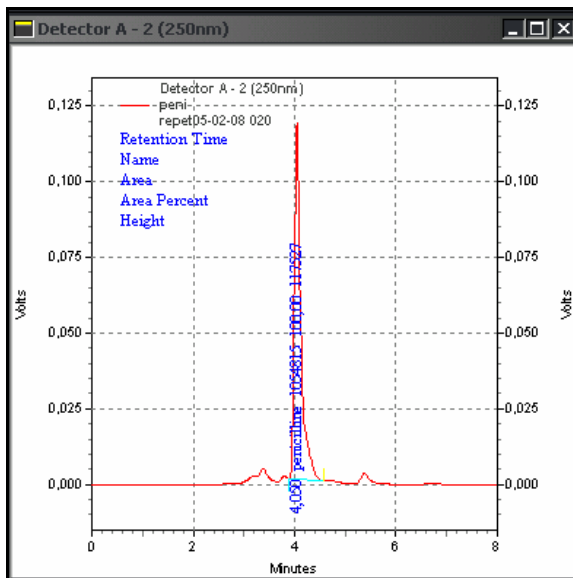
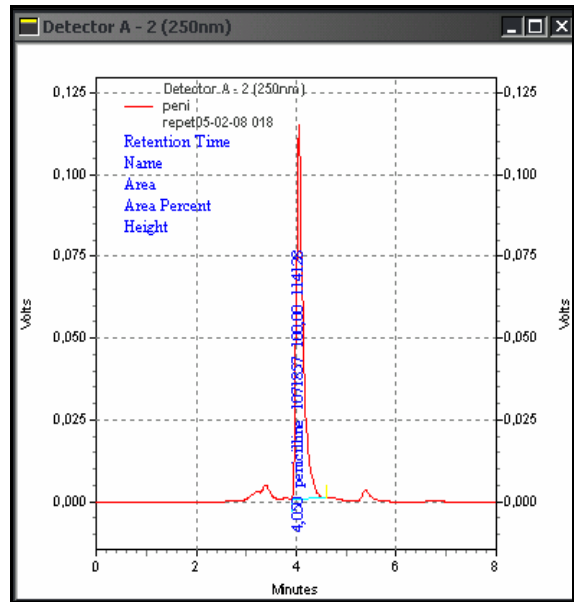
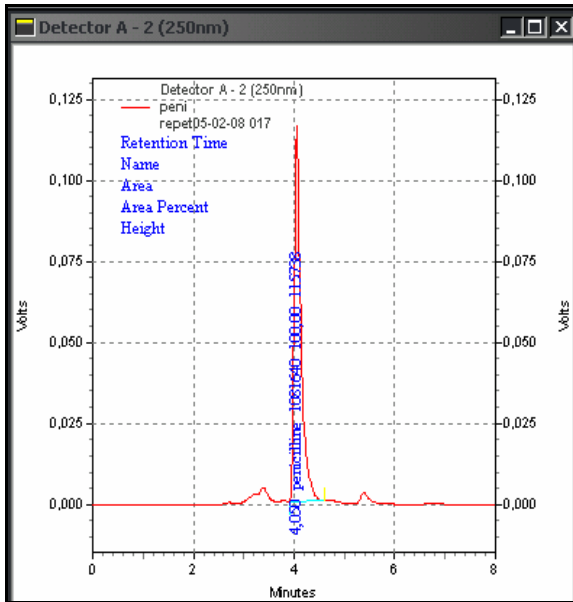
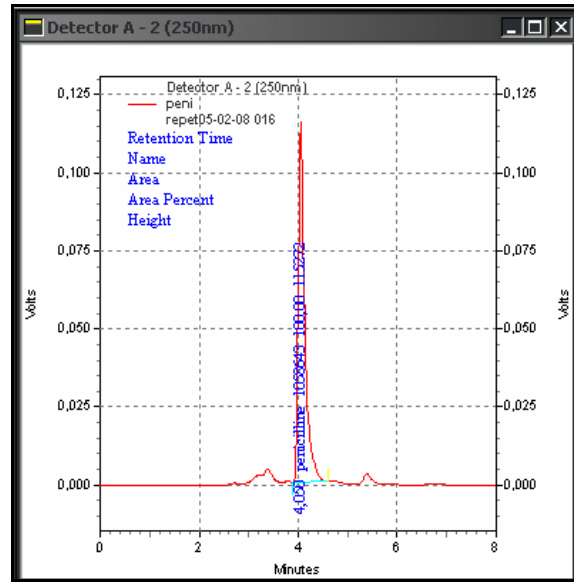
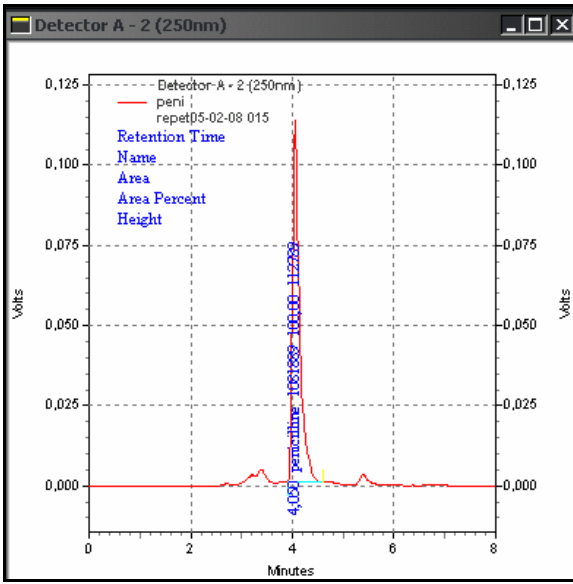


2^{ÈME} SÈRIE DE REPRODUCTIBILITÈ POUR LA PÈNICILLINE

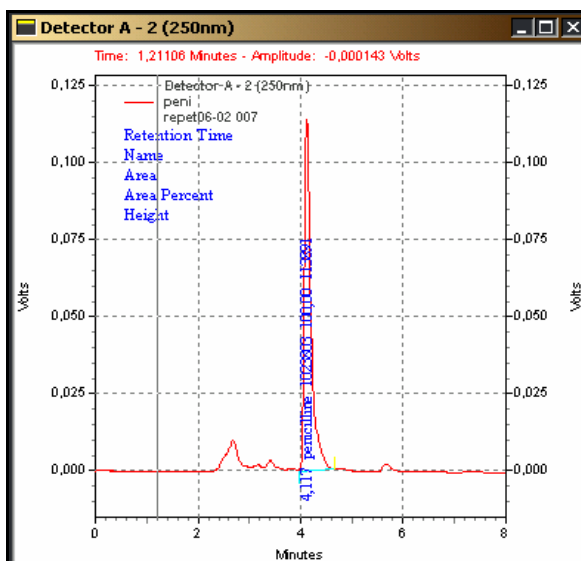
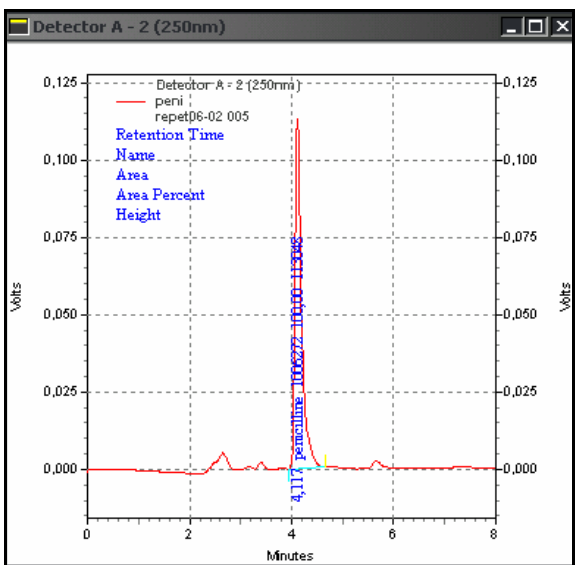
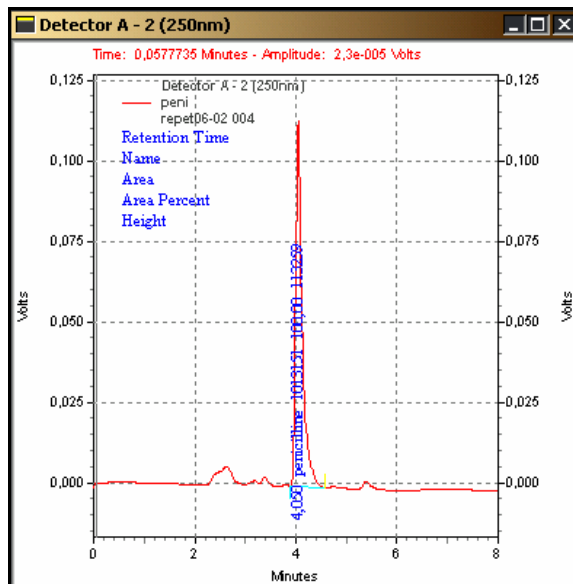
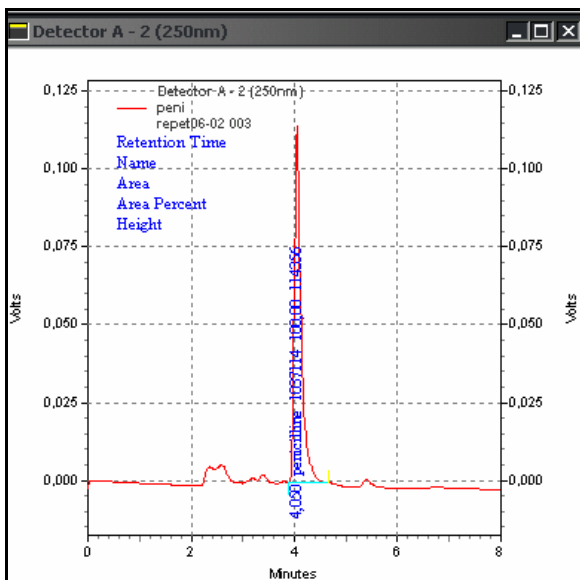
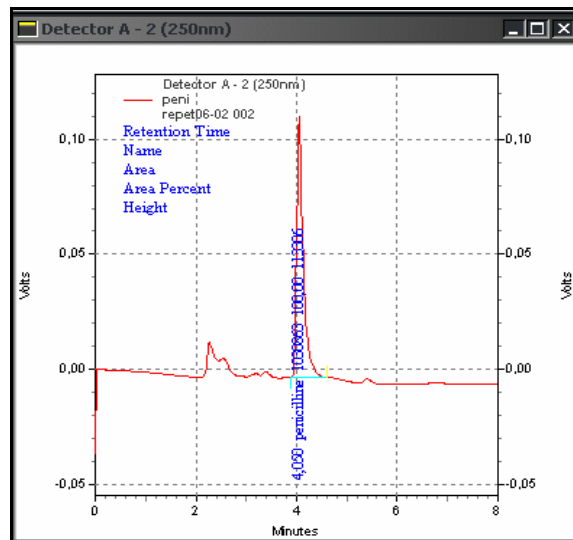
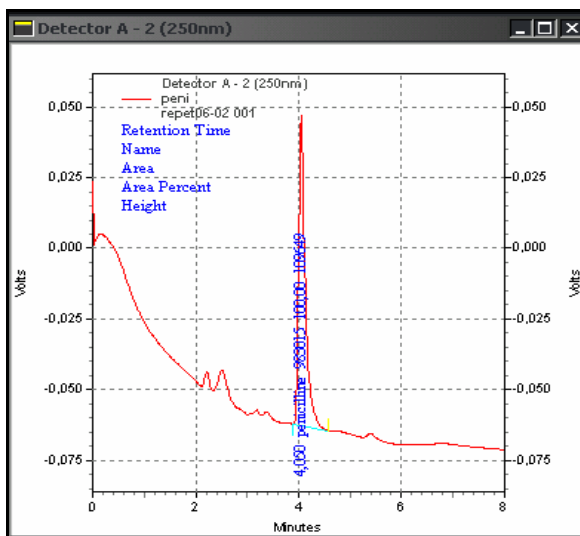


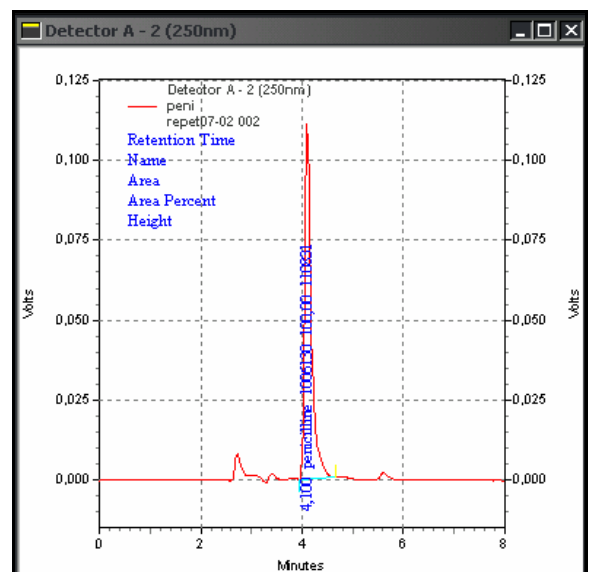
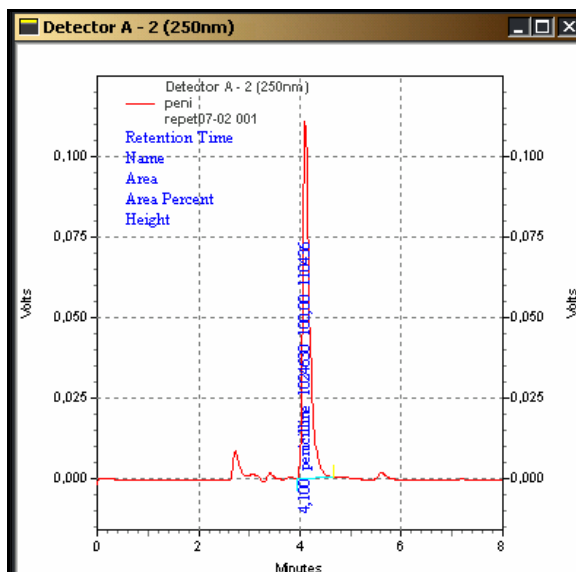
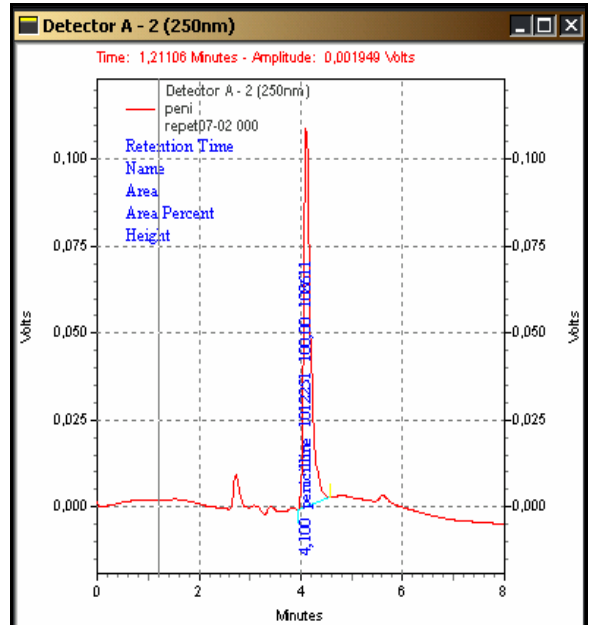
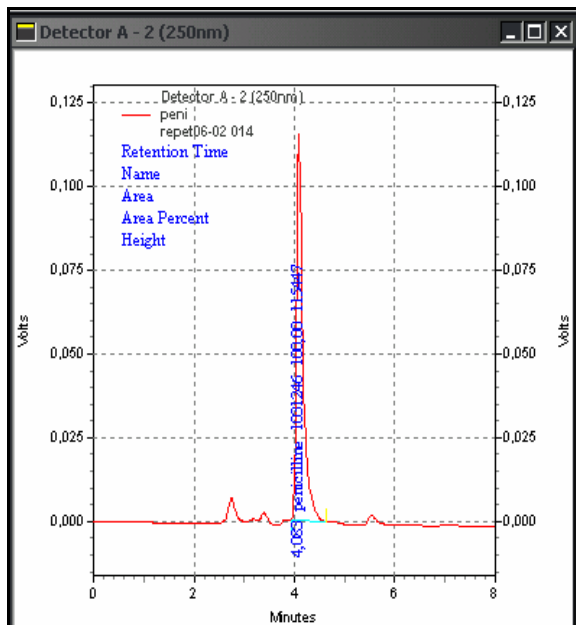
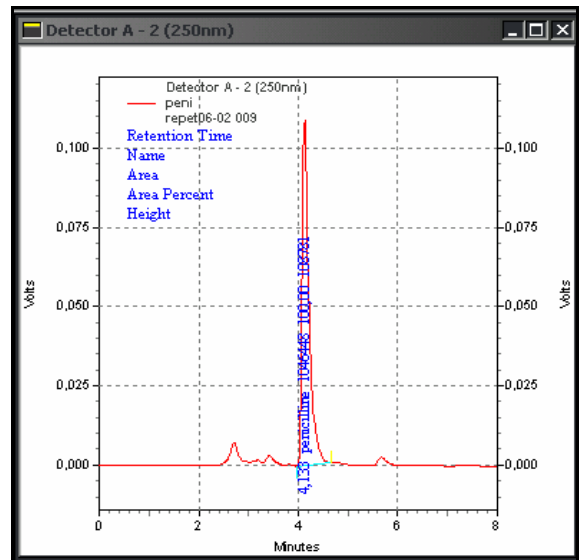
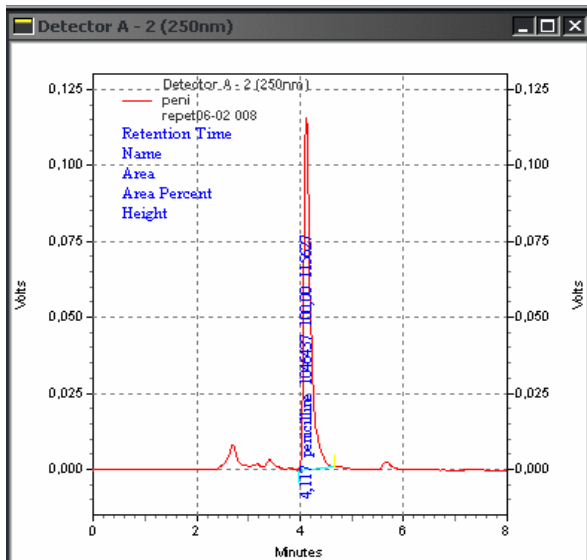


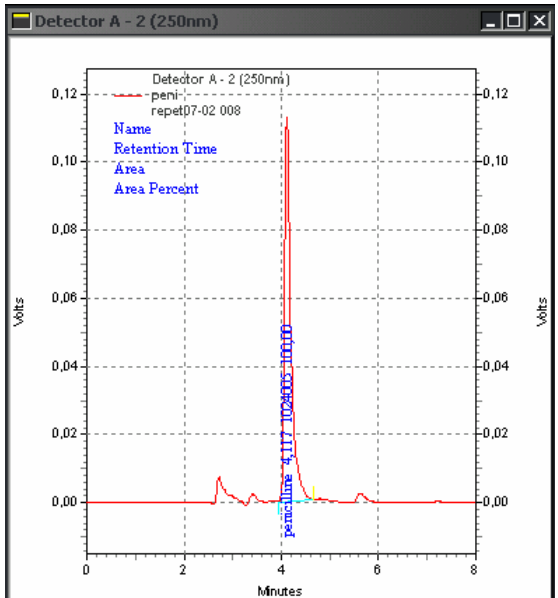
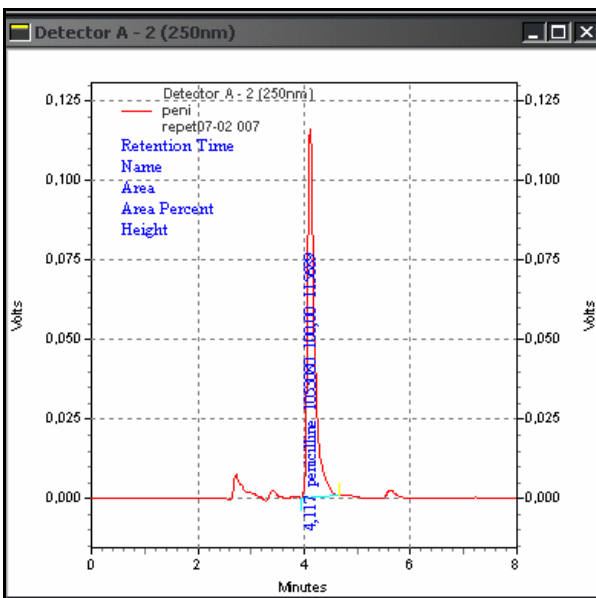
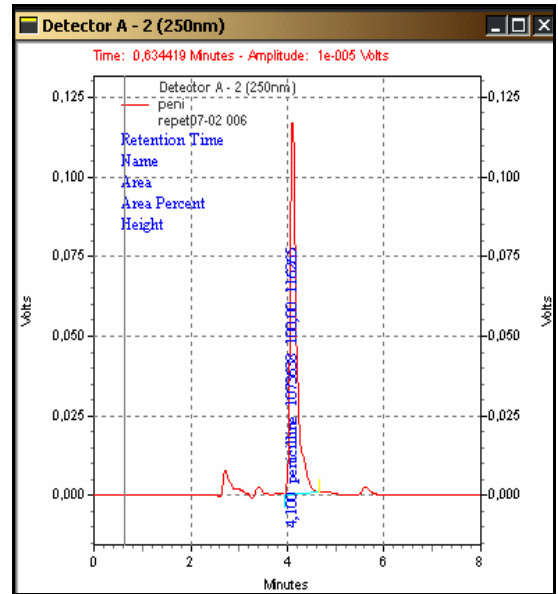
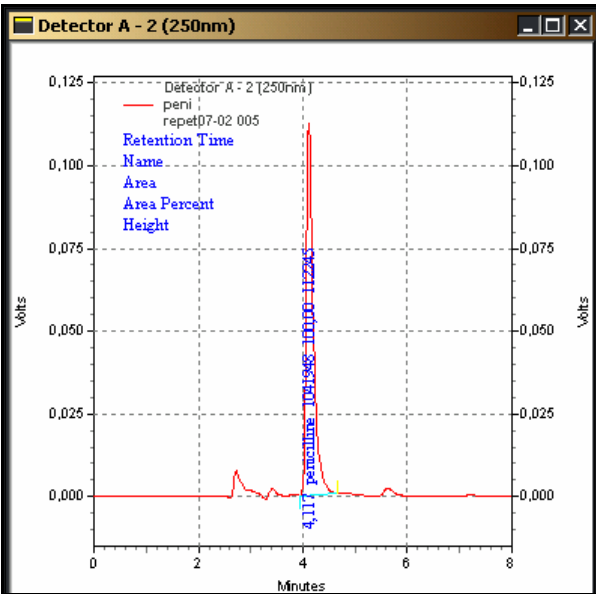
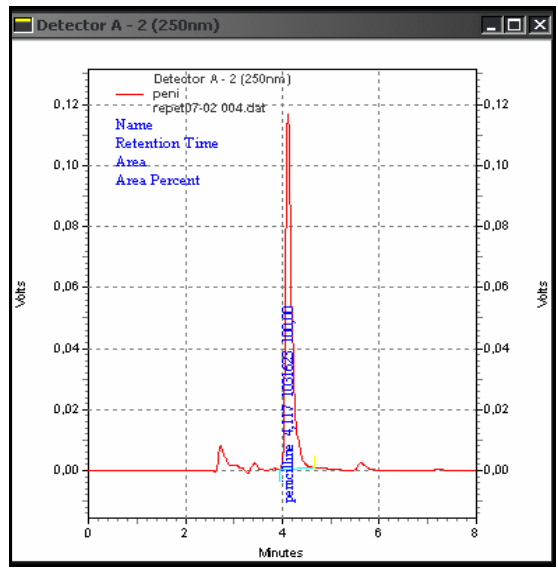
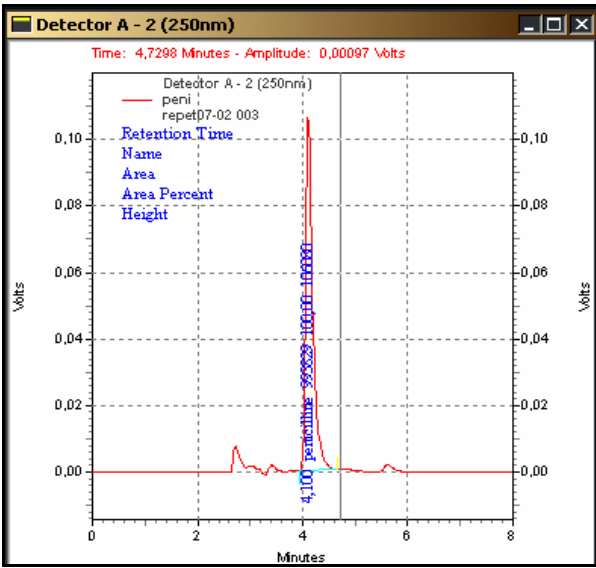


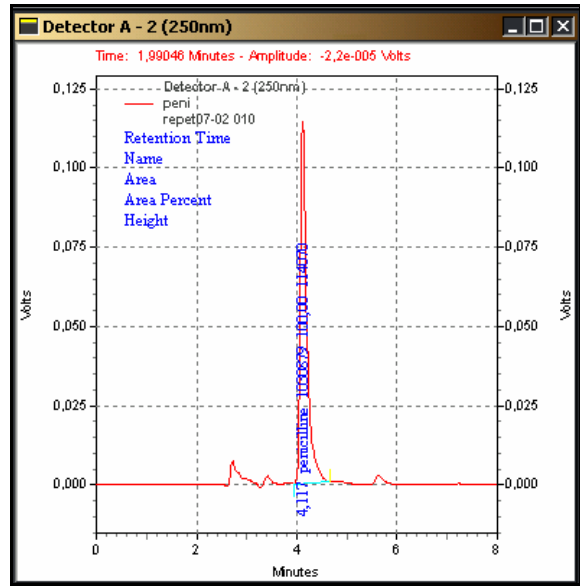
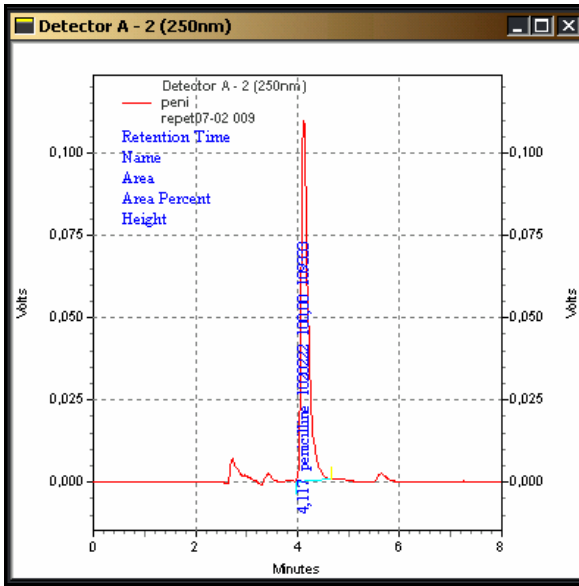


3^{ÈME} SÈRIE DE REPRODUCTIBILITÈ POUR LA PÈNICILLINE



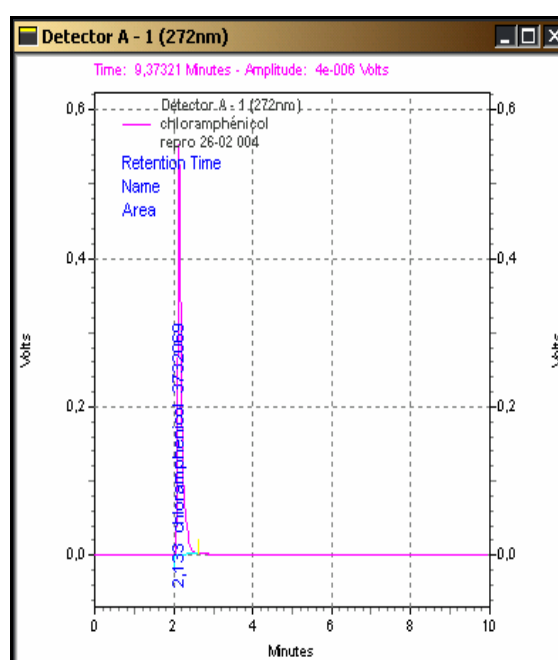
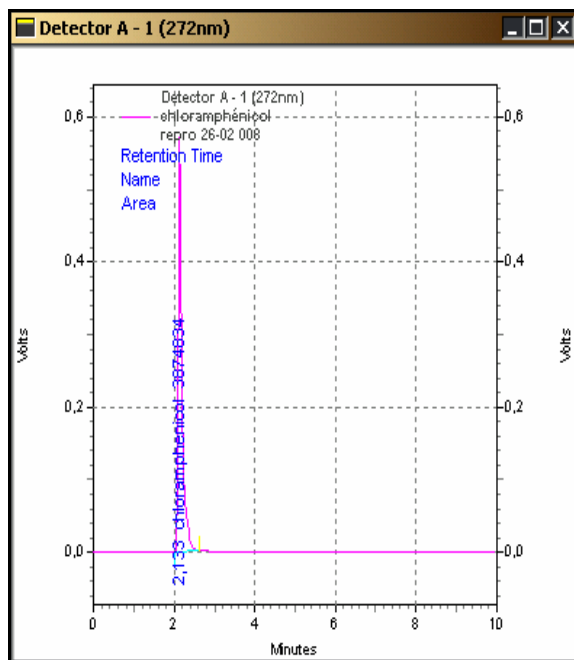
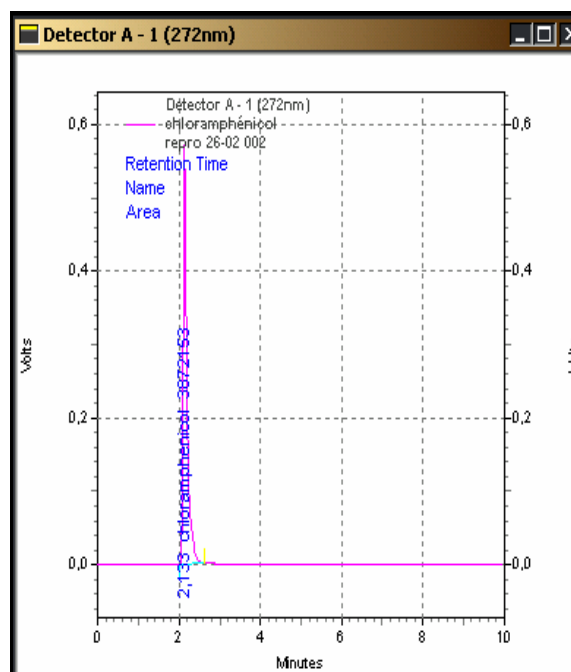
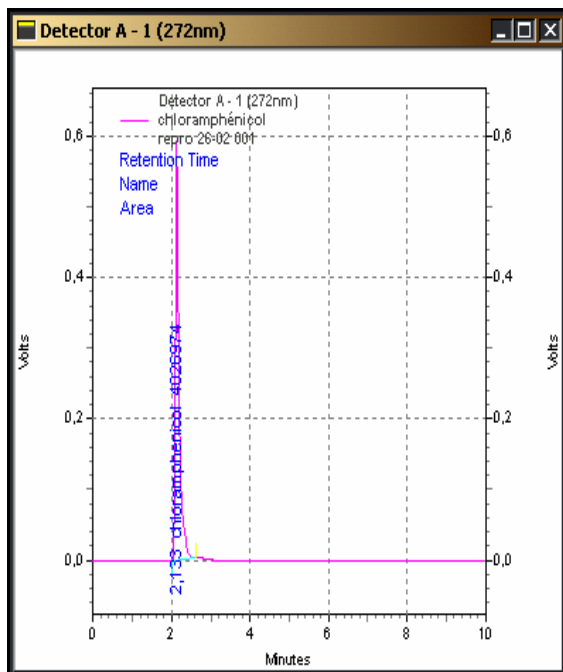


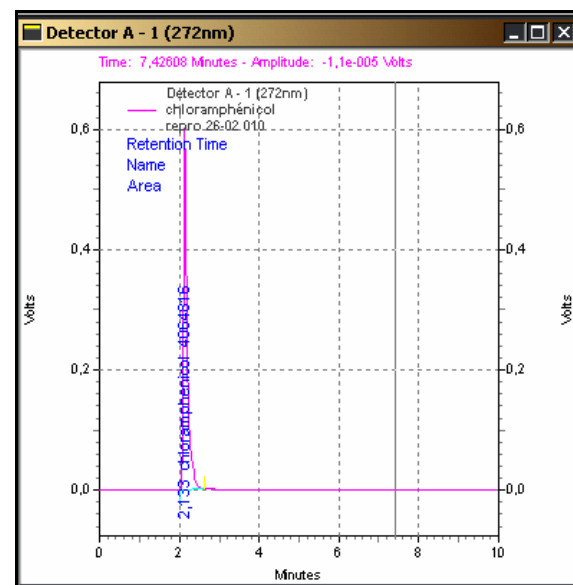
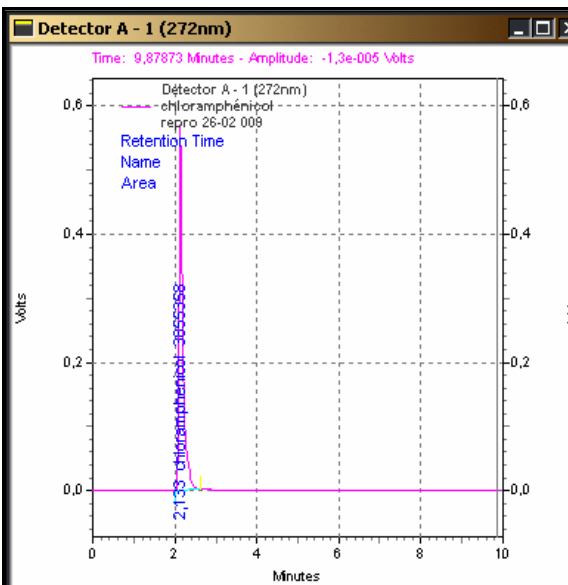
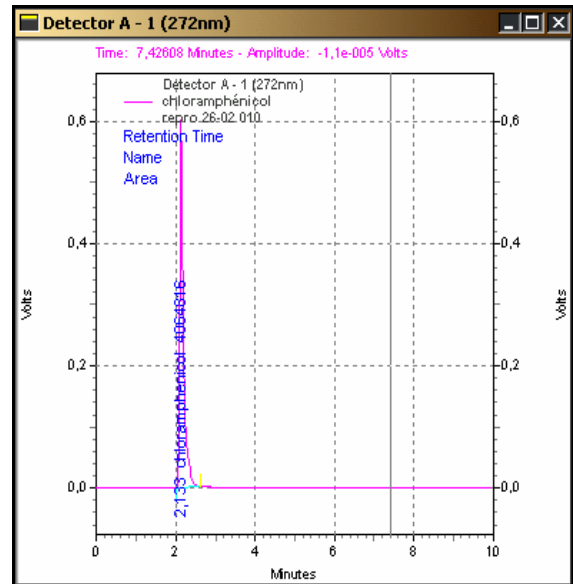
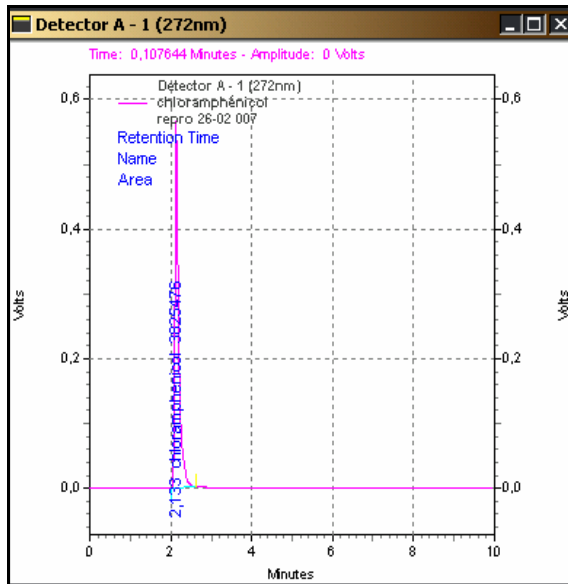
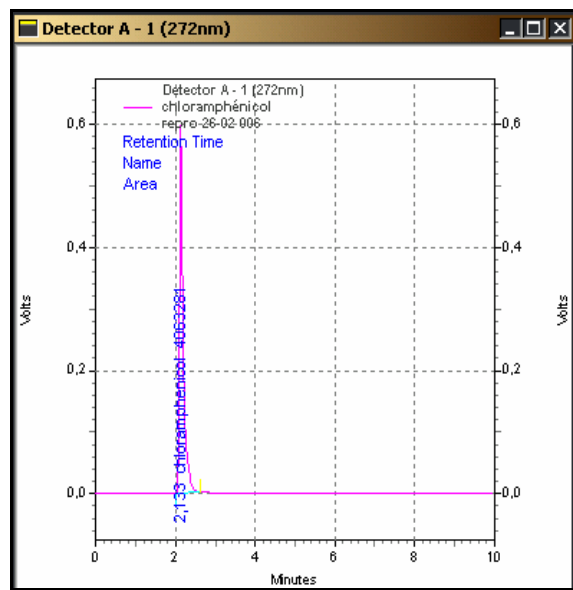
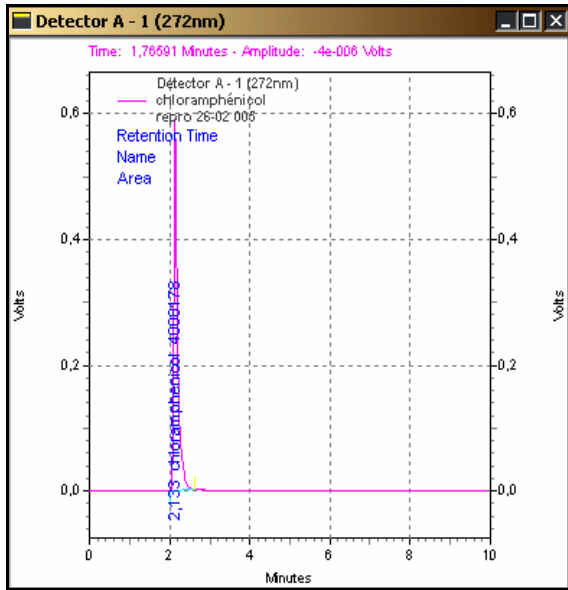


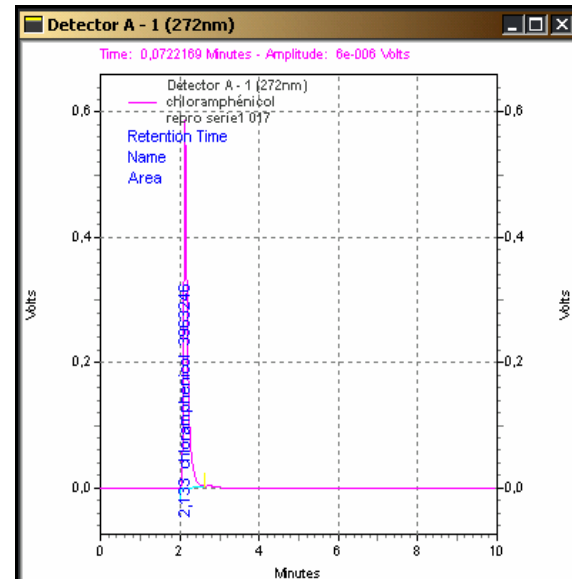
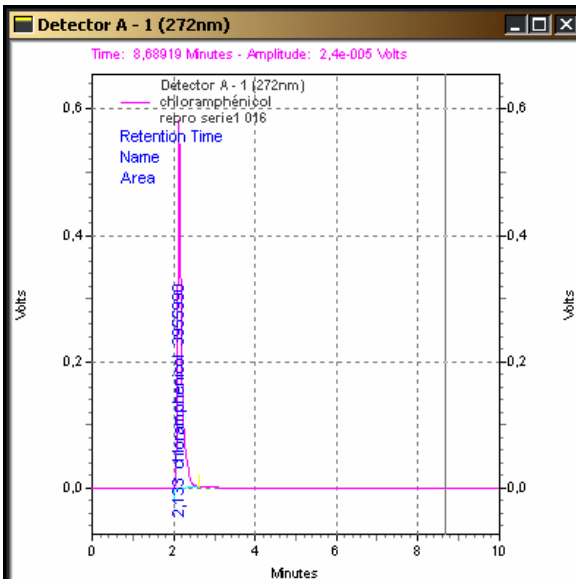
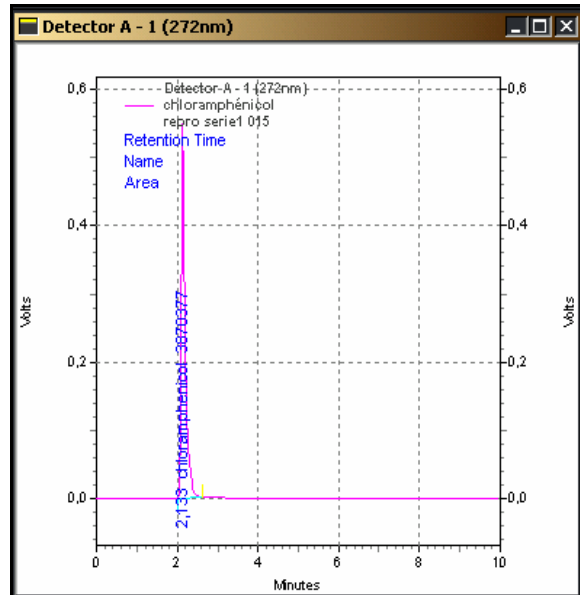
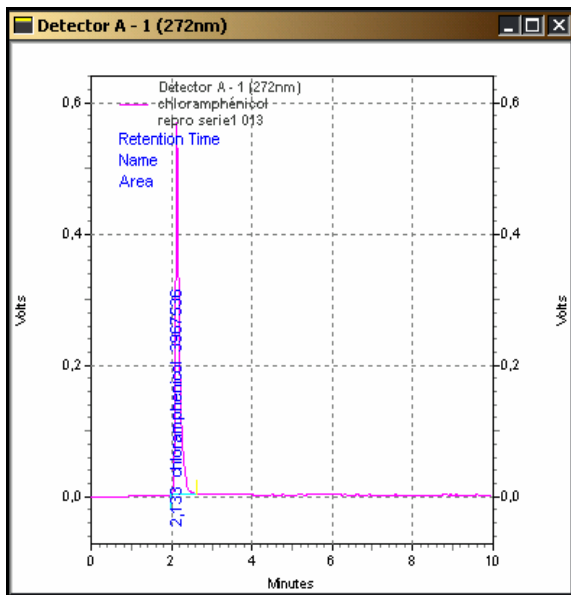
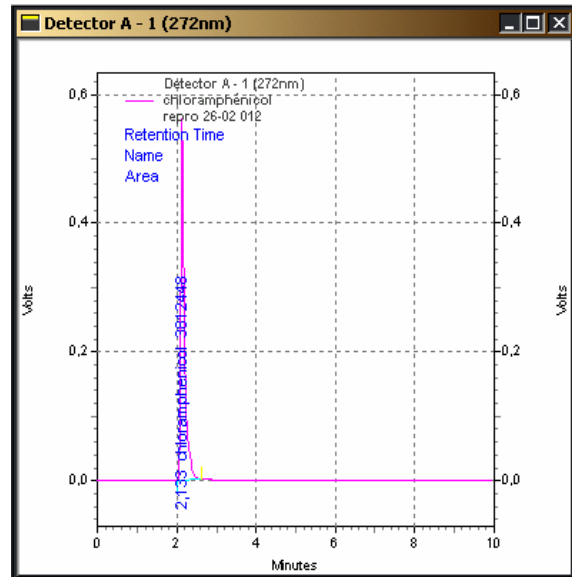
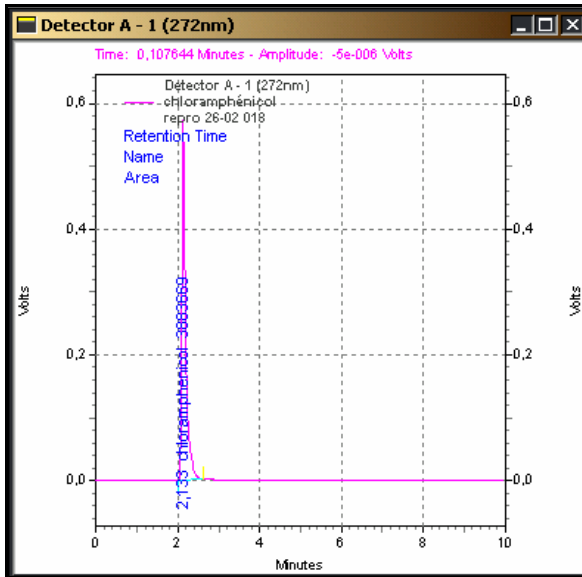


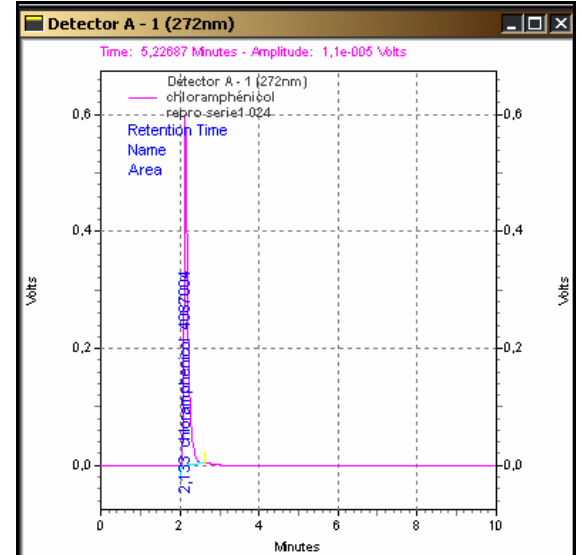
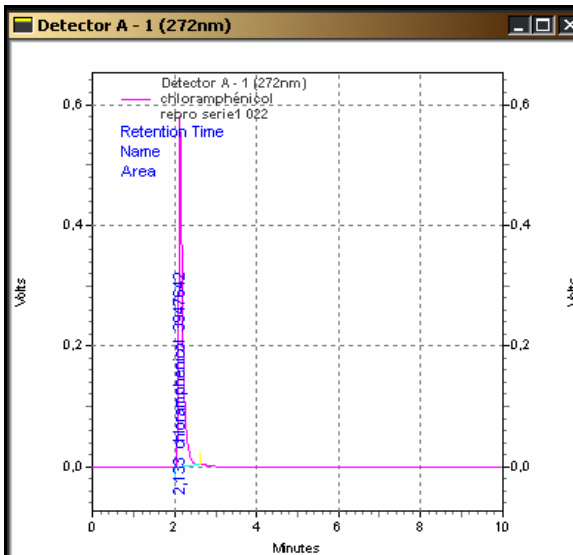
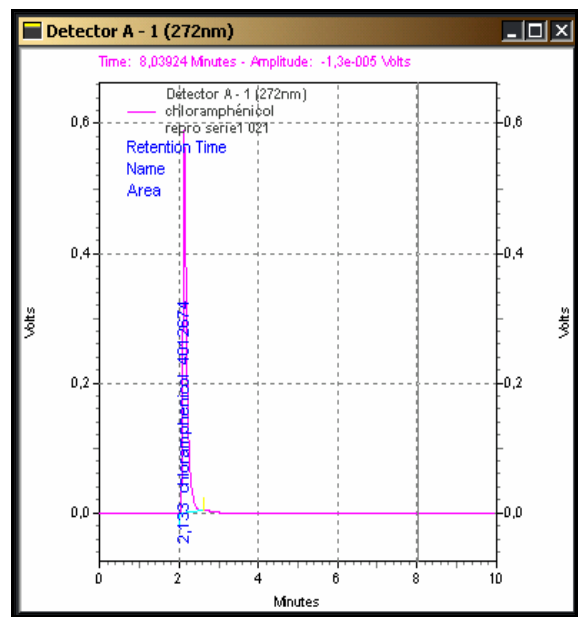
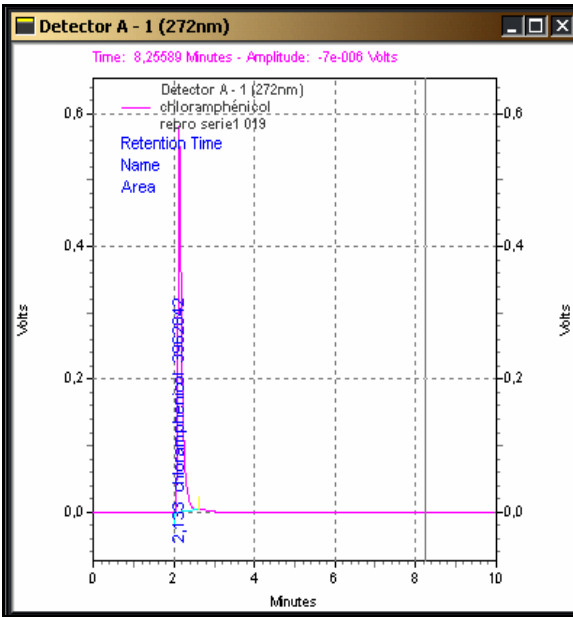
Annexe n° 9 : chromatogrammes des trois séries de reproductibilité du chloramphénicol

1^{ÈRE} SÉRIE DE REPRODUCTIBILITÉ POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

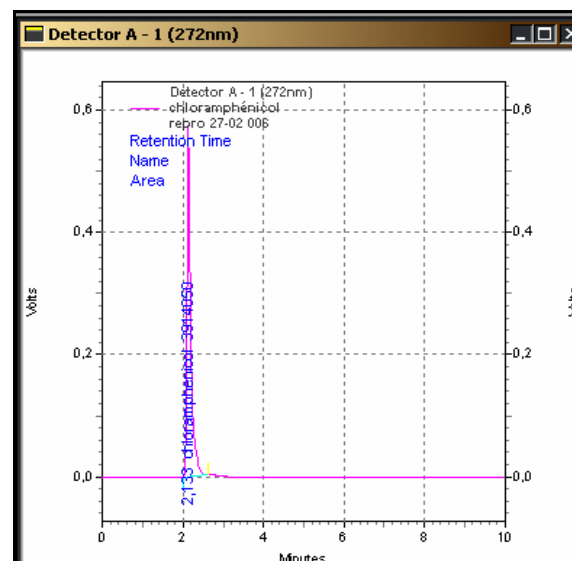
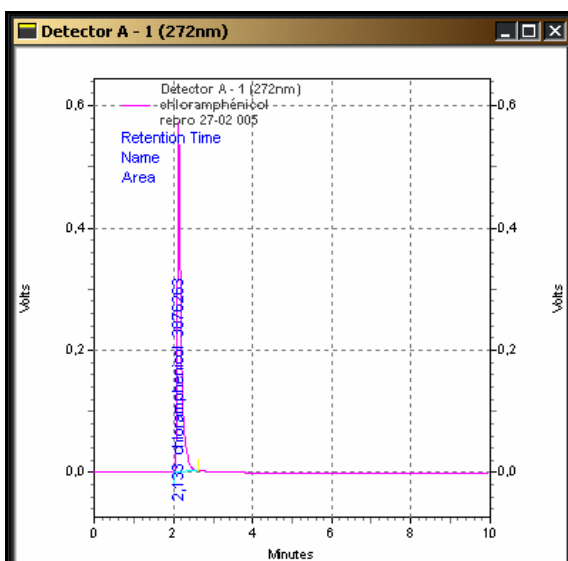
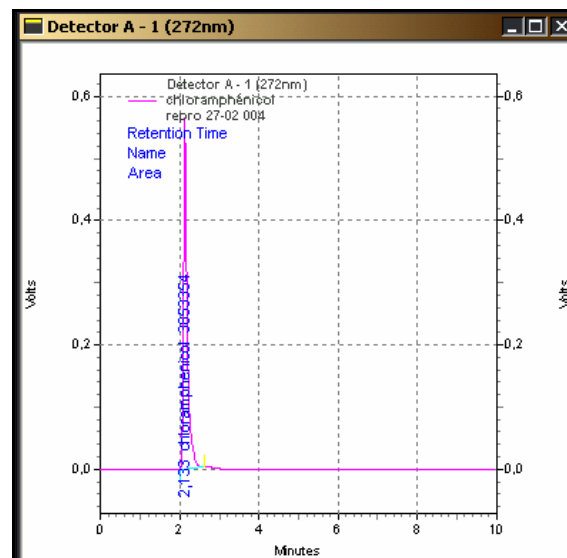
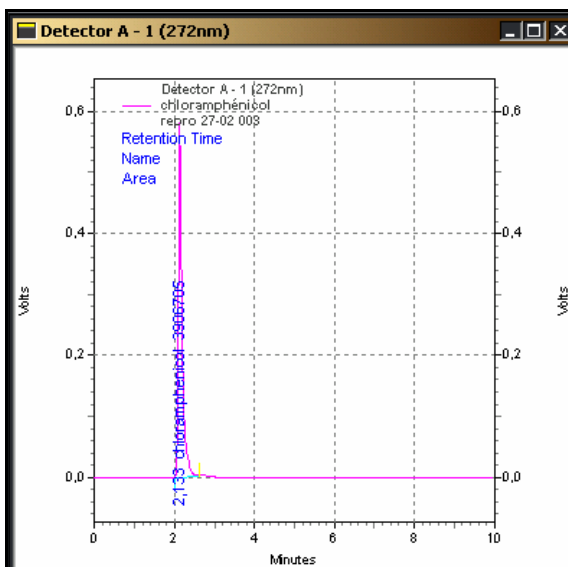
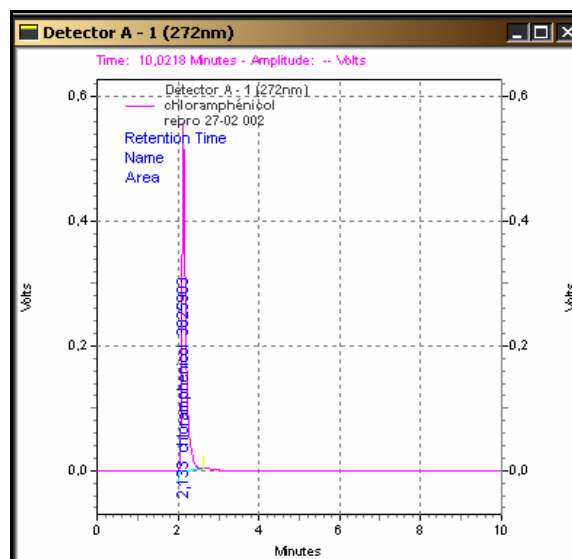
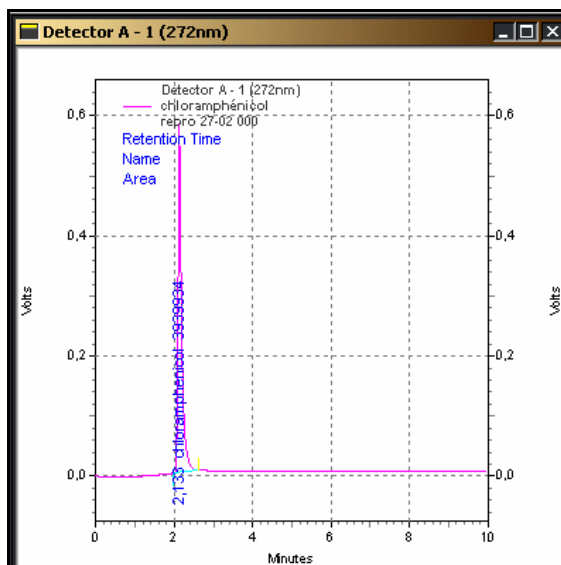


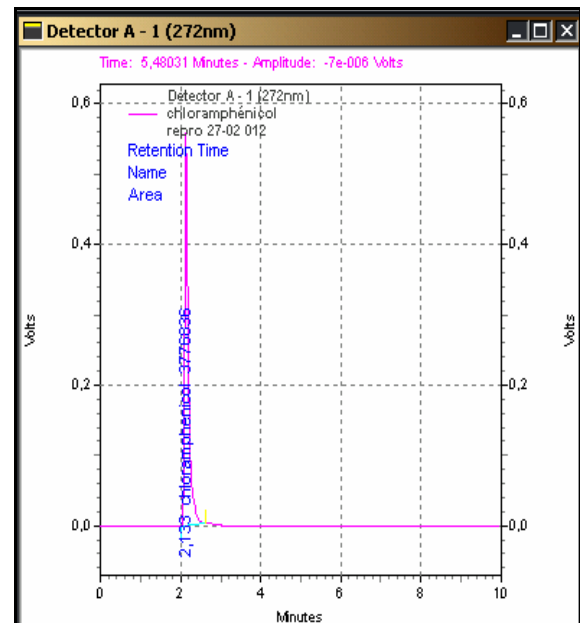
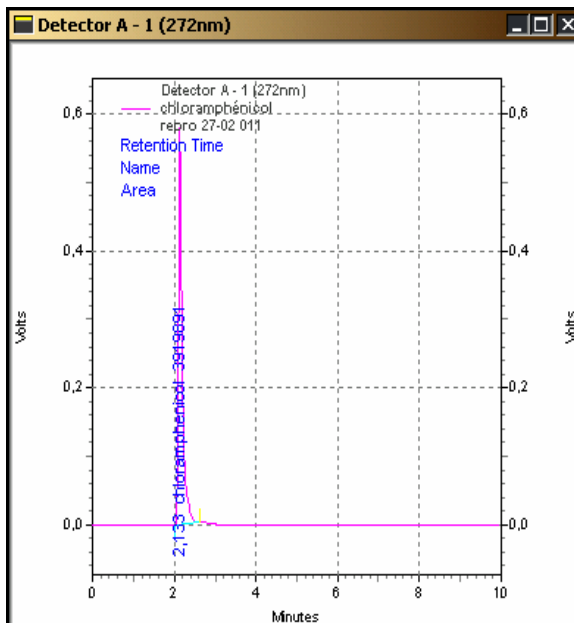
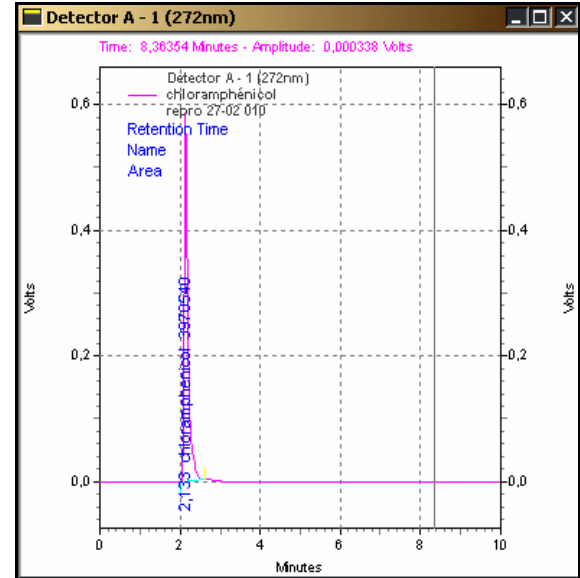
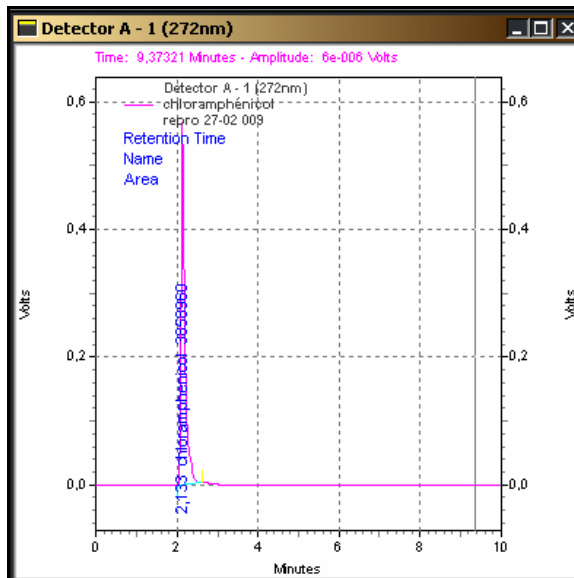
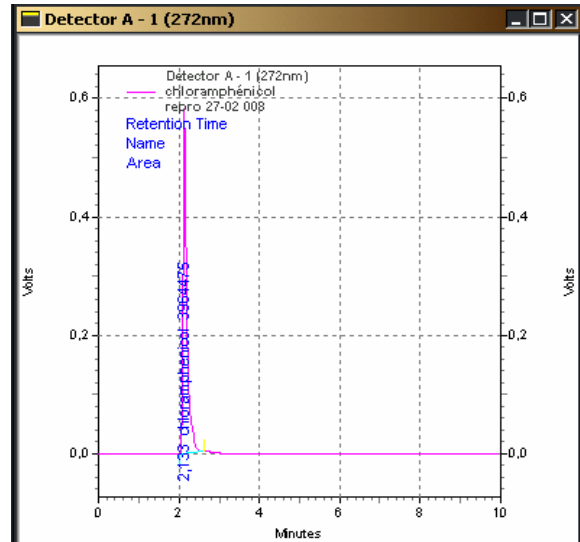
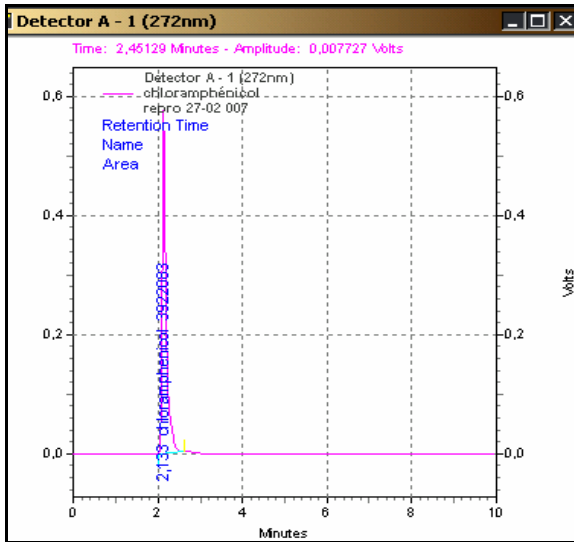


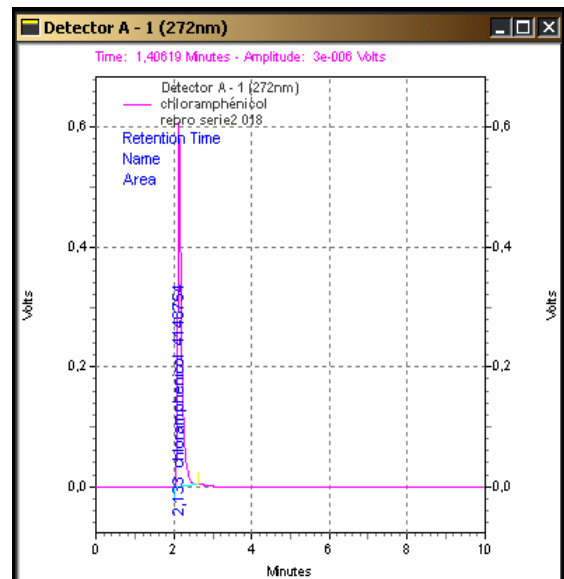
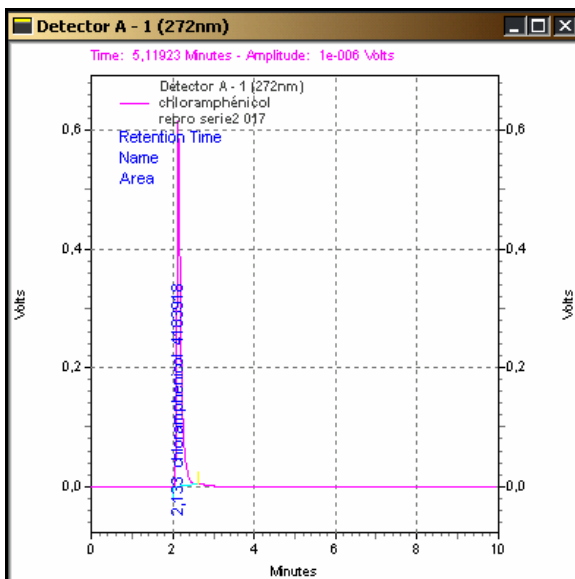
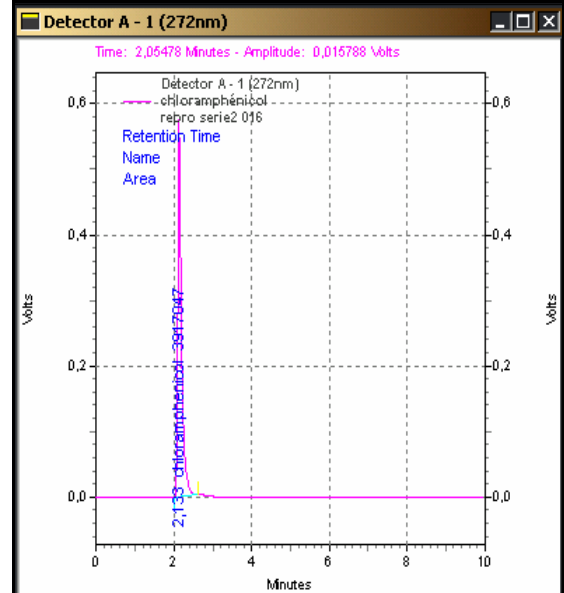
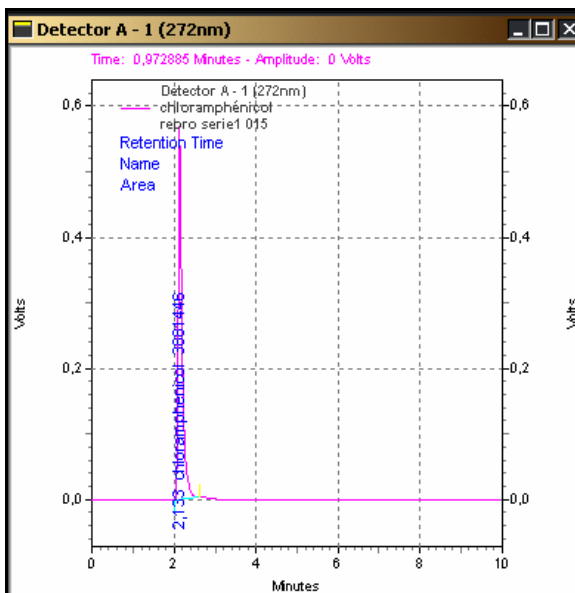
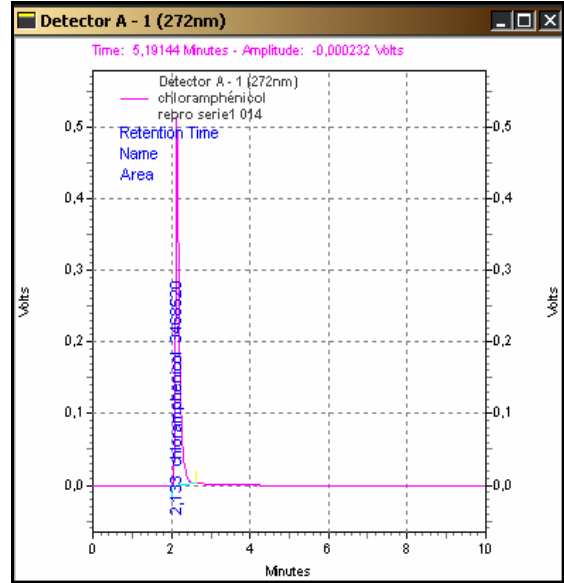
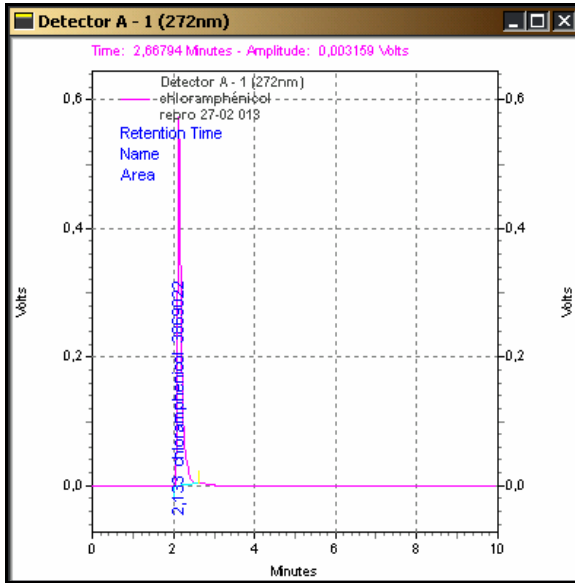


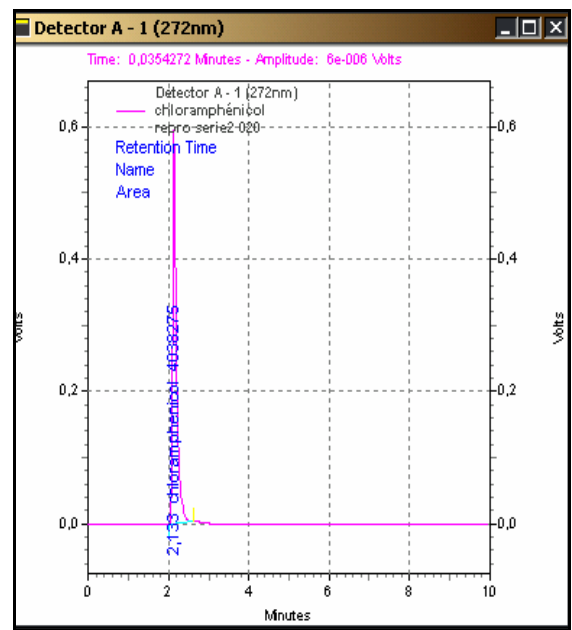
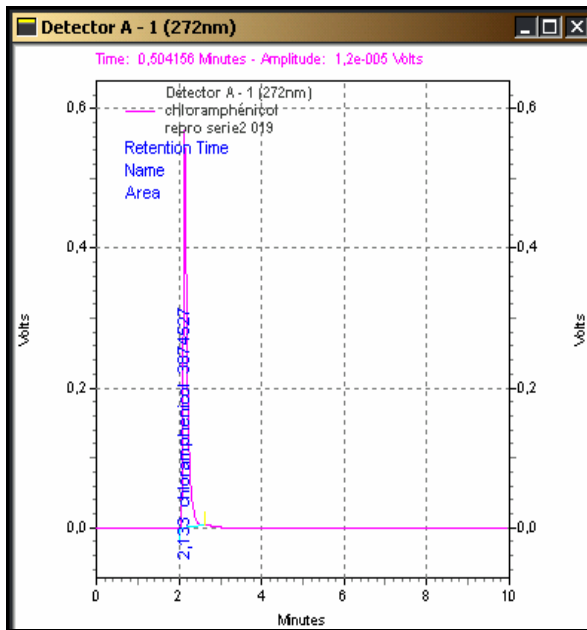


2^{ÈME} SÉRIE DE REPRODUCTIBILITÉ POUR LE CHLORAMPHÉNICOL

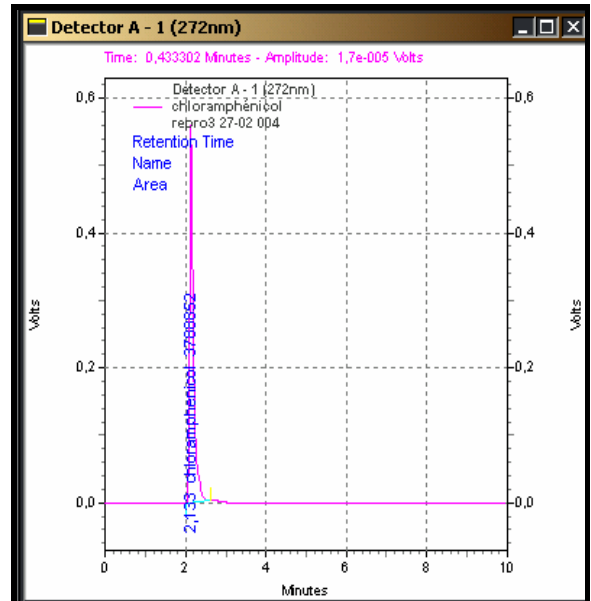
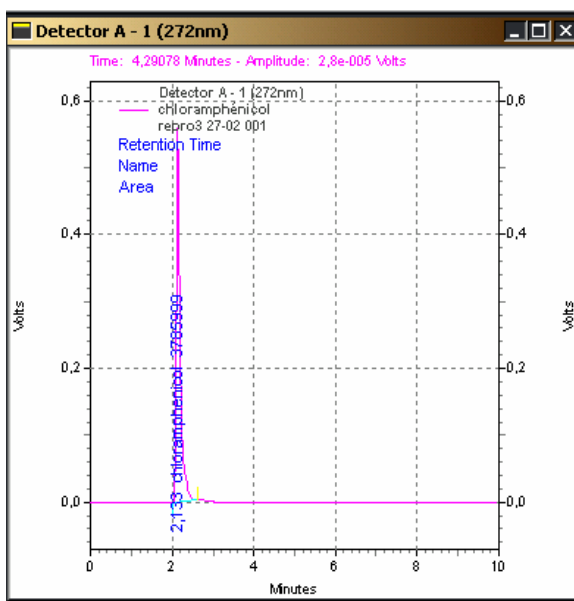


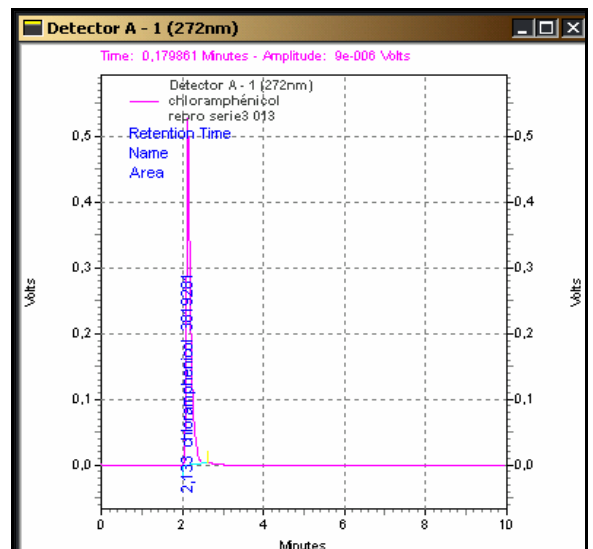
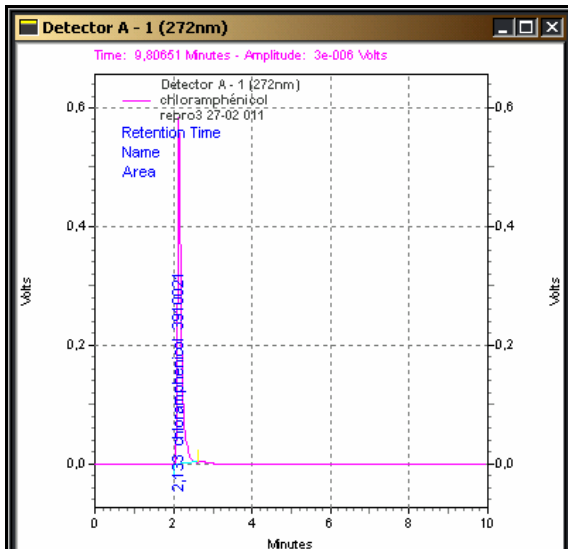
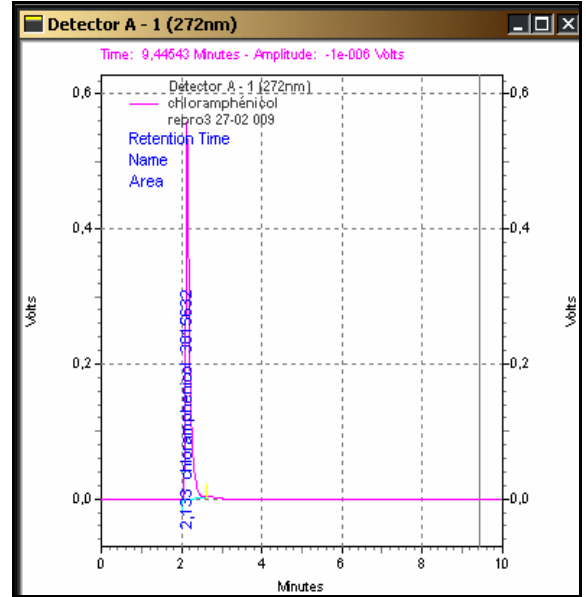
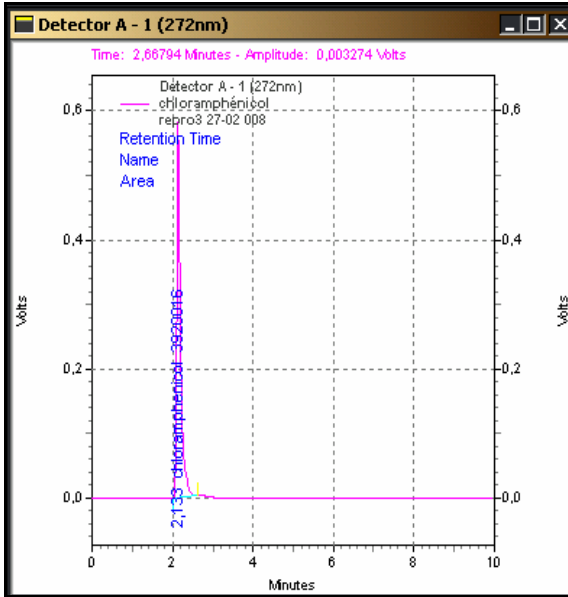
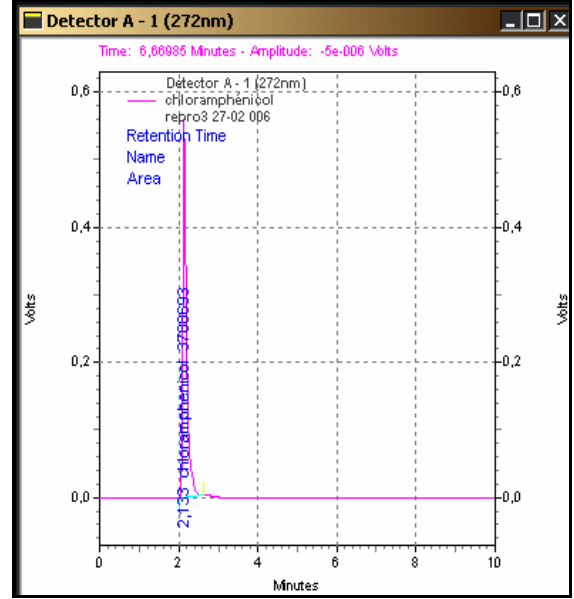
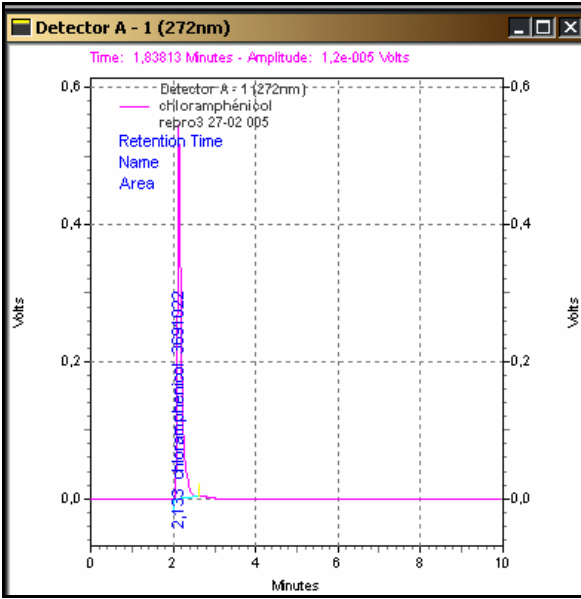


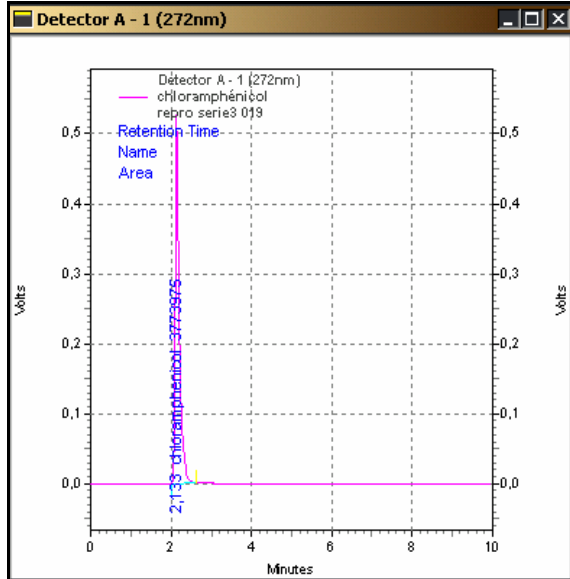
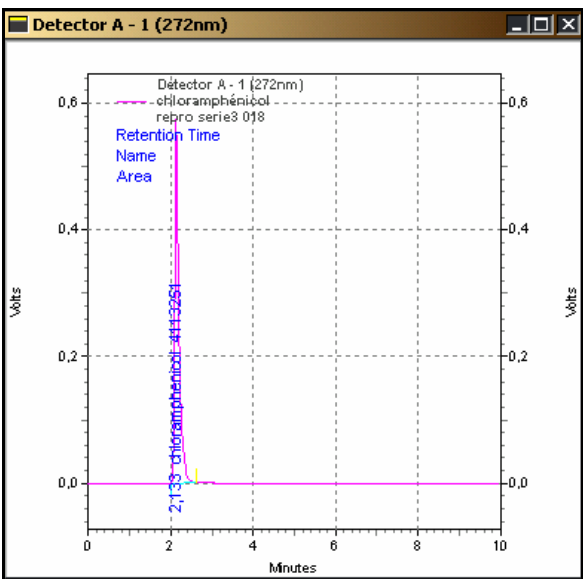
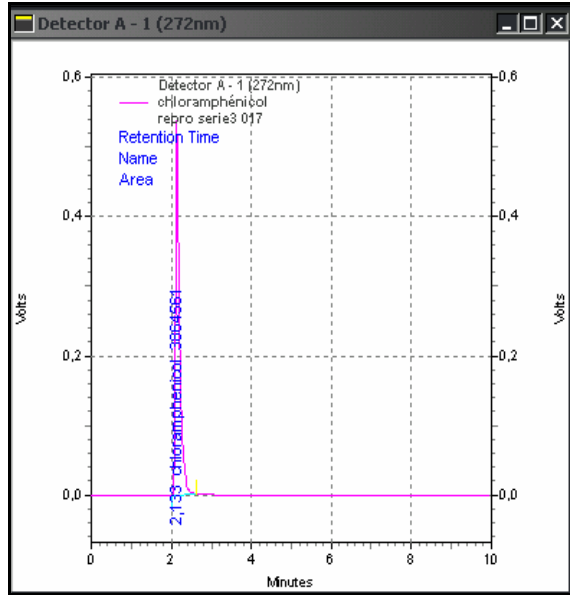
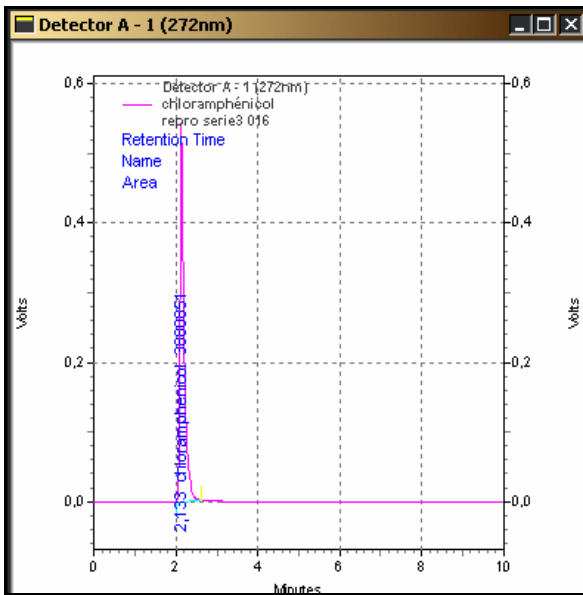
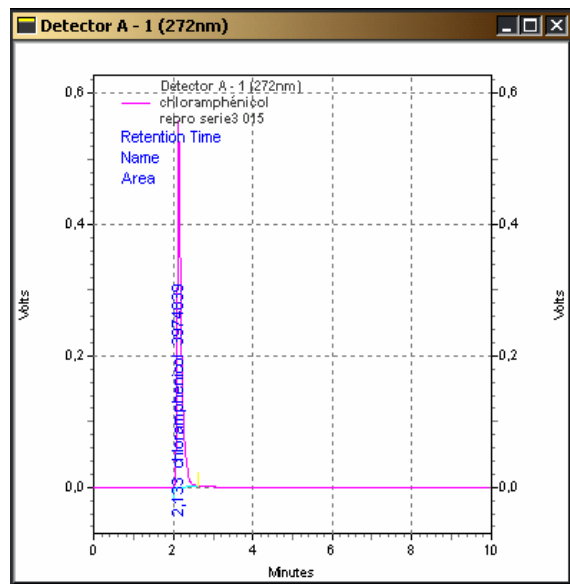
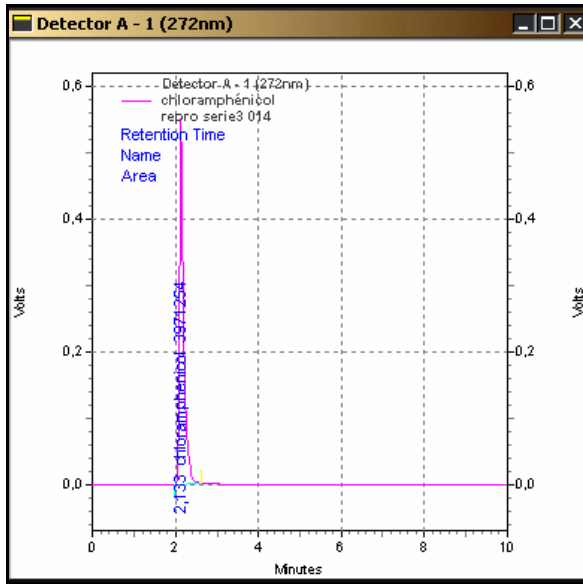


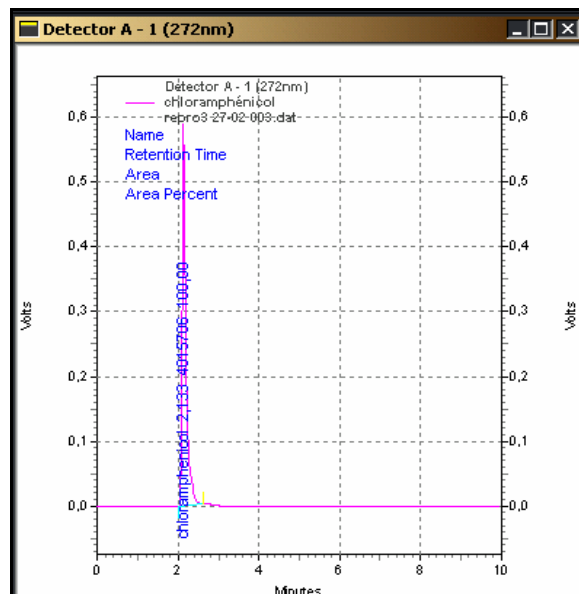
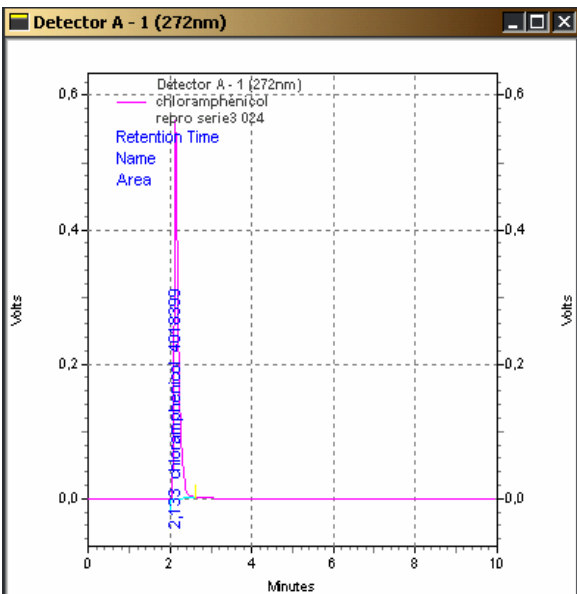
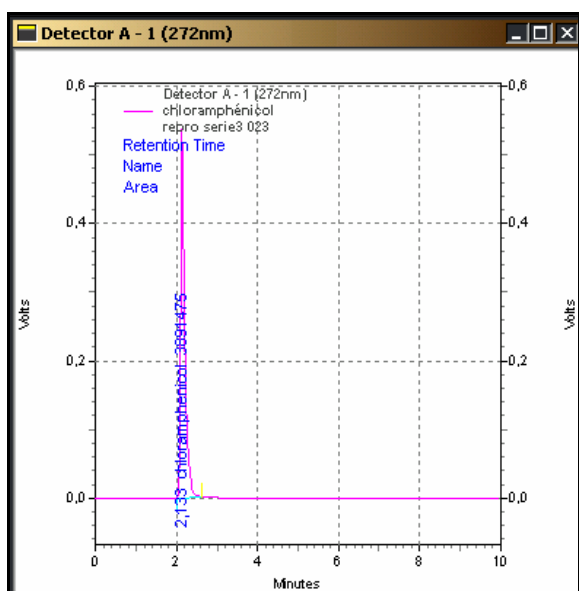
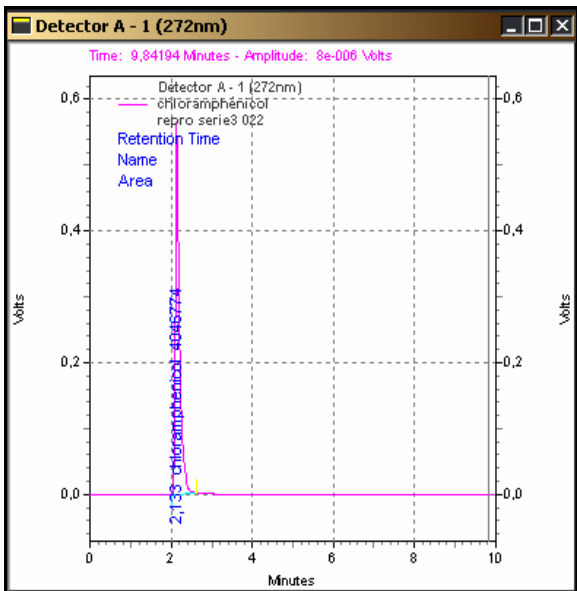
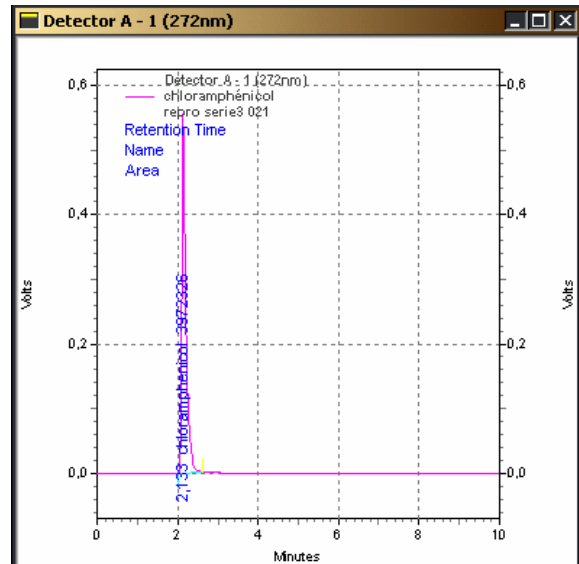
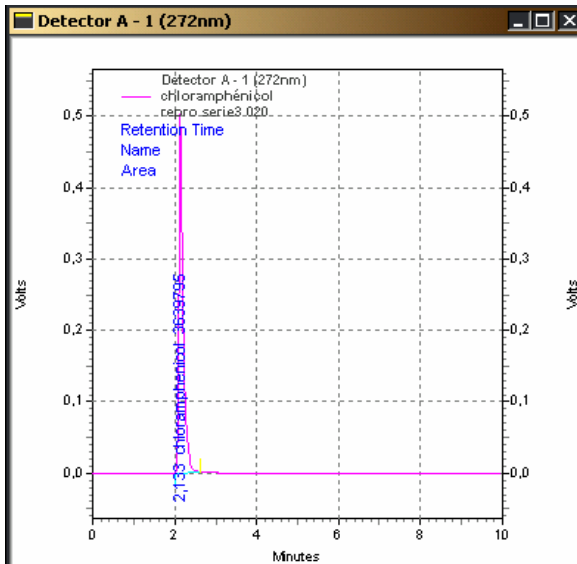


3^{ÈME} SÈRIE DE REPRODUCTIBILITÈ POUR LE CHLORAMPHÈNICOL









RÉSUMÉ

L'auteur a procédé à l'optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus de pénicilline G et de chloramphénicol pour les rechercher dans une future étape (doctorat) par chromatographie liquide haute performance (HPLC) dans le lait.

Les investigations expérimentales ont permis de retenir les paramètres d'analyse suivants :

Pour la pénicilline :

Une concentration d'échantillon de 0.15 mg/ml (échantillon dilué dans l'acétonitrile), une phase stationnaire de type VP-ODS C18 en phase inverse, une phase mobile composée de méthanol, un débit de 1 ml/min, une longueur d'onde de 250 nm, un volume d'injection de 20 µl et un temps d'analyse de 8 min.

Pour le chloramphénicol :

Une concentration d'échantillon de 0.2 mg/ml (échantillon dilué dans le méthanol), une phase stationnaire de type VP-ODS C18 en phase inverse, une phase mobile composée de méthanol, un débit de 1.4 ml/min, une longueur d'onde de 272 nm, un volume d'injection de 20 µl et un temps d'analyse de 10 min.

Les résultats pour ces deux antibiotiques sont ensuite soumis au tests de fiabilité : répétabilité, reproductibilité et linéarité de la courbe d'étalonnage en employant les tests statistiques de Student.

Mots clés : HPLC, antibiotiques, résidus, lait, santé publique.

ملخص

في هذا العمل , عمل الكاتب على تحسين عوامل الكشف و تقدير قيمة رواسب المضادين الحيويين: البنسلين و الكلورونفنيكول في الحليب بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي.

البحوث التجريبية سمحت بضبط العوامل التالية :

❖ بالنسبة للبنسلين:

تركيز المحلول : 0,15 مغ/ مل (الكمية مذابة في الاسيتونيتريول) , المرحلة الثابتة من نوع (C 18VPODS) نعمل وفق مرحلة منعكسة , المرحلة المتحركة متكونة من ميتانول , الحجم المحقن : 20 ميكرو لتر , نسبة تدفق المرحلة المتحركة: 1 مل/د , طول أمواج الامتصاص: 250 نانومتر , وقت التحليل: 8 د.

❖ بالنسبة للكلورونفنيكول:

تركيز المحلول : 0.2 مغ/ مل (الكمية مذابة في الميتانول) , المرحلة الثابتة من نوع (C18VPODS) نعمل وفق مرحلة منعكسة , المرحلة المتحركة متكونة من متانول , الحجم المحقن : 20 ميكرو لتر , نسبة تدفق المرحلة المتحركة : 1.4 مل/د , طول أمواج الامتصاص: 272 نانومتر , وقت التحليل : 10 د.

النتائج المسجلة لهدان المضادين الحيويين خضعوا في ما بعد لاختبارات التثبيت ودراسة مصداقية النتائج وذلك عن طريق اختيار التكرارية, الإنتاجية و تخطيط منحني الكميات المترابطة باستعمال المعيار الإحصائي لستيوون.

الكلمات المفتاحية : الكروماتوغرافيا السائلة ذات الضغط العالي , المضاد الحيوي , الحليب , الصحة العامة للمستهلك.

ABSTRACT

An analytical method to identify and quantify antibiotic residues of penicillin G and chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed.

The experimental investigation developed following conditions:

The penicillin work conditions are:

The antibiotics were dissolved in acetonitrile at a concentration of 0.15 mg/ml, The column used was VP-ODS C18, the mobile phase was made up of methanol, a flow rate of 1 ml/min, UV detection at 250 nm, injection volume of 20 µl and run time of 8 min.

The chloramphenicol work conditions are:

The antibiotics were dissolved in methanol at a concentration of 0.2 mg/ml, the column used was VP-ODS C18, the mobile phase was made up of methanol, a flow rate of 1.4 ml/min, UV detection at 272 nm, injection volume of 20 µl and run time of 10 min.

Then the results were validating by tests of: repeatability, reproducibility and linearity of calibration curves.

Key Words: HPLC, antibiotics, residues, milk, public health.